

ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DO PEPTÍDEO A_{42,44}R_{37,38}W_{36,39}γ₃₂₋₄₆VuDef
BIOINSPIRADO NO γ -CORE DAS DEFENSINAS DE PLANTAS SOBRE *Candida*
albicans

FILIFE ZANIRATTI DAMICA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO/2024

ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DO PEPTÍDEO A_{42,44}R_{37,38}W_{36,39}γ₃₂₋₄₆VuDef
BIOINSPIRADO NO γ -CORE DAS DEFENSINAS DE PLANTAS SOBRE *Candida*
albicans

FILIFE ZANIRATTI DAMICA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. André de Oliveira Carvalho

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos - LFBM no Centro de Biociências e Biotecnologia - CBB.

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
2024

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

D158 Damica, Filipe Zaniratti.

"ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DO PEPTÍDEO A_{42,44}R_{37,38}W_{36,39}Y₃₂₋₄₆VuDef
BIOINSPIRADO NO γ -CORE DAS DEFENSINAS DE PLANTAS SOBRE *Candida albicans*". / Filipe
Zaniratti Damica. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

130 f.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2024.

Orientador: André de Oliveira Carvalho.

1. peptídeos antimicrobianos. 2. defensinas de plantas. 3. mecanismo de ação. 4. morte
celular regulada. 5. desregulação iônica. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DO PEPTÍDEO A_{42,44}R_{37,38}W_{36,39}γ₃₂₋₄₆VuDef
BIOINSPIRADO NO γ-CORE DAS DEFENSINAS DE PLANTAS SOBRE *Candida albicans*

FILIPPE ZANIRATTI DAMICA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

APROVADO EM: ___/___/_____

Prof^a. Adriana Ferreira Uchoa

Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

Prof. Arnaldo Rocha Façanha

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

Prof. Sérgio Henrique Seabra

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

Prof. André de Oliveira Carvalho

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF (**orientador**)

DEDICO

A meus pais, Edmar e Noraney, a meus irmãos Leomar e Gabriely, a minha namorada Sabrina, a minha avó Cleuza (*in memoriam*) e a meu avô Adelino, meus avós Nelson e Tereza (*in memoriam*) e a meu orientador André por todo o apoio sempre.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus por interceder nos momentos mais difíceis e me dar saúde e sabedoria para continuar em busca desse sonho.

À minha mãe, por sempre me dar forças e me incentivar nos momentos em que eu mesmo cheguei a duvidar se conseguiria, suas palavras sempre me dão força para seguir em frente.

A meu pai, exemplo de perseverança e honradez, obrigado por todos os ensinamentos e incentivos e por me orientar em todas as dificuldades e decisões pelo caminho.

Ao Prof. André de Oliveira Carvalho, meu orientador, por toda a paciência e atenção dedicada, seus ensinamentos foram essenciais para que eu pudesse seguir em busca desse sonho, obrigado por toda a parceria e por acreditar em mim.

A meus irmãos Leomar e Gabriely, agradeço por tê-los em minha vida, obrigado por sempre estarem presentes nos momentos em que precisei e pelas palavras de carinho e incentivo.

À minha namorada Sabrina, obrigado por todo o amor e por saber me compreender e me incentivar a ir cada vez mais longe e principalmente por todo o apoio e confiança dedicado a mim.

Aos meus amigos Douglas e Júnior, obrigado por todo o incentivo e por toda a disposição para ajudar no que fosse preciso.

A um grande professor, Dr. Alexandre Horácio Couto Bittencourt que me encaminhou para o mundo das ciências no mestrado e doutorado. Obrigado por todo o apoio e amizade.

Aos membros da banca que aceitaram a participar da minha defesa.

A todos os professores e funcionários do PGBB pelo apoio e ensinamentos, em especial Dr^a. Anna Okorokova, Dr^a. Valdirene, Dr. Gabriel Bonan Taveira, Dr. Antônio Cogo, Dr. Luis Basso, Dr^a. Ana Eliza Zeraik com quem tive maior proximidade.

A todos amigos do grupo “VAL-ANDRÉ”, pelas dicas, amizade, e brincadeiras, em especial para Rodrigo Gebara por todos os ensinamentos, principalmente, no momento de seleção e no início da minha caminhada como membro do laboratório.

A todos os técnicos do LFBM pela manutenção e cuidado com o laboratório.

À UENF e ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, pela estrutura, pela concessão da bolsa, pelo apoio e pela oportunidade de realizar esse curso.

Aos pagadores de impostos brasileiros e ao governo que em 2002 plantou sonhos e abriu as portas da universidade para que pobres como eu tivessem aquilo que é mais importante: uma oportunidade! Obrigado ao Partido dos Trabalhadores, obrigado, Lula.

Ao CNPq, Capes e a Faperj, pelo apoio financeiro e a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica e na realização desse trabalho.

RESUMO

As doenças fúngicas estão em ascensão globalmente, resultando em 3,75 milhões de óbitos anuais. A escassez de antifúngicos disponíveis e a resistência a eles têm restringido as opções de tratamento para essas enfermidades. Portanto, há a necessidade de desenvolver novas substâncias antifúngicas com potencial terapêutico, e os peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) se destacam como uma alternativa promissora. Entretanto, a falta de compreensão completa do seu mecanismo de ação, bem como de seu desempenho *in vivo* é um desafio crucial em seu desenvolvimento farmacêutico, atrasando sua adoção clínica. O objetivo deste trabalho foi explorar o mecanismo de ação do peptídeo A_{42,44}R_{37,38}W₃₆₋₃₉γ₃₂₋₄₆VuDef (abreviado WR), que foi bioinspirado no γ -core da defensina de planta Vudef1, extraída de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (feijão-de-corda) sobre *Candida albicans*. Resultados prévios indicaram que WR causa a morte de *C. albicans* a 27,5 μ M (dose letal) e que leva 1 h para matar toda a população de células no ensaio de viabilidade. Estes parâmetros da dose letal e tempo de morte foram usados nos ensaios a seguir. Em um primeiro bloco, conduzimos testes para analisar o papel do estresse oxidativo e a funcionalidade mitocondrial na morte induzida em *C. albicans* por WR. Para isso foram conduzidos testes de viabilidade celular na presença dos antioxidantes ácido L-ascórbico, N-acetil-L-cisteína ou γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina, ensaios de microscopia de fluorescência com sonda para detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e funcionalidade mitocondrial e também foi medida a atividade de NAD desidrogenases em ensaio colorimétrico. Nossos resultados indicaram que a presença dos antioxidantes não salva as células de *C. albicans* da morte induzida por WR. Apesar disso, a análise microscópica demonstrou que WR provoca estresse oxidativo em *C. albicans*. A análise mitocondrial mostrou que as mitocondrias estavam com a membrana hiperpolarizada e a atividade das NAD desidrogenase estavam elevadas, permitindo uma correlação positiva entre a disfunção mitocondrial e ROS. Em conclusão, como *C. albicans* estava passando por estresse oxidativo e nenhuma proteção foi observada com os antioxidantes testados, sugere que, embora desempenhe um papel no processo de morte, ROS não seja o executor final da morte celular. Em um segundo bloco investigamos aspectos do tipo de morte celular provocada por WR em *C. albicans*. Para isso analisamos o envolvimento de metacaspases na morte de *C. albicans* induzida por WR por sondas específicas, a condensação de cromatina por DAPI e a diferenciação entre morte celular regulada (RCD, do inglês, *regulated cell death*) de morte celular acidental (ACD, do inglês, *accidental cell death*) com iodeto de propídeo (IP). Nossos resultados indicaram que não há o envolvimento de metacaspases na morte de *C. albicans* induzida por WR, há condensação de cromatina e sinal positivo para IP a partir de 15 min. Esta marcação de IP em 15 min já seria um tempo mais avançado dentro do intervalo temporal que as células de *C. albicans* levam para morrer e por isso indicam um processo de necrose tardia. Em conclusão, WR induz uma RCD independente de metacaspases em *C. albicans*. Adicionalmente, a marcação positiva para IP apontou que a membrana plasmática da levedura estava permeabilizada. Assim, em um terceiro bloco avaliamos a interação de WR com lipídeos e membranas por modelos de membranas através de dicroísmo circular (CD, do inglês *circular dichroism*) e a permeabilização de membranas com sonda fluorescente, lise de eritrócitos e extravasamento de material citoplasmático, interação com glicosilceramida (GlcCer) e ensaios de viabilidade na presença de osmoprotetores. Nossos resultados demonstraram que WR causa permeabilização da membrana plasmática nas células de *C. albicans*, mas não há o extravasamento de material citoplasmático, além disso, por CD WR demonstrou estar em uma configuração não estruturada em meio aquoso, condição que se manteve na presença dos sais usados para os ensaios com as vesículas e na presença de vesículas lipídicas POPC, POPC/POPE e na presença de ergosterol a 15 e 35%. Apesar disso, WR demonstrou mudar sua conformação na

presença de POPC/POPG e trifluoroetanol de não estruturado para α -hélice. A utilização da cepa mutante de *C. albicans* (Δ)GCS1, que não tem a enzima glicosil ceramida sintase e portanto, não expressa o esfingolípido GlcCer, demonstrou que este não interfere na morte celular induzida por WR *C. albicans*. Além disso, WR demonstrou causar fraclise em eritrócitos de ovelhas e o estresse osmótico demonstrou não impactar diretamente na morte de *C. albicans*, pois a presença de estabilizadores osmóticos não salvou as células da morte. Em conclusão, em conjunto estes resultados sugerem que a permeabilização de membrana é um efeito secundário do processo de morte das células de *C. albicans* induzido por WR. Adicionalmente, as análises microscópicas chamaram a atenção para o encolhimento celular das células de *C. albicans* na presença de WR. Em um quarto bloco, iniciamos a análise morfológica das células de *C. albicans* por microscopia óptica. Nosso resultado confirmou o encolhimento celular visualmente observado. Em fungos e em células de mamíferos o encolhimento celular é uma característica marcante de RCD, corroborando com os resultados do primeiro bloco. Adicionalmente, o efluxo de íons, especialmente do K^+ , é apontado como causa do encolhimento celular em fungos. Por esse motivo, examinamos o papel do K^+ na morte de *C. albicans* induzida por WR. Primeiro verificamos se na presença de K^+ não há perda da atividade antimicrobiana de WR como é amplamente relatado para AMPs. Assim, marcamos WR com o fluoróforo 5-FAM e verificamos sua interação com as células de *C. albicans* por microscopia confocal. 5-FAM_WR foi localizado no citoplasma de *C. albicans* após 20 min de interação. Então avaliamos se a presença de K^+ causaria alterações na interação de WR com a levedura, e inicialmente estudamos a estruturação de WR na presença de K^+ por CD. Os espectros de CD demonstraram que WR não muda sua conformação na presença de K^+ e WR continua a ser localizada no citoplasma das células de *C. albicans* na presença do íon. Estes dados indicam não haver interferência do íon na interação de WR com a levedura por bloqueio de cargas. Conduzimos então testes de viabilidade com inibidores de canais de K^+ e Cl^- , adicionando K^+ ao meio de cultura em diferentes tempos após a exposição a WR e analisamos o papel do pH em meio tamponado em 6,7 e sem glicose. Através de microscopia óptica e de fluorescência, analisamos o encolhimento celular e a indução de estresse oxidativo na presença de K^+ . A acidificação do meio extracelular e a permeabilização da membrana plasmática foram analisadas na presença de WR e K^+ . Nossos resultados demonstraram que não há envolvimento direto dos canais de K^+ e Cl^- , mas a adição extracelular de K^+ protege as células de *C. albicans* da morte induzida por WR. Observamos que na presença de K^+ o estresse oxidativo e encolhimento celular persistiram. O pH extracelular não influenciou a morte de *C. albicans* induzida por WR. Além disso, observamos que WR causou um rápido estímulo de acidificação do meio extracelular no primeiro minuto de interação, com uma inibição aproximadamente após 1 min, e esse estímulo não ocorreu na presença de K^+ . A permeabilização da membrana celular ocorreu desde o primeiro momento da interação com WR, explicando a falta de proteção dos bloqueadores de canais, a reversão parcial do encolhimento celular e a inibição da acidificação. A presença de K^+ demonstrou retardar os efeitos da permeabilização. Realizamos o teste de viabilidade em água, condição que faria a célula perder K^+ para o ambiente externo para regular seu volume, reduzindo a concentração citoplasmática do íon. Nessa condição as células morreram mais rapidamente indicando que a extrusão de K^+ , até uma concentração intracelular abaixo de um nível crítico possibilita a ativação da cascata de sinalização de RCD, como já demonstrado para células de mamíferos. Em conclusão, nossos resultados indicam que a proteção observada na presença de K^+ está relacionada à manutenção da concentração intracelular de K^+ , impedindo que a concentração interna atinja níveis críticos que ativem a cascata de sinalização reguladora da morte celular. Em última análise, essa preservação intracelular de K^+ evita o desencadeamento do processo de morte

celular que em *C. albicans* na presença de WR é RCD independente de metacaspases. É a primeira vez que esse processo foi relatado para fungos.

palavras-chave: peptídeos antimicrobianos, defensinas de plantas, mecanismo de ação, morte celular regulada, desregulação iônica.

