

## ***Candida albicans* expostas a antifúngicos e fagócitos aumentam a expressão gênica de aspartato proteases secretadas**

### ***Candida albicans* exposed to antifungals and phagocytes increase the gene expression of secreted aspartate proteases**

Josidel Conceição Oliver<sup>1</sup>, Carla Benedini Ribeiro Jorge Ferreira<sup>1</sup>, Michelle de Jesus Coimbra<sup>1</sup>, Amanda Latercia Tranches Dias<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Alfenas, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Alfenas, Minas Gerais, Brasil.

E-mail: jsdl.oliver@gmail.com e amandaltdias@gmail.com

#### **RESUMO**

*Candida albicans* está entre os principais patógenos em infecções fúngicas invasivas de ambiente hospitalar. Entre os fatores associados à sua virulência está a expressão gênica de aspartato proteases secretadas (SAP). Nesse estudo, avaliou-se a expressão dos genes *SAP2*, *SAP4*, *SAP9* e *SAP10* em *C. albicans* SC5314 cultivadas na presença ou ausência de anfotericina B, caspofungina e fluconazol e em interação com macrófagos (Mφ). Os ensaios de interação foram realizados com 10<sup>6</sup> macrófagos/mL e 10<sup>7</sup> *C. albicans*/mL pré-expostas ou não a concentrações inibitórias (IC) e subinibitórias de antifúngicos, a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 1h. O RNA total das amostras foi extraído utilizando TRIzol® e os genes foram quantificados por Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa (qPCR) e sondas TaqMan™. *C. albicans* cultivada na presença de concentrações subinibitórias de anfotericina B, caspofungina e fluconazol apresentou regulação positiva na expressão de *SAP2*, *SAP4*, *SAP9* e *SAP10*, a expressão gênica foi maior em leveduras cultivadas em contato com os Mφ. *C. albicans* cultivada em ¼ da IC para anfotericina B e em contato com Mφ apresentou um aumento médio 235,8 vezes maior na expressão de *SAP9*, se comparada com amostras da levedura cultivada na ausência de macrófagos e antifúngicos. *C. albicans* expostas a 1/8 da IC de caspofungina e em contato com Mφ apresentou um aumento médio de 835,9 e 393,4 vezes maior na expressão de *SAP2* e *SAP4*, respectivamente. Esses resultados mostram que concentrações subinibitórias de antifúngicos podem aumentar a virulência de *C. albicans*.

Essas concentrações têm sido utilizadas como tratamento sistêmico empírico em pacientes com risco para candidíase invasiva, bem como, pode ocorrer em falha terapêutica devido a parâmetros farmacocinéticos/farmacodinâmicos ou a não adesão ao tratamento corretamente com erros de dosagem ou tempo entre as doses. Compreender a expressão desses genes na patogênese fúngica pode auxiliar na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para candidíase.

**Palavras-chave:** Proteases aspárticas secretadas; Caspofungina; Fluconazol; Anfotericina B; Macrófagos; Fagócitos.

## ABSTRACT

*Candida albicans* is among the main pathogens in invasive fungal infections of the hospital environment. Among the factors associated with its virulence is the gene expression of secreted aspartate proteases (*SAP*). In this study, we evaluated the expression of *SAP2*, *SAP4*, *SAP9* and *SAP10* genes in *C. albicans* SC5314 cultured in the presence or absence of amphotericin B, caspofungin and fluconazole and in interaction with M $\phi$ . Interaction assays were performed with  $10^6$  macrophages/mL and  $10^7$  *C. albicans*/mL exposed or not to inhibitory and subinhibitory antifungal concentrations was cultured in RPMI-1640 medium supplemented with fetal bovine serum and antibiotics at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 1h. Total RNA from the samples was extracted using TRIzol® and genes were quantified by Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) and TaqMan™ probes. *C. albicans* cultured in the presence of subinhibitory concentrations of amphotericin B, caspofungin and fluconazole showed positive regulation in the expression of *SAP2*, *SAP4*, *SAP9* and *SAP10*, gene expression was even higher in yeasts cultured in contact with M $\phi$ . The *C. albicans* sample pre-cultured in ¼ MIC for amphotericin B and in contact with M $\phi$  showed a 235.8-fold increase in the expression of *SAP9* compared to samples of cultured yeast in the absence of macrophages and antifungal. *C. albicans* exposed to 1/8 MIC for caspofungin and in contact with M $\phi$  showed a mean increase of 835.9 and 393.4 times higher in the expression of *SAP2* and *SAP4*, respectively, compared to samples of cultured yeast in the absence of macrophages and antifungals. These results are of concern because they show that subinhibitory concentrations of antifungals may increase the virulence of *C. albicans*. These concentrations have been used as empirical systemic treatment for patients with risk factors for invasive candidiasis as well as may occur in therapeutic failure due to pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters or non-adherence to treatment correctly with dosing errors or