ABSTRACT

Fungal diseases are increasingly prevalent globally, resulting in approximately 3.75 million deaths annually. The limited availability of effective antifungal agents and the emergence of resistance to existing treatments have severely constrained therapeutic options for these diseases. Consequently, there is a pressing need to develop novel antifungal compounds with therapeutic efficacy, with antimicrobial peptides (AMPs) emerging as a promising alternative. However, the incomplete understanding of their mechanisms of action and their *in vivo* performance pose significant challenges to their pharmaceutical development, thereby impeding their clinical adoption. The objective of this study was to investigate the mechanism of action of the peptide A_{42,44}R_{37,38}W₃₆₋₃₉Y₃₂₋₄₆VuDef (hereafter referred to as WR), which was bioinspired by the γ -core of the plant defensin VuDef1, derived from the seeds of *Vigna unguiculata* (L.) Walp (cowpea), against *Candida albicans*. Previous findings indicated that WR induces death in *C. albicans* at a lethal dose of 27.5 μ M, and it requires 1 h to eradicate the entire cell population in viability assays. These lethal dose and time-to-death parameters were utilized in subsequent investigations. In the initial phase, we conducted experiments to elucidate the involvement of oxidative stress and mitochondrial functionality in WR-induced death in *C. albicans*. To achieve this, cell viability assays were performed in the presence of antioxidants such as L-ascorbic acid, N-acetyl-L-cysteine, or γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine. Additionally, fluorescence microscopy assays employing a probe for the detection of reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial functionality, along with the measurement of NAD dehydrogenase activity in colorimetric tests, were conducted. Our findings revealed that the presence of antioxidants did not rescue *C. albicans* cells from WR-induced death. Nevertheless, microscopic analysis demonstrated that WR induces oxidative stress in *C. albicans*. Furthermore, mitochondrial analysis revealed hyperpolarization of the mitochondrial membrane and elevated NAD dehydrogenase activity, establishing a positive correlation between mitochondrial dysfunction and ROS production. In conclusion, despite the induction of oxidative stress in *C. albicans* by WR and the absence of protection with the antioxidants tested, suggesting a role in the death process, ROS may not be the primary executor of cell death. In the subsequent phase, we investigated aspects of the type of cell death triggered by WR in *C. albicans*. To investigate the role of metacaspases in WR-induced death of *C. albicans*, we employed specific probes to assess their involvement, characterized chromatin condensation using DAPI staining, and distinguished between regulated cell death (RCD) and accidental cell death (ACD) using propidium iodide (PI) staining. Our findings revealed that metacaspases are not implicated in the death of *C. albicans* induced by WR. However, chromatin condensation was observed, and a positive signal for PI staining was detected from 15 min onwards. This PI staining at 15 min indicates a more advanced stage within the timeframe during which *C. albicans* cells undergo death, suggesting a process of late necrosis. In conclusion, WR induces metacaspase-independent regulated cell death in *C. albicans*. Additionally, the positive PI staining indicated permeabilization of the yeast plasma membrane. Therefore, in a subsequent phase, we evaluated the interaction of WR with lipids and membranes using a membrane model approach employing circular dichroism (CD) and assessed membrane permeabilization using a fluorescent probe, erythrocyte lysis, and leakage of cytoplasmic material. Moreover, we investigated the interaction with glucosylceramide (GlcCer) and conducted viability tests in the presence of osmoprotectants. Our findings revealed that WR induces permeabilization of the plasma membrane in *C. albicans* cells, yet

there is no extrusion of cytoplasmic material. Moreover, CD analysis demonstrated that WR adopts an unstructured configuration in an aqueous medium, which conformation is maintained in the presence of salts used for vesicle experiments, as well as in the presence of POPC, POPC/POPE lipid vesicles, and varying concentrations of ergosterol (15% and 35%). However, WR exhibited conformational changes from unstructured to α -helical in the presence of POPC/POPG and trifluoroethanol. Utilizing a mutant strain of *C. albicans* lacking glycosyl ceramide synthase (Δ GCS1), which does not express the sphingolipid GlcCer, we observed no interference with WR-induced cell death in *C. albicans*. Furthermore, WR induced weak lysis in sheep erythrocytes, and osmotic stress did not directly influence *C. albicans* death, as the presence of osmotic stabilizers failed to rescue cells from death. In conclusion, these collective results suggest that membrane permeabilization is a secondary effect of WR-induced cell death in *C. albicans*. Additionally, microscopic analysis revealed cellular shrinkage of *C. albicans* cells in the presence of WR. In a subsequent phase, morphological analysis of *C. albicans* cells was initiated using optical microscopy, confirming the visually observed cell shrinkage. Notably, cell shrinkage is a prominent feature of Regulated Cell Death (RCD) in both fungi and mammalian cells, thus supporting the findings of the initial phase. Additionally, microscopic analyses drew attention to the cellular shrinkage of *C. albicans* cells in the presence of WR. In the fourth phase, we initiated morphological analysis of *C. albicans* cells using optical microscopy. Our results confirmed visually observed cell shrinkage. Cell shrinkage is a prominent feature of regulated cell death (RCD) in both fungi and mammalian cells, consistent with the findings of the first phase. Additionally, the efflux of ions, particularly K^+ , is implicated in cell shrinkage in fungi. Thus, we investigated the role of K^+ in WR-induced killing of *C. albicans*. Initially, we examined whether the presence of K^+ affected WR antimicrobial activity, as commonly reported for antimicrobial peptides (AMPs). Therefore, we labeled WR with the fluorophore 5-FAM and examined its interaction with *C. albicans* cells using confocal microscopy. After 20 min of interaction, 5-FAM_WR was localized in the cytoplasm of *C. albicans* cells. Subsequently, we investigated whether the presence of K^+ altered the interaction of WR with yeast cells. Initially, we studied the conformation of WR in the presence of K^+ using circular dichroism (CD). CD spectra demonstrated that the conformation of WR remained unchanged in the presence of K^+ , and WR continued to localize in the cytoplasm of *C. albicans* cells in the presence of the ion. These findings suggest that the ion does not interfere with the interaction of WR with yeast due to charge blocking. We then conducted viability tests with K^+ and Cl^- channel inhibitors, adding K^+ to the culture medium at different times after exposure to WR, and analyzed the role of pH in medium buffered at 6.7 and without glucose. Using optical and fluorescence microscopy with a fluorescent probe, we analyzed cell shrinkage and the induction of oxidative stress in the presence of K^+ . Acidification of the extracellular medium and permeabilization of the plasma membrane were analyzed in the presence of WR and K^+ . Our results demonstrated that K^+ and Cl^- channels are not directly involved, but extracellular addition of K^+ protects *C. albicans* cells from WR-induced death. We observed that in the presence of K^+ , oxidative stress and cell shrinkage persisted. Extracellular pH did not influence WR-induced death of *C. albicans*. Furthermore, WR caused rapid acidification of the extracellular environment within the first minute of interaction, followed by inhibition approximately after 1 min; this stimulus did not occur in the presence of K^+ . Permeabilization of the cell membrane occurred from the first moment of interaction with WR, explaining the lack of protection of the channel blockers, the partial reversal of cell shrinkage, and the inhibition of acidification. The presence of K^+ delayed the effects of permeabilization. We performed viability tests in water, a condition that would cause the cell to lose K^+ to the external environment to regulate its volume, thereby reducing the cytoplasmic concentration of the ion. In this condition, the cells died more quickly, indicating that the extrusion of K^+ , to

an intracellular concentration below a critical level, enables the activation of the RCD signaling cascade, as previously demonstrated in mammalian cells. In conclusion, our results indicate that the observed protection in the presence of K^+ is related to the maintenance of intracellular K^+ concentration, preventing it from reaching critical levels that activate the cell death regulatory signaling cascade. Ultimately, this intracellular preservation of K^+ prevents the initiation of the cell death process, which in *C. albicans* in the presence of WR is metacaspase-independent RCD. This process is reported for the first time in fungi.

Keywords: antimicrobial peptides, plant defensins, mechanism of action, regulated cell death, ionic dysregulation.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

- Figura 1 -** Representação esquemática das estruturas químicas das principais classes de fármacos antifúngicos. **pag.4**
- Figura 2 -** Visão geral das principais classes estruturais de peptídeos antimicrobianos, entre elas α -hélices, folhas β , cíclico, uma mistura de estruturas de α -hélices/folhas β e lineares. **pag.7**
- Figura 3 -** Representação esquemática de estruturas tridimensionais selecionadas de diferentes famílias de peptídeos antimicrobianos de plantas **pag. 9**
- Figura 4 -** Organização estrutural das cis-defensinas e trans-defensinas. **pag. 10**
- Figura 5 -** Representação esquemática das estruturas terciária e primária **pag. 12**
- Figura 6 -** Representação esquemática da estrutura terciária da defensina *Vu-Defr* de *Vigna unguiculata*. **pag. 13**
- Figura 7 -** Estruturas primárias de defensinas de plantas. **pag. 13**
- Figura 8 -** Mecanismo antimicrobiano de peptídeos antimicrobianos (AMPs). **pag. 14**
- Figura 9 -** Correlação ente o estresse oxidativo nas células de *C. albicans* induzido por WR e a morte da levedura. **pag. 36**
- Figura 10 -** Atividade antimicrobiana de WR na sua DL_{100} (27,5 μ M) e no tempo de morte (1 h) em uma densidade celular de 40.000 células/mL. **pag. 37**
- Figura 11 -** Estresse oxidativo das células de *Candida albicans* induzido por WR. **pag. 38**
- Figura 12 -** Funcionalidade mitocondrial em células de *Candida albicans* tratadas com WR. **pag. 40**
- Figura 13 -** Atividade antimicrobiana de WR na sua DL_{100} (27,5 μ M) e no tempo de morte (1 h) em uma densidade celular de 80.000 células/mL. **pag. 40**
- Figura 14 -** Determinação da atividade metabólica mitocondrial usando WST-1. **pag. 41**
- Figura 15 -** Análise da ativação de metacaspases em células de *Candida albicans* tratadas com WR. **pag. 42**
- Figura 16 -** Ensaio de viabilidade com *C. albicans* incubada com WR na **pag. 43**

presença do inibidor de pan-caspase Z-VAD-FMK.

- Figura 17** - Detecção de condensação de cromatina por coloração com DAPI **pag. 44**
- Figura 18** - Análise da morte celular accidental em células de *Candida albicans* tratadas com WR. (**pag. 45**)
- Figura 19** - Permeabilização da membrana plasmática em *Candida albicans* tratadas com WR. **pag. 46**
- Figura 20** - Teste de toxicidade de WR sobre *C. albicans* na concentração celular de 1.000.000 células/mL. **pag. 47**
- Figura 21** - Extravasamento de constituintes citoplasmáticos de células de *C. albicans* incubadas com WR. **pag. 49**
- Figura 22** - Espectros de dicroísmo circular (CD) no ultravioleta de WR em água e nos tampões fosfato de potássio a 200 mM, pH 5,6, fosfato de sódio a 200 mM, pH 5,6 e trifluoroetanol a 100% (TFE). **pag. 50**
- Figura 23** - Espectros de dicroísmo circular no ultravioleta de WR em POPC/POPG, em POPC/POPE e POPC **pag. 51**
- Figura 24** - Espectros de dicroísmo circular (CD) no ultravioleta de WR em membranas modelo contendo ergosterol. **pag. 51**
- Figura 25** - Análise da atividade de WR sobre a cepa mutante (Δ)GCS1 **pag. 53**
- Figura 26** - Atividade hemolítica de WR sobre eritrócitos de ovelhas **pag. 54**
- Figura 27** - Análise da atividade de WR sobre *C. albicans* na presença dos estabilizadores osmóticos. **pag. 55**
- Figura 28** - Alterações morfológicas e redução de tamanho nas células de *Candida albicans* tratadas WR. **pag. 56**
- Figura 29** - Comprimento dos eixos longitudinal e transversal das células de *C. albicans*. **pag. 57**
- Figura 30** - Atividade antimicrobiana de 5-FAM_WR na sua DL₁₀₀ e no tempo de morte (1 h) sobre *Candida albicans* (2.000 células/mL). **pag. 58**
- Figura 31** - Interação de 5-FAM_WR com células de *Candida albicans*. **pag. 59**
Imagens microscópicas de células de *C. albicans* incubadas na presença de 5-FAM_WR
- Figura 32** - Espectros de dicroísmo circular no ultravioleta do peptídeo WR em água e soluções de fosfato de potássio a 200 mM com pH 5,6 (K⁺) **pag. 60**
- Figura 33** - Interação de WR com o fluoróforo 5-FAM com células de *C. albicans*. **pag. 61**

	<i>albicans</i> na presença de K ⁺ .	61
Figura 34	Viabilidade de <i>Candida albicans</i> (<i>Ca</i>) incubadas com WR na presença dos inibidores de canais de K ⁺ TEA e 4-AP, e do canal de Cl ⁻ NPPB.	pag. 62
Figura 35	Viabilidade de <i>Candida albicans</i> incubadas com WR na presença de K ⁺ em diferentes momentos (pré-incubação, coincubação e pós-incubação) em relação à adição de WR.	pag. 66
Figura 36	Estresse oxidativo das células de <i>Candida albicans</i> induzido por WR.	pag. 67
Figura 37	Análise do encolhimento celular nas células <i>Candida albicans</i> tratadas com WR e na presença do íon K ⁺ .	pag. 69
Figura 38	Acidificação do meio externo em células <i>Candida albicans</i> estimuladas por glicose e na presença do peptídeo e WR e K ⁺ .	

TABELAS

Tabela 1 -	Estrutura primária e propriedades biofísicas dos peptídeos sintéticos baseados no γ -core da defensina <i>VuDef1</i> .	pag. 18
Tabela 2 -	Resumo dos efeitos biológicos do peptídeo sintético projetado WR sobre diferentes espécies de leveduras e células de mamíferos em comparação com a sequência original (DD).	pag. 19
Tabela 3 -	Análise de morte celular acidental em células de <i>Candida albicans</i> induzidas por WR em diferentes tempos.	pag. 45
Tabela 4 -	Influência de sais na morte de <i>C. albicans</i> induzida por WR na DL ₁₀₀ e tempo de morte. As leveduras foram pré-incubadas por 15 minutos na presença de sais de KCl, K ₂ HPO ₄ + K ₂ HPO ₄ , nas concentrações de 100 e 200 mM.	pag. 64
Tabela 5 -	Correlação entre pH e a morte de <i>C. albicans</i> induzida por WR na DL ₁₀₀ e no tempo de morte.	pag. 70
Tabela 6 -	Permeabilização da membrana plasmática em <i>C. albicans</i> tratadas com WR em diferentes tempos e na presença de K ⁺	pag. 72
Tabela 7 -	Atividade antimicrobiana de WR incubado com as células de <i>Candida albicans</i> em meio Sabouraud e em água.	pag. 73

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

4-AP	4-aminopiridina
AA	Ácido Ascórbico
AcA	Ácido Acético
AMPs	Peptídeos antimicrobianos (do inglês <i>antimicrobial peptides</i>)
CTE	Cadeia de transporte de elétrons
CoQ	Coenzima Q
D	Conformação dextrogira (D-enantiômeros)
dAMPs	Peptídeos antimicrobianos projetados (do inglês <i>designed AMPs</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DD	A _{36,42,44} γ ₃₂₋₄₆ VuDef, peptídeo sintético de 15 aminoácidos bioinspirado no γ -core da defensina de planta Vu-Def ₁
D-RR	D-A _{36,42,44} R _{37,38} γ ₃₂₋₄₆ VuDef, peptídeo sintético de 15 aminoácidos bioinspirado no γ -core da defensina de planta Vu-Def ₁
DL ₁₀₀	Dose letal que é definida como a quantidade do peptídeo em μ M administrada em uma única dose causa a morte de toda a população células do ensaio
DIC	Contraste interferencial diferencial (do inglês <i>differential interference contrast</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidade óptica
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FMN	Flavina mononucleotídeo (do inglês, FMN, <i>flavin mononucleotide</i>)
GlcCer	Glucosilceramida
GSH	γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina
H ₂ DCFDA	2', 7' diacetato diclorofluoresceína
LTPs	Proteínas transportadoras de lipídeos (do Inglês <i>lipid transfer proteins</i>)
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico
MIC ₁₀₀	Mínima concentração inibitória (do inglês <i>minimal inhibitory concentration</i>)
NAC	N-acetil-L-cisteína
NPPB	Ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoico
PBS	tampão fosfato salino (PBS, do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>)
IP	Iodeto de propídeo (PI, do inglês <i>propidium iodide</i>)
POPC	Lipídio 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfo-colina
POPE.	Lipídio 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina

POPG	Lipídio 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-rac-fosfoglicerol
POPS	Lipídio 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfo-L-serina
RET	Transporte reverso de elétrons (RET, do inglês <i>reverse electron transport</i>)
RCD	Morte celular regulada (do inglês, <i>regulated cell death</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i>)
RR	A _{36,42,44} R _{37,38} γ ₃₂₋₄₆ VuDef, peptídeo sintético de 15 aminoácidos bioinspirado no <i>γ-core</i> da defensina de planta Vu-Def ₁ .
TEA	Tetraetilamônio
UFC	Unidade formadora de colônias
UTI	Unidade de tratamento intensivo
WR	A _{42,44} R _{37,38} W ₃₆₋₃₉ γ ₃₂₋₄₆ Vu-Def, peptídeo sintético de 15 aminoácidos bioinspirado no <i>γ-core</i> da defensina de planta Vu-Def ₁ .
Δψ _m	Potencial transmembrana mitocondrial.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS	xv
SUMÁRIO.....	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais	1
1.2 <i>Candida</i> e candidíases.....	2
1.3 Peptídeos antimicrobianos.....	6
1.4 AMPs de Plantas.....	8
1.4.1 Defensinas de plantas	9
1.5 Peptídeos bioinspirados	16
1.6 Peptídeo A _{42,44} R _{37,38} W ₃₆₋₃₉ γ ₃₂₋₄₆ VuDef (WR)	18
2. OBJETIVO.....	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos específicos	21
2.2.1 Objetivos específicos do bloco 1 – Análise do papel do estresse oxidativo na morte induzida de <i>C. albicans</i> por WR.....	21
2.2.2 Objetivos específicos do bloco 2 – Análise do tipo de morte celular induzida em <i>C. albicans</i> por WR.....	21
2.2.3 Objetivos específicos do bloco 3 – Avaliar a interação de WR com lipídeos e membranas	21
2.2.4 Objetivos específicos do bloco 4 – Investigar a interação de WR com as células de <i>C. albicans</i> e o papel do íon K ⁺ na morte induzida da levedura por WR.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Bloco 1 – Análise do papel do estresse oxidativo na morte de <i>C. albicans</i> por WR	23
3.1.1 Material biológico	23
3.1.2 Ensaio de inibição do crescimento	23
3.1.3 Padronização do número de células para ensaios ópticos de microscopia	24
3.1.4 Análise da produção endógena de ROS	25
3.1.5 Análise da funcionalidade mitocondrial.....	26
3.2 Bloco 2 - Análise do tipo de morte celular induzida em <i>C. albicans</i> por WR	26
3.2.1 Análise do envolvimento de metacaspases na morte de <i>C. albicans</i>	26
3.2.2 Análise do envolvimento de metacaspases na morte de <i>C. albicans</i> induzida por WR pelo inibidor de pan-caspases Z-VAD-FMK.....	27

3.2.3	Análise da condensação de cromatina em <i>C. albicans</i> induzida por WR	27
3.2.4	Análise da morte celular accidental.....	28
3.3	bloco 3 – Avaliação da interação de WR com lipídeos e membranas.....	28
3.3.1	Análise de permeabilização da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> induzida por WR	28
3.3.2	Ensaio antimicrobiano com 1.000.000 células/mL	28
3.3.3	Extravasamento de substâncias citoplasmáticas que absorvem luz ultravioleta	29
3.3.4	Análise da interação de WR com lipídios de membrana de <i>C. albicans</i>	29
3.3.5	Interação de WR com glucosilceramida.....	30
3.3.6	Análise da atividade hemolítica de WR	30
3.3.7	Análise da importância da permeabilização na morte de <i>C. albicans</i> induzida por WR	31
3.4	Bloco 4 – Investigação da interação de WR com as células de <i>C. albicans</i> e o papel do íon K ⁺ na morte induzida	31
3.4.1	Análise morfológica de células de <i>C. albicans</i> incubadas com WR por microscopia óptica.....	31
3.4.2	Determinação do efeito tóxico de 5-FAM_WR com células de <i>C. albicans</i>	32
3.4.3	Análise da interação de 5-FAM_WR com as células de <i>C. albicans</i>	32
3.4.4	Análise da estrutura de WR por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) em água e na presença de K ⁺	32
3.4.5	Determinação da interação de 5-FAM_WR com células de <i>C. albicans</i> na presença de K ⁺	33
3.4.6	Análise dos canais de K ⁺ e Cl ⁻ na morte celular de <i>C. albicans</i> induzida por WR	33
3.4.7	Análise do papel do K ⁺ na morte celular induzida por WR	33
3.4.8	Análise da produção de espécies reativas de oxigênio endógenas (ROS) na presença de K ⁺	34
3.4.9	Análise das alterações morfológicas no tempo inicial e na presença de K ⁺	34
3.4.10	Análise da influência do pH na modulação da morte induzida por WR	34
3.4.11	Avaliação da acidificação do meio extracelular induzida pela glicose	35
3.4.12	Análise de permeabilização da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> em tempos iniciais e na presença de K ⁺	35
3.4.13	Análise do tempo de morte do <i>C. albicans</i> em água	35
4.	RESULTADOS.....	37
4.1	Bloco 1: Análise do papel do estresse oxidativo na morte induzida de <i>C. albicans</i> por WR	37
4.1.1	Análise do papel do estresse oxidativo por antioxidantes	37
4.1.2	Padronização do número de células para ensaios de microscopia.....	39
4.1.3	Análise da produção endógena de ROS	39
4.1.4	Análise da funcionalidade mitocondrial na morte celular	41