time between doses. In addition, understanding the expression of these genes in fungal pathogenesis may aid in the research and development of new drugs for candidiasis.

**Keywords:** Secreted Aspartic Proteases; Caspofungin; Fluconazole; Amphotericin B; Macrophages; Phagocytes.

## INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas invasivas são um grave problema de saúde pública, principalmente em ambiente hospitalar, no qual a maior incidência deve-se ao gênero *Candida* spp. (CORNISTEIN et al., 2013; BRAGA et al., 2018). A produção de aspartato proteases secretadas (Sap) por algumas espécies de *Candida* spp. pode estar relacionada com o aumento do número de infecções e resistência aos medicamentos. Existe uma família de 10 genes *SAP*, sendo que *SAP2* é o gene mais comumente expresso em *Candida albicans*, *SAP4* está associado à formação de hifas que podem contribuir para a invasão dos tecidos hospedeiros e destruição de macrófagos, e *SAP9* e *SAP10* estão ligas a superfície fúngica (NAGLIK et al., 2008; THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011).

Algumas espécies de *Candida* spp. podem viver em equilíbrio com a microbiota do hospedeiro sem causar-lhe nenhum dano, entretanto, alterações na imunidade do hospedeiro, lesões de pele ou variações da microbiota causadas por antibióticos podem mudar o estado de comensalismo para patogenicidade (PIROFSKI; CASADEVALL, 2009; HA et al., 2011; DA SILVA DANTAS et al., 2016). A imunidade protetora contra fungos patogênicos envolve diversas moléculas e células das quais destacam-se os fagócitos como neutrófilos e macrófagos que são importantes fatores na defesa do hospedeiro contra infecções por *Candida* spp. (KAUR; MA; CORMACK, 2007; HA et al., 2011). Entretanto, quando o sistema imune não é capaz de impedir a infecção faz-se necessário a utilização de antifúngicos para inibir o crescimento de *C. albicans* (VOLMER; SZPILMAN; CARREIRA, 2010). O Objetivo desse estudo foi avaliar a expressão dos genes *SAP* após exposição de *C. albicans* à antifúngicos e interação com fagócitos.

## MATERIAS E MÉTODOS

### Células fúngicas

A linhagem *C. albicans* SC5314, que estava mantida a -80°C, foi cultivada em ágar Sabouraud Dextrose por 24 horas a 37°C, e posteriormente, foram preparadas suspensões com

10<sup>5</sup> células/mL em 20,0 mL de caldo *Yeast Carbon Base* suplementado com 0,2% (m/v) de soro albumina bovina (YCB-BSA) ou em caldo *Yeast extract – Peptone – Dextrose* (YPD), para avaliar possíveis alterações de crescimento e expressão gênica em diferentes meios de cultura. Adicionalmente, os isolados foram cultivados também na presença da MIC<sub>90</sub> e ¼ da MIC<sub>90</sub> de anfotericina B, MIC<sub>50</sub> e ¼ da MIC<sub>50</sub> de fluconazol e 1/8 da MIC<sub>50</sub> de caspofungina. As culturas foram incubadas por 24 horas a 37°C e 180 rpm. Após o cultivo, as culturas foram transferidas para tubos de centrifuga estéreis, centrifugadas a 4000 rpm e por 4 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas com água estéril e utilizadas no ensaio de interação patógeno-hospedeiro.