4.2	Bloco 2: Análise do tipo de morte celular induzida em <i>C. albicans</i> por WR.....	43
4.2.1	Análise do envolvimento de metacaspases na morte celular (FITC-VAD-FMK)	44
4.2.2	Análise do envolvimento de metacaspases na morte de <i>C. albicans</i> induzida por WR pelo inibidor de pan-caspases Z-VAD-FMK.....	44
4.2.3	Análise da condensação de cromatina na morte induzida por WR	45
4.2.4	Análise da morte celular acidental.....	46
4.3	Bloco 3: Análise da interação de WR com lipídeos e membranas	48
4.3.1	Análise da permeabilização da membrana de células de <i>C. albicans</i> induzida por WR	48
4.3.2	Ensaio antimicrobiano com 1.000.000 células/mL	49
4.3.3	Análise do extravasamento de substâncias citoplasmáticas induzido por WR ..	50
4.3.4	Análise da interação de WR com lipídios de membrana de <i>C. albicans</i>	51
4.3.5	Cepa mutante <i>Candida albicans</i> (Δ)GCS1	54
4.3.6	Análise da atividade hemolítica de WR	55
4.3.7	Análise da importância da permeabilização na morte de <i>C. albicans</i> induzida por WR	56
4.4	Bloco 4: Investigação da interação de WR com as células de <i>C. albicans</i>	57
4.4.1	Análise morfológica de células de <i>C. albicans</i> incubadas com WR por microscopia óptica.....	57
4.4.2	Determinação do efeito tóxico de 5-FAM_WR com células de <i>C. albicans</i>	60
4.4.3	Análise da interação de 5-FAM_WR com as células de <i>C. albicans</i>	61
4.4.4	Análise da estrutura de WR por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) em água e na presença de K^+	62
4.4.5	Determinação da interação de 5-FAM_WR com células de <i>C. albicans</i> na presença de K^+	62
4.4.6	Análise dos canais de K^+ e Cl^- na morte celular induzida por WR	63
4.4.7	Análise do papel do K^+ na morte celular induzida por WR	64
4.4.8	Análise da produção de espécies reativas de oxigênio endógenas (ROS) na presença de K^+	68
4.4.9	Análise das alterações morfológicas no tempo inicial e na presença de K^+	69
4.4.10	Análise da influência do pH na modulação da morte induzida por WR	71
4.4.11	Avaliação da acidificação do meio extracelular induzida pela glicose	72
4.4.12	Análise de permeabilização da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> em tempos iniciais e na presença de K^+	73
4.4.13	Análise do tempo de morte da <i>C. albicans</i> induzido por WR em água.....	75
5.	DISCUSSÃO.....	76
5.1	Bloco 1: Análise do papel do estresse oxidativo na morte induzida de <i>C. albicans</i> por WR	76
5.2	Bloco 2: Análise do tipo de morte de <i>C. albicans</i> induzida por WR.....	82

5.3	Bloco 3: Interação de WR com lipídeos e membranas	84
5.4	Bloco 4: Interação de WR com as células de <i>C. albicans</i>	87
6.	CONCLUSÃO	96
7.	REFERÊNCIAS	98

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

As doenças causadas por fungos representam um desafio crescente que impacta tanto a saúde humana quanto o meio ambiente (Strange et al., 2005; Fisher et al., 2022;). Neste último, essas doenças foram associadas à significativa diminuição das populações de morcegos (Lorch et al., 2011) e anfíbios (Fisher e Garner, 2020) selvagens, acarretando sérias implicações ecológicas (Boyles et al., 2011; Colón-Gaud et al., 2009). No setor agrícola, as complicações causadas por fungos também são graves, colocando em risco a segurança alimentar (Fisher et al., 2018). Essa situação é especialmente inquietante considerando as projeções para os próximos 20 a 30 anos indicam um substancial aumento na população global, alcançando aproximadamente 9,8 bilhões de habitantes até 2050 (FAO, 2017). Essa expansão populacional exercerá uma pressão adicional sobre a produção mundial de alimentos, e qualquer falha no processo produtivo resultará em consequências sérias para a saúde humana, a segurança alimentar e a economia de nações cujo produto interno bruto está intrinsecamente ligado ao agronegócio (FAO, 2017).

Em relação a saúde humana, dados recentes indicam que infecções fúngicas, abrangendo desde casos superficiais até manifestações sistêmicas frequentemente fatais e subestimadas, têm registrado um aumento global. Entre essas infecções, destacam-se a ceratite fúngica, micoses cutâneas e enfermidades do trato respiratório originadas por esporos fúngicos (Fisher et al., 2018; Ashraf et al., 2020; Rodrigues e Nosanchuk, 2020). Ao longo das últimas décadas, impulsionado e exacerbado pelo crescimento da população suscetível, particularmente entre idosos e indivíduos imunocomprometidos, observa-se um aumento na incidência de doenças fúngicas, sendo reconhecido como um sério problema de saúde pública (Banerjee et al., 2021; Seagle et al., 2021; Spallone e Schwartz, 2021; OMS, 2022). Estas micoses afetam anualmente mais de 1 bilhão de pessoas, se forem consideradas infecções cutâneas, o que coloca micoses cutâneas entre as doenças mais comuns do mundo (Bongomin et al., 2017; Ashraf et al., 2020; Rodrigues e Nosanchuk, 2020; Banerjee et al., 2021). Estudos recentes estimam que um total de 6,55 milhões de pessoas sofram de uma infecção fúngica grave a cada ano e causam a morte de aproximadamente 3,75 milhões de pessoas por ano, o que representa cerca de seis vezes mais mortes provocadas pela malária e quase três vezes mais mortes que a tuberculose (Denning et al., 2024). Dentre estas mortes, 2,55 milhões de mortes foram causadas diretamente por infecções fúngicas, o que representa cerca de 68% da estimativa de mortes, e, os demais 32%, cerca de 1,2 milhões de mortes tiveram outras doenças adjacentes (Denning et al., 2024). Esse cenário tem outro fator complicador, o

número de pacientes idosos, ou pacientes submetidos a intervenções médicas ou vivendo com infecções pelo vírus da imunodeficiência humana e *Mycobacterium tuberculosis*, bem como o número de pacientes imunocomprometidos devido ao tratamento de câncer ou receptores de transplante vem aumentando rapidamente e todos esses pacientes, devido às suas condições médicas, são mais suscetíveis a infecções fúngicas (Ashraf et al., 2020; Rodrigues e Nosanchuk, 2020). Além do aumento do número de casos de infecções fúngicas, há também o relato de *Candida* (Pristov e Ghannoum, 2019) e *Aspergillus* (Garcia-Rubio et al., 2017) resistentes aos tratamentos clínicos, agravando o cenário.

Ainda sobre fungos patogênicos humanos, em 2009 houve a primeira descrição da levedura *Candida auris*, uma espécie emergente que chamou a atenção por ser multirresistente aos antifúngicos clínicos (Forsberg et al., 2019). Em um estudo com quatro países, Paquistão, Índia, África do Sul e Venezuela, e em um total de 54 pacientes infectados com *C. auris*, 93% dos 54 isolados foram relatados como resistentes ao fluconazol, 35% a anfotericina B e 7% as echinocandinas. O mais preocupante é que, dos 54 isolados, 41% eram resistentes a duas classes de antifúngicos e 4% eram resistentes a três classes (Lockhart et al., 2016). Além da resistência múltipla, essa espécie emergente é persistente no ambiente hospitalar, pois resiste aos protocolos de desinfecção e é facilmente propagada entre os pacientes, tornando-se uma grave ameaça à saúde (Forsberg et al., 2019).

Buscando fortalecer a resposta global a infecções fúngicas e resistência antifúngica a *World Health Organization* (WHO) em 2022 emitiu o *Fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action* que é o primeiro esforço global para priorizar sistematicamente patógenos fúngicos. O relatório apresenta categorias e classifica quatro fungos como grupo de prioridade crítica dentre estes estão *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* e duas espécies do gênero *Candida*, *C. albicans* e a emergente *C. auris* (WHO, 2022).

1.2 *Candida* e candidíases

As leveduras do gênero *Candida* são normalmente parte da microflora humana, sendo consideradas comensais e cuja proliferação é regulada pelo sistema imunológico do hospedeiro (Tsui et al., 2016). No entanto, em situações de supressão imunológica ou outras perturbações fisiológicas, essas leveduras podem se tornar patógenos oportunistas capazes de formar biofilmes e causar uma variedade de infecções. Levy (2004) destaca que quando se tornam patogênicas, essas leveduras podem provocar infecções localizadas, como na cavidade oral e na pele, ou sistêmicas, como inflamações, septicemias e meningites, com a espécie *C.*

albicans sendo a principal responsável por essas infecções. As espécies mais importantes do ponto de vista clínico e epidemiológico são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, de acordo com Abi-Said et al. (1997).

As leveduras do gênero *Candida* podem ou não causar patogenias em seres humanos, e, caso haja, as espécies pertencentes a este gênero podem produzir infecções localizadas ou sistêmicas, como a candidíase, a meningite e septicemias, causadas pelo patógeno *C. albicans*. Além disso, ainda podem originar candidíase invasiva, como infecções derivadas do sangue e dos tecidos profundos, em indivíduos hospitalizados em tratamento para várias condições (Dadar et al., 2018). Dentre as leveduras patogênicas, a espécie *Candida parapsilosis* é a segunda mais comum isolada de infecções da corrente sanguínea em diferentes contextos clínicos em todo o mundo, especialmente na América Latina e Ásia (Diekema et al., 2009; Lockhart et al., 2012).

As infecções fúngicas causadas por espécies do gênero *Candida* têm aumentado em várias partes do mundo nos últimos anos e representam um risco significativo para pacientes imunocomprometidos, bem como aqueles que passaram por procedimentos clínicos invasivos ou que precisam de estadias prolongadas em unidades de tratamento intensivo (UTI) (Fisher et al., 2018; Fu et al., 2017; De Francesco et al., 2017; Doi et al., 2016; Tukenmez et al., 2017). Segundo Fu et al. (2017), a candidemia é a quinta causa mais comum de infecção da corrente sanguínea em pacientes em UTI e a terceira em UTIs neonatais, com uma taxa de mortalidade que varia entre 20-34%. Essas infecções fúngicas representam uma importante fonte de morbidade, mortalidade e altos custos associados aos cuidados em UTI em todo o mundo (Fu et al., 2017; Tukenmez et al., 2017).

Anualmente, cerca de 1.565.000 pessoas têm infecção sanguínea por *Candida* ou candidíase invasiva a cada ano, com 995.000 mortes, o que representa 63,6% de mortalidade (Denning et al., 2024). Infelizmente, o acelerado surgimento de resistência antifúngica, muitas vezes torna a terapia ineficaz (De Samblanx, 2016, Fisher et al. 2018.), especialmente no caso de doenças fúngicas. Além disso, o mundo tem assistido o surgimento de novas leveduras patogênicas, como é o caso da *C. auris*, um patógeno multirresistente que tem causado infecções em várias partes do mundo (Forsberg et al., 2018). No Brasil, o primeiro caso de *C. auris* foi confirmado em 2020, segundo o Ministério da Saúde¹. Estes fatos tornam o problema mais grave e mais urgente para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos.