### **Fagócitos**

As células monocíticas humanas de origem leucêmicas (THP-1) foram cultivadas em RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, e antibióticos. Para diferenciação dos monócitos em macrófagos, 10<sup>6</sup> células THP-1 foram cultivadas em RPMI-1640 suplementado e 100 nM de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) por 48 horas.

### **Interação patógeno-hospedeiro**

12 grupos de *C. albicans* foram cultivados na ausência ou na presença dos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina, e em interação ou não com macrófagos (MOI 10), por 1h, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final, utilizou-se água pH 11 por 8 minutos para lizar as células fagocíticas e liberar as células de *C. albicans* que foram internalizadas.

### **Extração, purificação e amplificação de RNA**

O RNA das amostras foi extraído usando TRIzol® Reagente (Ambion™), segundo protocolo do fabricante, purificado com DNase I (Desoxirribonuclease I, Promega), e convertido em cDNA, utilizando o kit e enzima *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) (Promega).

### **Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)**

Para qPCR foram utilizadas sondas de hidrólise duplamente marcadas do tipo TaqMan, que possuem o fluoróforo 6-FAM na extremidade 5' e o *quencher* Iowa Black® FQ na 3'. A sequência dos *primers* utilizados para detectar os genes *SAP2*, *SAP4*, *SAP9* e *SAP10*

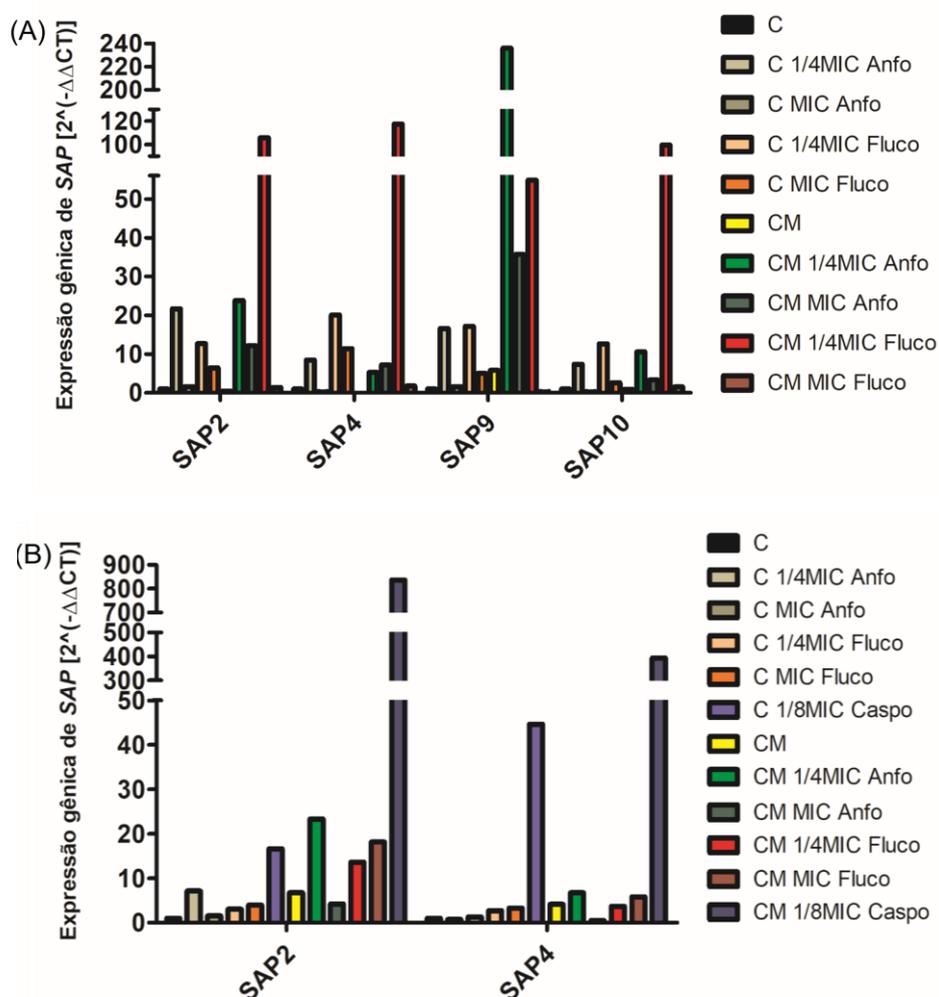
estão disponíveis em Naglik et al. (2008), o gene *ACT1* foi utilizado como gene normalizador. Os resultados foram analisados pelo método do  $C_T$  comparativo ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) utilizado para analisar as alterações relativas na expressão do gene a partir de experimento quantitativo de qPCR (NAGLIK et al., 2008; STANISZEWSKA et al., 2014).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