1 https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/identificacao-de-possivel-caso-de-candida-auris-no-brasil/ALERTA012020CANDIDAAURIS07.12.2020_2.pdf

Os fármacos antifúngicos mais comumente utilizadas no tratamento de doenças fúngicas são os azóis, como o fluconazol, os polienos, como a anfotericina B, e as equinocandinas, como a caspofungina (Fig. 1) (Robbins et al., 2017). As classes de medicamentos usadas para o tratamento de doenças fúngicas agem de maneira distinta, possuindo mecanismos de ação específicos. Os polienos, por exemplo, apresentam um espectro de atividade fungicida e se ligam ao ergosterol presente na membrana fúngica. Ao se inserirem nas bicamadas lipídicas, criam poros que rompem a membrana plasmática, causando danos oxidativos (Costa-de-Oliveira e Rodrigues, 2020). As equinocandinas atuam como inibidores da β -(1,3) glucano-sintase, o que leva à redução na produção do β -(1,3) glucano, um dos principais componentes da parede celular do fungo (Denning e Hope, 2010). Em contrapartida, os azóis apresentam efeito fungistático, atuando como inibidores da 14α -lanosterol-demetilase do citocromo P450 fúngico e levando ao acúmulo de intermediários metilados tóxico, esse acúmulo interrompe a função da membrana da célula fúngica e inibe seu crescimento (Robbins et al., 2017).

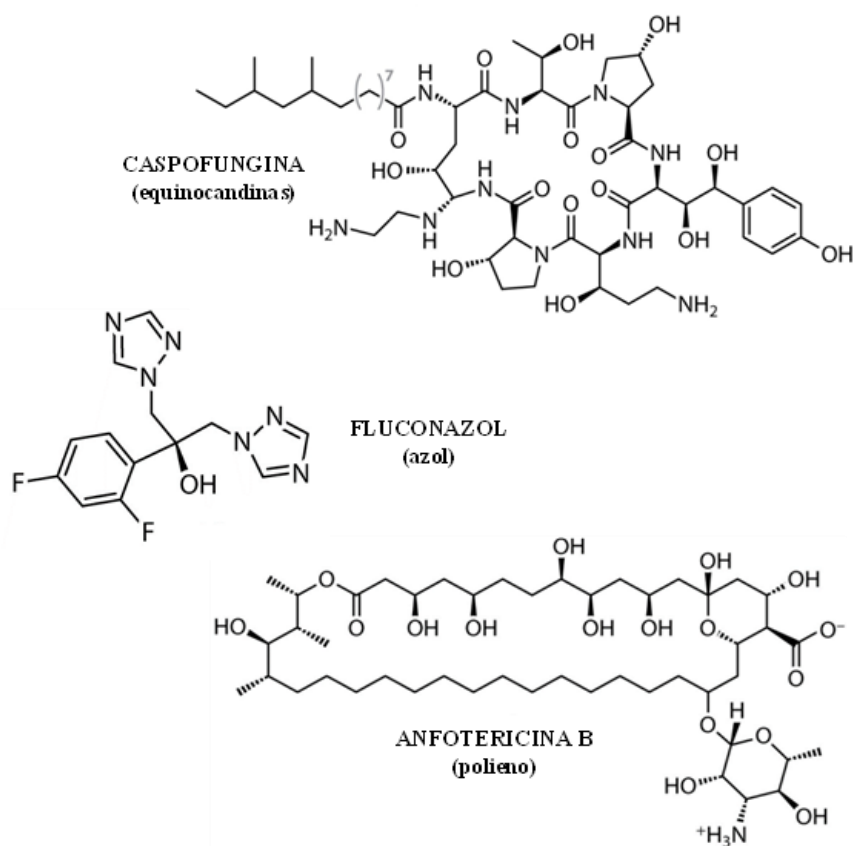


Figura 1: Representação esquemática das estruturas químicas das principais classes de fármacos antifúngicos usados para o tratamento de doenças fúngicas (Adaptado de Robbins et al. (2017), com modificações).

Ainda que as substâncias mencionadas anteriormente existam, o surgimento cada vez maior de fungos patogênicos que resistem aos poucos agentes antifúngicos normalmente utilizados é algo sem precedentes, conforme apontado por De Francesco et al. (2017).

Nesse contexto, há diversos mecanismos que podem contribuir para a tolerância e para a resistência antifúngica, como a formação de biofilmes que dificultam o acesso do antifúngico, a seleção de mutações espontâneas que aumentam a expressão ou diminuem a suscetibilidade do alvo, alterações cromossômicas anormais, superexpressão de bombas de efluxo de múltiplas drogas e a habilidade de escapar das defesas imunológicas do hospedeiro (Costa-De-Oliveira e Rodrigues, 2020).

De Francesco et al. (2017) alertam para a elevada resistência observada aos antifúngicos mais frequentemente utilizados de forma sistemática e local, como os azóis, incluindo o aumento da resistência ao fluconazol. Vários estudos diferentes demonstraram que a taxa de resistência ao fluconazol varia de 2,5% a 9% em *Candida* spp. isoladas do sangue (De Francesco et al., 2017). Além disso, destaca-se também o surgimento de outras leveduras patogênicas resistentes a múltiplas drogas, como *C. auris*, causadora de infecções graves por todo mundo (Forsberg et al., 2019).

Outra grande preocupação da comunidade científica é o mundo pós-pandemia da COVID-19. Em primeiro lugar, porque foi relatada que a coinfeção do SARS-COV2 com outros patógenos, incluindo fungos, aumenta a dificuldade de diagnóstico, tratamento e prognóstico da COVID-19, além de aumentar os sintomas e a mortalidade da doença (Goel et al., 2021; Hoque et al., 2021; Martins et al., 2021). A comunidade científica havia alertado para uma era pós-COVID-19 com flagrante aumento de microrganismos resistentes a antibióticos, devido ao uso dessas substâncias, tanto como desinfetantes quanto tratamento profilático em pacientes, e até mesmo naqueles pacientes com suspeita de COVID-19 (Rezasoltani et al., 2020; Ansari et al., 2021; Knight et al., 2021; Rusic et al., 2021).

O número de antifúngicos atualmente disponíveis clinicamente para tratar doenças fúngicas é limitado quando comparado com substâncias utilizadas para tratar doenças causadas por bactérias (Sanglard et al., 2016; Forsberg et al., 2019; Costa-de-oliveira e Rodrigues, 2020).

Adicionalmente, há relatos de fungos resistentes a estes antifúngicos, limitando as opções de tratamento e deixando este problema mais sério (WHO, 2022). Para enfrentar esse problema global e evitar falhas em protocolos de tratamentos, é necessário conscientizar as pessoas sobre o uso adequado de produtos antimicrobianos e antifúngicos, incentivar a

descoberta de novas substâncias antifúngicas e promover o desenvolvimento de tecnologias inovadoras para buscar novas soluções (Fisher et al., 2018).

Diante desse cenário, é crucial a descoberta de novos antifúngicos ou moléculas com potencial para inibir o crescimento de patógenos fúngicos resistentes (Lei et al., 2019). Nesse sentido, os peptídeos antimicrobianos têm chamado cada vez mais a atenção dos cientistas em pesquisas relacionadas a essa área, podem ser uma alternativa promissora como possíveis novas substâncias terapêuticas (Morreta et al., 2021; Li et al., 2022).

1.3 Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) são codificados por genes, sintetizados nos ribossomos e compostos por L-aminoácidos. Eles possuem configurações lineares ou cíclicas, geralmente com menos de 100 resíduos de aminoácidos, e exibem uma grande variação em sequência, estrutura e conformação. São ricos em resíduos de cisteína, o que permite a formação de pontes dissulfeto, que lhes conferem maior estabilidade, resistência a degradações em altas temperaturas, extremos de pH e ações proteolíticas (Silva e Machado, 2012; Hegedus e Marx, 2013; Roscia et al., 2013). Eles são produzidos ou induzidos em resposta à percepção de um ataque patógeno em metazoários, onde fazem parte da resposta imune inata, e em microrganismos são produzidos para evitar ou eliminar concorrentes (Moretta et al., 2021). Além disso, é importante ressaltar que geralmente essas moléculas apresentam baixa ou nenhuma toxicidade para células de animais, conforme apontado por estudos anteriores (Hoskin e Ramamoorthy, 2008; Izadpanah e Gallo, 2005).

Essas moléculas de AMPs apresentam uma estrutura tridimensional altamente variável, incluindo diferentes arranjos como:

- I. α -hélices: Exemplificadas por magainina (AMP presente na pele do sapo *Xenopus laevis*), cecropina (AMP encontrado na hemolinfa de insetos) e catelicidina (AMPs presentes em mamíferos).
- II. Folhas β : Representadas por α -defensina 1 em humanos.
- III. Combinação de α -hélices e folhas β : Como observado em β -defensina 1 em humanos e defensinas de plantas.
- IV. Configuração cíclica: Encontrada em ciclotídeos de plantas como a Kalata 12.
- V. Estrutura linear ou de *loops* flexíveis: Exemplificada pelas indolicidinas (AMPs presentes em neutrófilos bovinos).

Essa diversidade de estruturas (Fig. 2) é uma das razões pelas quais os AMPs são tão eficazes no combate a microrganismos patogênicos, pois lhes proporciona uma ampla gama de ações antimicrobianas (Silva et al., 2011).

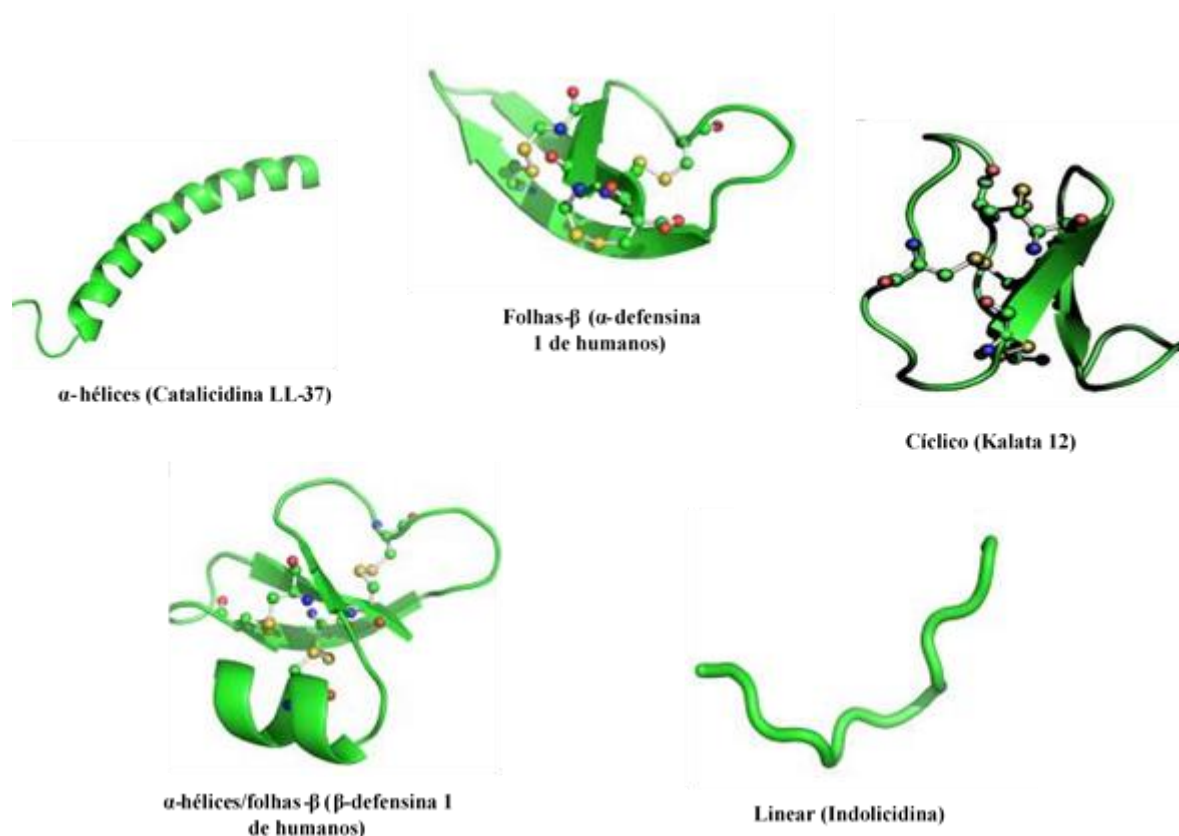


Figura 2: Visão geral das principais classes estruturais de peptídeos antimicrobianos, entre elas α -hélices, folhas β , cíclico, uma mistura de estruturas de α -hélices/folhas β e lineares. As pontes dissulfeto, nos AMPs que as possuem, são representadas pelas bolas interligadas. Entre parênteses é apresentado o nome do AMP (Adaptada de Silva et al. (2011), com modificações).