*C. albicans* expostas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos antifúngicos mostraram menor aumento na expressão dos genes pesquisados, entretanto, a levedura cultivada na presença de concentrações subinibitórias de anfotericina B, caspofungina e fluconazol apresentou regulação positiva na expressão dos genes *SAP2*, *SAP4*, *SAP9* e *SAP10*. A qual foi em média 5,33 vezes maior em leveduras em interação com  $M\phi$ , se comparada as leveduras que não entraram em contato com  $M\phi$ . Todos os quatro genes pesquisados foram 100 vezes mais expressos em *C. albicans* após exposição a  $\frac{1}{4}$  da  $MIC_{50}$  de fluconazol e interação com fagócitos. *C. albicans* pré-cultivada em  $\frac{1}{4}$  da MIC para anfotericina B e em contato com  $M\phi$  apresentou aumento médio 235,8 vezes maior na expressão de *SAP9*, se comparada com amostras da levedura cultivada na ausência de macrófagos e antifúngicos. *C. albicans* expostas a  $\frac{1}{8}$  da MIC para caspofungina e em contato com  $M\phi$  apresentou um aumento médio de 835,9 e 393,4 vezes maior na expressão de *SAP2* e *SAP4*, respectivamente, se comparada com amostras da levedura cultivada na ausência de macrófagos e antifúngicos (FIGURA 1).

Semelhantemente, Barelle *et al.* (2008) mostraram que *C. albicans* exposta ao fluconazol teve regulação positiva dos genes *SAP4*, *SAP5* e *SAP6*, respectivamente, por uma média de 5,2 vezes, 3,5 vezes e 4,9 vezes. Copping *et al.* (2005) também verificaram aumento da expressão de *SAP2* e *SAP9* após exposição ao fluconazol e caspofungina. No estudo de Theberge *et al.* (2013) *C. albicans* mostrou aumento na expressão de *SAP2* e *SAP4* após exposição a anfotericina B.

Figura 1 – Expressão gênica diferencial de aspartato proteases secretadas (*SAP2*, *SAP4*, *SAP9* e *SAP10*) em *Candida albicans* cultivada na presença ou ausência macrófagos e expostas ou não a antifúngicos, incubadas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 1 hora.



Legenda: (A): Ensaio com exposição aos antifúngicos no meio YCB-BSA; (B): Ensaio com exposição aos antifúngicos no meio YPD. C: *Candida albicans*; C 1/4MIC Anfo: *C. albicans* cultivada na presença de 0,031 µg/mL (1/4 da MIC<sub>90</sub>) de anfotericina; C MIC Anfo: *C. albicans* cultivada na presença de 0,125 µg/mL (MIC<sub>90</sub>) de anfotericina; C 1/4MIC Fluco: *C. albicans* cultivada na presença de 0,031 µg/mL (1/4 da MIC<sub>50</sub>) de fluconazol; C MIC Fluco: *C. albicans* cultivada na presença de 0,125 µg/mL (MIC<sub>50</sub>) de fluconazol; C 1/8MIC Caspo: *C. albicans* cultivada na presença de 0,008 µg/mL (1/8 da MIC<sub>50</sub>) de caspofungina; CM: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos; CM 1/4MIC Anfo: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,031 µg/mL (1/4 da MIC<sub>90</sub>) de anfotericina; CM MIC Anfo: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,125 µg/mL (MIC<sub>90</sub>) de anfotericina; CM 1/4MIC Fluco: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,031 µg/mL (1/4 da MIC<sub>50</sub>) de fluconazol; C MIC Fluco: *C. albicans* cultivada na presença de macrófagos e 0,125 µg/mL (MIC<sub>50</sub>) de fluconazol.

## CONCLUSÕES

O contato entre *C. albicans* e macrófagos aumenta a expressão dos genes *SAP*, principalmente após exposição a concentrações subinibitórias dos antifúngicos anfotericina B,

caspofungina e fluconazol. Esses resultados mostram que o uso de doses subinibitórias de antifúngicos como profilaxia, bem como, falha terapêutica devido a parâmetros farmacocinéticos / farmacodinâmicos ou a não adesão ao tratamento corretamente com erros de dosagem ou tempo entre as doses, podem favorecer a virulência de *C. albicans*. Compreender a expressão desses genes na patogênese fúngica pode ajudar na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de candidíases, contribuindo assim para a redução da incidência de morbidade e mortalidade associada a infecções fúngicas invasivas.

## AGRADECIMENTOS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG (CBB -APQ -00507 -14).

## REFERENCIAS

BARELLE, C. J.; DUNCAN, V. M. S.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R.; ODDS, F. C. Azole antifungals induce up-regulation of SAP4, SAP5 and SAP6 secreted proteinase genes in filamentous *Candida albicans* cells in vitro and in vivo. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. 315–322, 2008.

BRAGA, P. R.; CRUZ, I. L.; ORTIZ, I.; BARREIROS, G.; NOUÉR, S. A.; NUCCI, M. Secular trends of candidemia at a Brazilian tertiary care teaching hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 273–277, jul. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2018.07.008>>.

COPPING, V. M. S.; BARELLE, C. J.; HUBE, B.; GOW, N. A. R.; BROWN, A. J. P.; ODDS, F. C. Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of SAP2 and SAP9 secreted proteinase genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 645–654, 2005.

CORNISTEIN, W.; MORA, A.; ORELLANA, N.; CAPPARELLI, F. J.; DEL CASTILLO, M. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no *albicans*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, n. 6, p. 380–384, jun. 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23182240>>. Acesso em: 22 out. 2014.

DA SILVA DANTAS, A.; LEE, K. K.; RAZIUNAITE, I.; SCHAEFER, K.; WAGENER, J.; YADAV, B.; GOW, N. A. Cell biology of *Candida albicans* –host interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, p. 111–118, dez. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2016.08.006>>.

HA, J. F.; ITALIANO, C. M.; HEATH, C. H.; SHIH, S.; REA, S.; WOOD, F. M. Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. **Burns**, v. 37, n. 2, p. 181–195, mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20395056>>. Acesso em: 22 out. 2014.

KAUR, R.; MA, B.; CORMACK, B. P. A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 18, p. 7628–7633, 1 maio 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1863504&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

NAGLIK, J. R.; MOYES, D.; MAKWANA, J.; KANZARIA, P.; TSICHLAKI, E.; WEINDL, G.; TAPPUNI, A. R.; RODGERS, C. a.; WOODMAN, A. J.; CHALLACOMBE, S. J.; SCHALLER, M.; HUBE, B. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. **Microbiology**, v. 154, n. 11, p. 3266–3280, 1 nov. 2008. Disponível em: <<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2008/022293-0>>.

PIROFSKI, L.; CASADEVALL, A. Rethinking T cell immunity in oropharyngeal candidiasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 2, p. 269–73, 16 fev. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2646576&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22 out. 2014.

STANISZEWSKA, M.; BONDARYK, M.; MALEWSKI, T.; KURZATKOWSKI, W. Quantitative expression of *Candida albicans* aspartyl proteinase genes SAP7, SAP8, SAP9, SAP10 in human serum in vitro. **Polish Journal of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 15–20, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25033657>>.

THEBERGE, S.; SEMLALI, A.; ALAMRI, A.; LEUNG, K. P.; ROUABHIA, M. C. *albicans* growth, transition, biofilm formation, and gene expression modulation by antimicrobial

decapeptide KSL-W. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 246, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24195531>>.

THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 9, p. 1173–82, 1 set. 2011. Disponível em: <<http://ec.asm.org/cgi/doi/10.1128/EC.05085-11>>.

VOLMER, A. A.; SZPILMAN, A. M.; CARREIRA, E. M. Synthesis and biological evaluation of amphotericin B derivatives. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 9, p. 1329–1349, 2010.