A maioria dos AMPs são moléculas catiônicas, e isso se deve à presença de aminoácidos com carga positiva, como argininas e lisinas, que são responsáveis por conferir essa característica aos AMPs em pH fisiológico. Essa carga positiva é uma das razões pelas quais os AMPs têm a capacidade de interagir com as membranas dos microrganismos, permitindo que exerçam sua atividade antimicrobiana. Outra característica importante em grande parte dos AMPs é a presença de um grande número de resíduos de cisteínas (em geral, 4, 6 ou 8), que se conectam aos pares formando pontes dissulfeto, as quais conferem a estes peptídeos uma alta estabilidade a condições físico-químicas extremas (Broekaert et al., 1997; Benko-Iseppon et al., 2010; Shabir et al., 2018).

Os AMPs demonstram forte atividade antimicrobiana, antifúngica e antitumoral. Além disso, atuam como moléculas de sinalização (imunomodulação), o que os torna promissores

para aplicações profiláticas e terapêuticas. Sua versatilidade os torna alvos promissores para o desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos e antifúngicos (Giuliani et al., 2007; Pushpanathan et al., 2013). Frente a essa situação, a busca por moléculas naturais dotadas de atividade antimicrobiana tem experimentado um aumento notável em várias fontes, como microrganismos, plantas, vertebrados, invertebrados, entre outros. Os AMPs previamente identificados constituem objetos de investigação, visando a avaliação de seu potencial terapêutico (Bowdish et al., 2005; Carvalho et al., 2011; Roscia et al., 2013; Silva e Diamond, 2014). Em especial, AMPs de plantas, são uma classe promissora e apresentam diversos mecanismos para sua atividade antifúngica incluindo interações com lipídios específicos, indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e indução de estresse na parede celular (Parisi et al., 2019) apresentando baixa toxicidade para o hospedeiro (Tavares et al., 2008; Ishaq et al., 2019).

1.4 AMPs de Plantas

As plantas são organismos sésseis e, devido a essa característica, não têm a capacidade de fugir ou se mover para evitar agressões abióticas quanto bióticas, diante disso, desenvolveram diversos mecanismos de defesa para protegerem-se contra patógenos e situações de estresse (Gachomo et al., 2003, 2010). Neste cenário, as plantas possuem uma variedade de compostos com atividades antimicrobianas e os AMPs se destacam como importantes mecanismos de defesa contra invasões de patógenos e respostas a estresses ambientais podendo ser explorados no tratamento de infecções causadas por microrganismos (Thevissen et al., 2004; Maróti et al., 2011). Desde sua descoberta, os AMPs de plantas têm sido alvo de investigação, e muitas características dessa família de peptídeos já são amplamente conhecidas (Salas et al., 2015).

Os AMPs de plantas são peptídeos que apresentam atividade antimicrobiana e podem ser encontrados em diversas espécies, em geral os AMPs de plantas são estruturalmente e funcionalmente similares e compartilham características descritas no item **1.3** (Srivastava, 2021).

Os principais AMPs de plantas foram agrupados em famílias com base em suas semelhanças, principalmente na estrutura primária (Fig. 3). Essas famílias incluem as proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs, do inglês *lipid transfer proteins*), tioninas, ciclotídeos, knotinas, snakinas, peptídeos similares à heveína e as defensinas de plantas (Nawrot et al., 2014; Salas et al., 2015).

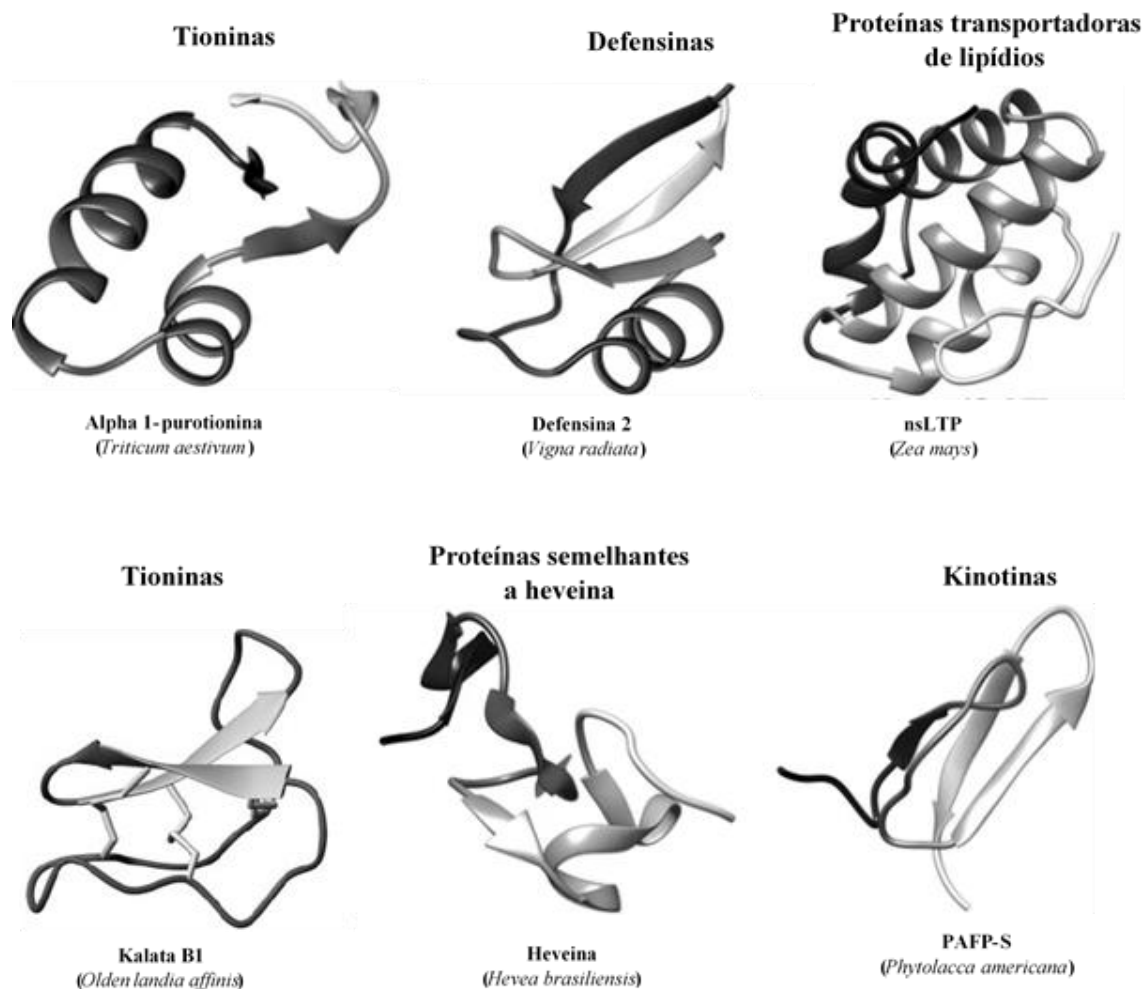


Figura 3: Representação esquemática de estruturas tridimensionais selecionadas de diferentes famílias de peptídeos antimicrobianos de plantas. Chamamos a atenção para as defensinas com uma α -hélice e três folhas- β antiparalelas; (Adaptada de NAWROT et al. (2014); SIMONSEN et al. (2008), com modificações).

Assim, devido a ampla atividade antimicrobiana apresentada por estas moléculas, onde é reportado a inibição de diversos microrganismos eles são cotados como possíveis novas substâncias terapêuticas para o tratamento de doenças infecciosas. Chamamos atenção para as defensinas de plantas, foco desse trabalho.

1.4.1 Defensinas de plantas

As defensinas de plantas foram descobertas há mais de duas décadas, e desde então elas foram intensamente estudadas, por isso, muitas características desta família de peptídeos são bem conhecidas (Salas et al., 2015).

Os primeiros membros da família das defensinas de plantas foram isolados de grãos de trigo e cevada e originalmente receberam o nome de γ -tioninas devido ao fato de

apresentarem o mesmo número de pontes dissulfeto e o tamanho similar com as tioninas (5 kDa), uma família de AMPs de plantas previamente caracterizada (Colilla et al., 1990; Broekaert et al., 1995). Apesar da similaridade inicial com a família das tioninas, estudos posteriores revelaram que as defensinas de plantas diferem no padrão de formação de pontes dissulfeto, espaçamento dos resíduos de cisteínas e estrutura tridimensional, mostrando maior semelhança com as defensinas de insetos e mamíferos, levando à sua renomeação (Terras et al., 1995). Com avanço dos estudos, especialmente na estrutura secundária e nas pontes dissulfeto, foram identificadas duas superfamílias distintas de defensinas: as *trans*-defensinas, que incluem defensinas de mamíferos e vertebrados em geral, e as *cis*-defensinas, presentes em invertebrados, fungos e plantas (Fig. 4). A similaridade entre as *trans*-defensinas e as *cis*-defensinas é considerada um caso extremo de evolução convergente (Parisi et al., 2019; Shafee et al., 2016, 2017).

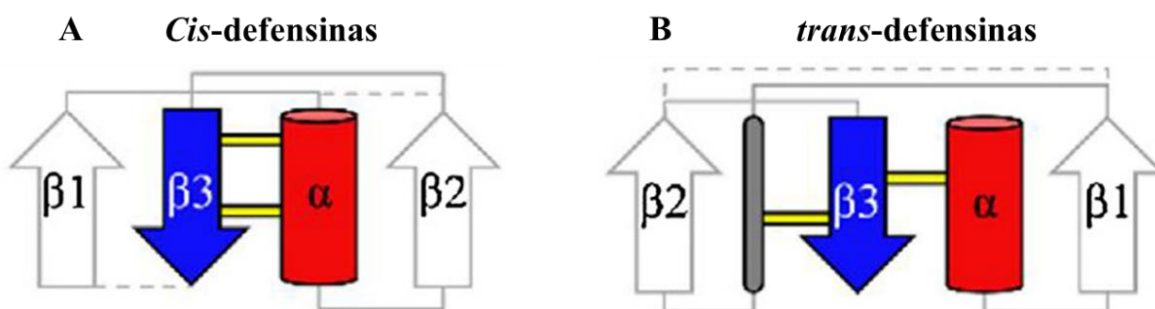


Figura 4: Organização estrutural das *cis*-defensinas e *trans*-defensinas. (A) As pontes dissulfeto mais conservadas da superfamília *cis*-defensinas (em amarelo) apontam o mesmo sentido. (B) As pontes dissulfetos mais conservados da superfamília *trans*-defensinas (em amarelo) tem orientações diferentes. (α) α -hélice; ($\beta 1$) folha $\beta 1$; ($\beta 2$) folha $\beta 2$; ($\beta 3$) folha $\beta 3$. As ligações dissulfeto não conservadas são mostradas como linhas tracejadas (Adaptado de Parisi et al. (2019), com modificações).

Nas *cis*-defensinas, as pontes dissulfeto são organizadas no mesmo sentido, onde um par de cisteínas presente na folha $\beta 3$ interage com outro par de cisteínas presente na α -hélice, formando um arranjo estrutural conservado (Fig. 4A) (Shafee et al., 2016). O padrão nas *cis*-defensinas difere das *trans*-defensinas, pois uma das cisteínas do par na folha $\beta 3$ interage com uma cisteína da α -hélice, enquanto a outra interage com uma cisteína na região de volta (Fig. 4B) (Parisi et al., 2019).

As defensinas de plantas são bem caracterizadas e apresentam ampla variação em sua estrutura primária, mas mantém conservada sua estrutura terciária (Carvalho e Gomes, 2011), em geral apresentam entre 45 a 54 resíduos de aminoácidos e apresentam oito cisteínas que formam quatro pontes dissulfeto. Estas pontes contribuem para a formação de uma estrutura

globular estável constituída de três fitas- β antiparalelas e uma α -hélice (Carvalho e Gomes, 2009) (Fig. 5A).

De acordo com o estudo de Shafee et al. (2016), o alinhamento de 1.292 sequências de defensinas já descritas mostrou que apenas os oito resíduos de cisteína são completamente conservados, formando quatro pontes dissulfeto com o arranjo C1-C8, C2-C5, C3-C6 e C4-C7 (Fig. 5B). Duas das pontes dissulfeto, C3-C6 e C4-C7, que conectam a α -hélice à fita β 3, são parte da organização estrutural conhecida como motivo $\alpha\beta$ estabilizado por cisteína (CS $\alpha\beta$) (Thomma et al. 2002; Carvalho e Gomes 2011). A inclusão das defensinas vegetais na superfamília das cis-defensinas é atribuída à disposição dessas duas pontes dissulfeto entre a α -hélice e a fita β 3, conectando os mesmos elementos estruturais secundários e à sua organização no mesmo lado de suas estruturas tridimensionais (Shafee et al. 2017). Além do padrão comum de quatro pontes dissulfeto, as defensinas *PhD*₁ e *PhD*₂ (de *Petunia hybrida*) são exceções que possuem um par extra de cisteínas, formando uma quinta ponte dissulfeto (Janssen et al., 2003). A formação das pontes dissulfeto, contribui para a compactação dos elementos estruturais secundários, proporcionando uma alta estabilidade físico-química, especialmente a ponte C1-C8, que a torna uma molécula pseudocíclica (Carvalho e Gomes, 2011). Além das cisteínas, as defensinas também comumente possuem resíduos específicos de aminoácidos, como duas glicinas (nas posições 12 e 32), um resíduo aromático (na posição 10) e um glutamato (na posição 27) (as posições são relativas à *NaD*₁ (defensina de *Nicotiana glauca*), conforme mostrado na figura 5A) (Parisi et al., 2019; Weerden et al., 2013) (Figura 7B).

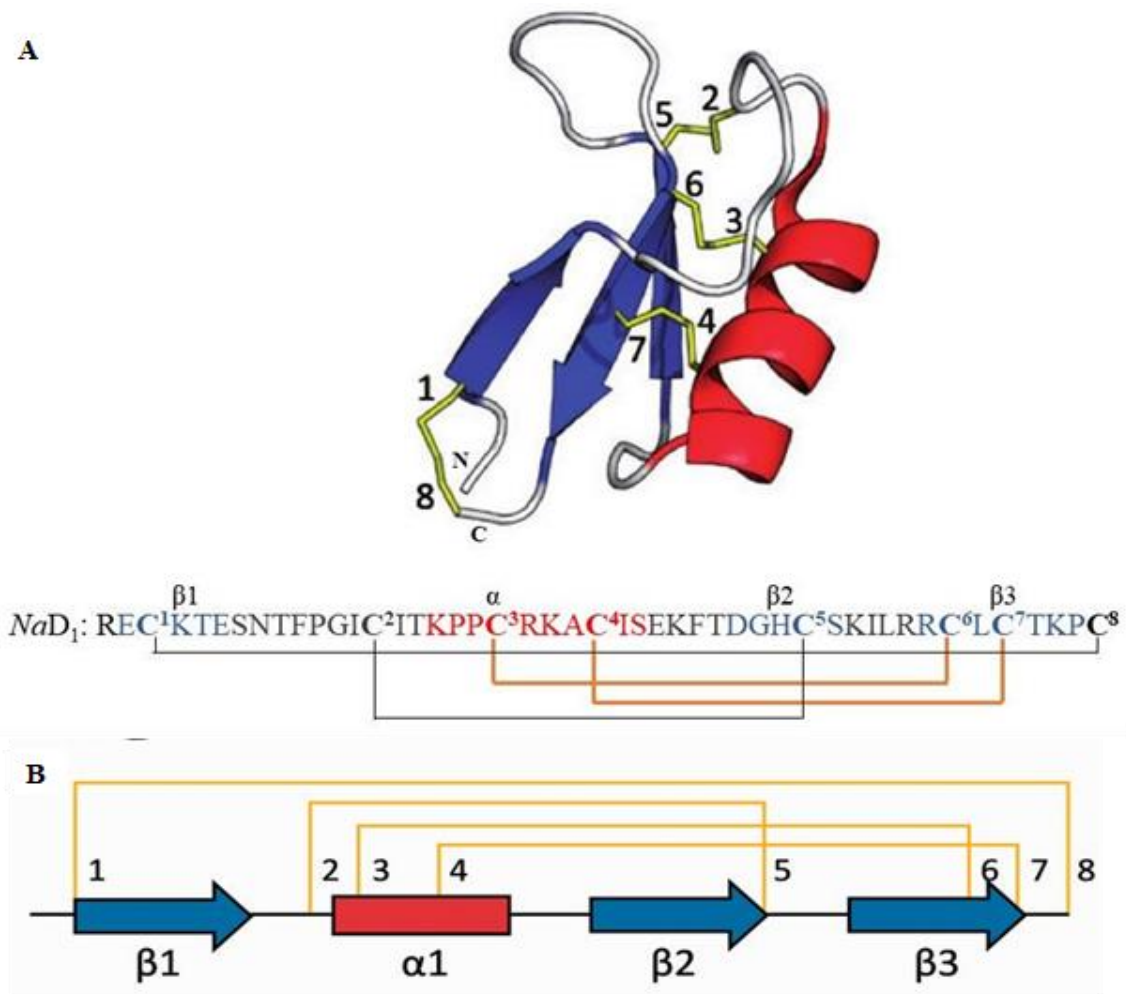


Figura 5: Representação esquemática das estruturas terciária e primária (**A**) da defensina *NaD*₁ de *Nicotiana glauca* e elementos de estrutura secundária análogos alinhados em uma ordem de estrutura primária (**B**). Para as duas estruturas são mostradas em vermelho a α -hélice, em azul as folhas β , em amarelo as pontes dissulfeto e em cinza as voltas. Os números indicam tanto os resíduos de cisteínas como o padrão de ligação entre eles para a formação das pontes dissulfeto. As linhas abaixo dos resíduos de cisteínas (destacados em negrito), na estrutura primária, indicam as pontes dissulfeto. As linhas destacadas em amarelo escuro indicam o domínio CS α β . C e N indicam o C-terminal e o N-terminal, respectivamente (Adaptado de Shafee et al. (2016), com modificações).

As variações nas estruturas primárias das defensinas de plantas resultam em diferentes arranjos espaciais na estrutura tridimensional, o que leva a uma diversidade no tamanho das voltas e contribui para o amplo espectro de atividades biológicas apresentadas por esses AMPs (Carvalho e Gomes, 2011).

As defensinas apresentam uma região conservada entre as fitas β 2 e β 3 que é detentora de atividade biológica, essa região foi inicialmente descrita por De Samblanx et al. (1997) e Schaaper et al. (2001) e posteriormente Yount e Yeman (2004) fizeram uma análise comparativa das estruturas primárias de vários AMPs pertencentes a diferentes famílias e descobriram um elemento estrutural comum em todos eles que devido à similaridade estrutural desse elemento com a letra grega “ γ ”, esse elemento estrutural foi denominado γ -

core (Fig. 6). Nas defensinas de plantas esse elemento estrutural sobrepõe com a região descrita por De Samblanx et al. (1997) e Schaaper et al. (2001).

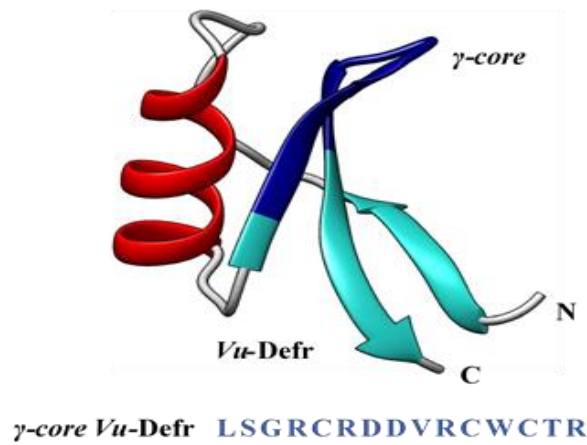


Figura 6. Representação esquemática da estrutura terciária da defensina *Vu-Defr* de *Vigna unguiculata*. Em cinza estão representados os elementos não estruturados, em vermelho as α -hélices, em azul claro as folhas β e em azul escuro representa a região do γ -core. C e N indicam o C-terminal e o N-terminal, respectivamente. Abaixo da estrutura terciária é mostrada a estrutura primária do γ -core da *Vu-Defr* (Adaptado de Souza et al., (2019)).

Portanto, o elemento estrutural γ -core também está presente nas defensinas de plantas, sendo localizado na estrutura primária entre as fitas $\beta 2$ e $\beta 3$ que é a principal região que detém atividade biológica das defensinas (De Samblanx et al., 1997; Schaaper et al., 2001, Yount e Yeaman, 2004) e para as defensinas de plantas, a estrutura primária do γ -core possui uma fórmula descrita com o seguinte arranjo: NH_2 - [X₁₋₃] - [GXC] - [X₃₋₉] - [C] -COOH, sendo X qualquer aminoácido. Conforme demonstrado nas sequências das defensinas de plantas (Fig. 7).



Figura 7: Estruturas primárias de defensinas de plantas. As linhas acima dos resíduos de cisteínas (destacados em amarelo) indicam as pontes dissulfeto, a linha pontilhada indica a quinta ponte dissulfeto presente em *PhD*₁ e *PhD*₂. A linha vermelha indica a região do γ -core, notar que essa região é a mais variável dentro das estruturas das defensinas (Adaptado de TAM et al., 2015).

Além disso, as defensinas de plantas têm demonstrado ampla atividade contra fungos e patógenos humanos, especialmente do gênero *Candida* (Carvalho e Gomes, 2011).

Muitos aspectos dos mecanismos de ação de AMPs de plantas, sobre fungos têm sido caracterizados (Vriens et al., 2014). De modo geral, e especial no caso de defensinas de plantas que demonstraram potencial terapêutico por ter baixa toxicidade para o hospedeiro (Tavares et al., 2008).

Luo e Song (2021) destacaram diversos mecanismos de ação para diferentes AMPs. Conforme demonstrado na figura 8.

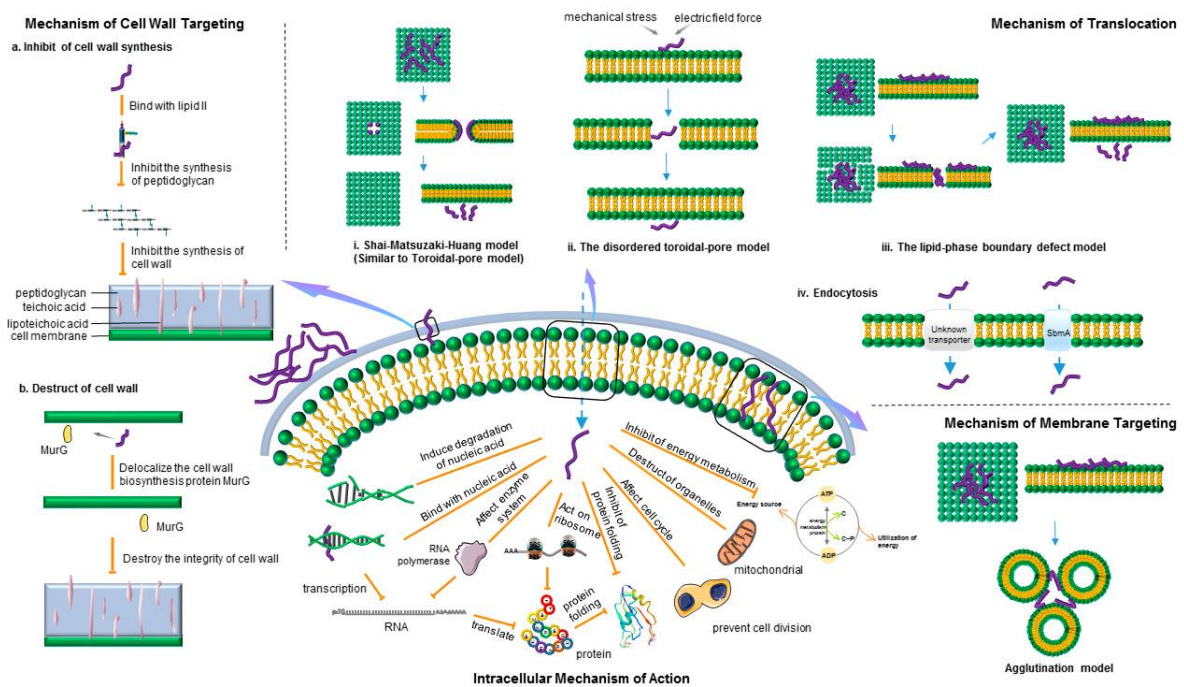


Figura 8: Mecanismo antimicrobiano de peptídeos antimicrobianos (AMPs). Inclui o mecanismo de direcionamento à parede celular, o mecanismo de direcionamento à membrana (apenas o modelo de aglutinação está listado), o mecanismo de translocação e o mecanismo de atividade intracelular. A seta azul e a linha amarela indicam o processo, e uma linha curta na parte inferior da linha amarela indica a inibição (a mesma abaixo). (Luo e Song, 2021)

As defensinas de plantas manifestam uma diversidade de atividades biológicas, abrangendo propriedades antibacterianas, antitumorais, antivirais e, sobretudo, atividade antifúngica. Contudo, os mecanismos precisos pelos quais essas defensinas inibem fungos permanecem em grande parte desconhecidos, dado que tais mecanismos podem apresentar

variações significativas entre diferentes defensinas (Lacerda et al., 2014; Vriens et al., 2014; Cools et al., 2017; Parisi et al., 2019; Souza et al., 2019).

Nesse contexto, empreendem-se esforços para identificar, em um nível molecular, as ativações de vias e processos de sinalização que conduzem à inibição do crescimento celular e, em alguns casos, à morte de células microbianas. O objetivo é elucidar de maneira abrangente o intrincado mecanismo de ação das defensinas (Thevissen et al., 2000; Wilmes et al., 2011; Souza et al., 2019; Parisi et al., 2019).

A permeabilização da membrana é um dos efeitos mais destacados no mecanismo de ação das defensinas, exemplificado pelo *DmAMP*₁ (extraído de *Dahlia merckii*) em interação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Thevissen et al., 1996; 1999) e *NaD*₁ (de *Nicotiana alata*) com o fungo *Fusarium oxysporum* (Van Der Weerden et al., 2008; 2010). Além disso, também é amplamente relatado a indução de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) como *Rs-AFP*₂ de rabanete (*Raphanus sativus*) e *DmAMP*₁, que interagem com a membrana celular de fungos e bactérias, levando à formação de poros e ruptura da membrana (Thevissen et al., 1996; 1999; Aerts et al., 2007). Um outro efeito é a inibição da síntese de proteínas como HBD-2 e HBD-3 (Human Beta-defensins), que se ligam ao ribossomo de bactérias e são capazes de inibir a síntese de proteínas bacterianas, prejudicando o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos afetados (Gürsoy et al., 2021). Defensinas presentes em insetos, como Cm-p1 de cochonilha (*Coccus hesperidum*) e drosomycina de moscas-das-frutas (*Drosophila spp.*), têm a capacidade de perturbar canais iônicos na membrana celular de microrganismos, o que leva a um desequilíbrio osmótico e resulta na morte celular (López-Abarrategui, et al., 2012, Zhang, et al., 2009).

Segundo Soares et al. (2017) a compreensão do mecanismo de ação dos AMPs é importante porque: (1) facilitará seu uso como agentes antimicrobianos; (2) facilitará a identificação de possíveis alvos para terapia antifúngica; (3) permitirá o desenho racional de modificações e substituições para minimizar a instabilidade e a toxicidade, e; (4) melhorará a escolha do melhor método de entrega para seus sítios de ação.

O uso excessivo e inadequado de antimicrobianos na medicina humana e veterinária tem levado ao surgimento de microrganismos resistentes, tornando crucial a busca por novas alternativas farmacêuticas para combater essa resistência (Meneguetti et al., 2017). Devido à sua ampla presença na natureza e produção por diversos organismos vivos, os AMPs e seus derivados sintéticos têm se revelado como uma alternativa promissora frente aos fármacos

atuais, o crescente interesse nessas moléculas é evidenciado pelo desenvolvimento de mais de 20 AMPs diferentes em diversos estágios clínicos (Sierra et al., 2017).

Há algum tempo nosso grupo vem estudando AMPs presentes na semente de *Vigna unguiculata* L. Walp. (feijão-de-corda). Destes estudos já foram isolados dois AMPs ricos em cisteínas, uma LTP e uma defensina, ambas com atividade inibitória in vitro sobre *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e além da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Carvalho et al., 2001). A defensina isolada foi clonada e caracterizada e passou a ser denominada *Vigna unguiculata defensin one* (*VuDef*₁) (Carvalho et al., 2006), posteriormente foi feita a produção recombinante da *VuDef*₁ e ela demonstrou atividade antimicrobiana sobre promastigotas de *Leishmania amazonenses* (Souza et al., 2019).

Prosseguindo com as pesquisas sobre *VuDef*₁, Souza et al. (2019) estudaram o mecanismo de ação dessa defensina sobre promastigotas de *L. amazonenses* onde foi demonstrada uma perturbação da membrana, produção de ROS e perda do potencial de membrana mitocondrial.

1.5 Peptídeos bioinspirados

Compreender amplamente a região do γ -core das defensinas é importante para o desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica para descoberta de novos fármacos (Souza et al., 2019). Portanto, a descoberta dessa região possibilitou a miniaturização da sequência biologicamente ativa das defensinas de plantas e isso proporciona vantagens para o desenvolvimento de novas drogas como, por exemplo, um menor custo de produção e maior especificidade que mitigam os efeitos adversos (Souza et al., 2019).

Nesse sentido nosso grupo estudou um peptídeo com 15 resíduos de aminoácidos que foi sintetizado com base na região de alça das fitas β 2 e β 3 da defensina *VuDef*₁, região esta que compreende o γ -core, e este AMP foi ativo sobre *L. amazonenses* (Souza et al., 2019). Este AMP recebeu o nome *A*_{36,42,44} γ ₃₂₋₄₆*VuDef*, a primeira parte do nome “*A*_{36,42,44}” se deve ao fato das Cys da sequência original naquelas posições terem sido substituídas por Ala para evitar a formação de pontes dissulfeto que não ocorriam no peptídeo original. O restante do nome “ γ ₃₂₋₄₆*VuDef*” indica a região do γ -core de *VuDef*₁ que se encontra entre as posições 32 a 46 da sequência original. Para facilitar a compreensão passamos a nos referir a esse peptídeo como DD, devido à presença dos dois ácidos aspárticos nas posições 37 e 38 (Souza et al., 2019). Em outro estudo DD foi testado contra leveduras, porém, em relação a leveduras o mesmo não apresentou resultados significativos (Toledo et al., 2021). A partir desse resultado,

iniciamos estudos com várias defensinas de plantas com atividade sobre microrganismos que tinham estudos de correlação entre a estrutura primária e a atividade inibitória com o objetivo de desenhar alterações direcionadas na estrutura primária de DD com intuito de melhorar sua atividade antimicrobiana.

Os peptídeos antimicrobianos projetados (dAMPs, do inglês *designed AMPs*) são peptídeos sintéticos criados em laboratório de forma racional, utilizando como base as funções e estruturas de AMPs de ocorrência natural. Esses dAMPs mostraram uma ampla variedade de modificações em seu repertório estrutural, resultando em maior eficiência, segurança, especificidade e possibilidade de redução da toxicidade para células não alvo, em comparação com os AMPs naturais que lhes serviram de inspiração (Kumar et al., 2018; Mirski et al., 2018; Rajasekaran et al., 2012, 2018). Os amplos espectros de inibições microbianas de AMPs as elevaram a um novo patamar farmacêutico. No entanto, a falta de compreensão de seu desempenho *in vivo* impõe algumas desvantagens ao seu desenvolvimento farmacêutico e obstaculiza seu caminho para a clínica. Tais desvantagens incluem sua ação tóxica contra células mamíferas, resultando em um baixo índice seletivo, ineficiente farmacocinético e farmacodinâmico *in vivo* que tornam a biodisponibilidade das AMPs baixa, além dos altos custos de produção devido à sua estrutura complexa e comprimento (Barreto-Santamaría et al., 2019). No entanto, embutidas em suas estruturas estão características que estão sendo exploradas para contornar essas desvantagens, como a ampla diversidade estrutural que, combinado a estudos de correlação entre a atividade e estrutura, estão proporcionando uma compreensão das posições e quais aminoácidos são cruciais para a atividade, bem como a possibilidade pela síntese química da incorporação de aminoácidos não naturais, o que melhora sua estabilidade e atividade (Torres et al., 2019). Esses entendimentos permitiram o desenho de AMPs modificadas com melhores propriedades terapêuticas.

Portanto, para fazermos as alterações direcionadas em DD que melhorassem sua atividade inibitória sobre leveduras analisamos estudos de correlação entre a estrutura primária e as atividades biológicas das defensinas de plantas e entendemos quais aminoácidos eram importantes para a atividade antimicrobiana assim como a posição destes aminoácidos dentro da estrutura primária do γ -core e também em seus peptídeos derivados (Toledo et al., 2021).

Com base no entendimento do aminoácido e da sua posição dentro da estrutura primária de DD, projetamos três peptídeos conforme pode ser observado na tabela 1. A abreviatura dada aos AMPs desenhados seguiu a mesma lógica da nomenclatura de DD *supra*

dictum, a saber: O peptídeo A_{36,42,44}R_{37,38}γ₃₂₋₄₆VuDef abreviado como RR pelo fato de os Asp₃₇₋₃₈ terem sido substituídos por duas Arg. O D-RR apresenta a mesma sequência que RR, mas em sua forma D-enantiômero. Por fim, o AMP A_{42,44}R_{37,38}W_{36,39}γ₃₂₋₄₆VuDef, foco desse estudo e aqui tratado como WR, recebeu essa abreviação devido ao fato de ter sido desenhado com Trp (W) nas posições 36 e 39, e Arg nas posições 37 e 38 (Toledo et al., 2021). Conforme pode ser observado na tabela 1, as alterações direcionadas nos resíduos dos aminoácidos (em negrito) resultaram em alterações na carga e hidrofobicidade dos peptídeos, essas alterações também influenciaram na atividade dos AMPs, apresentando resultados promissores (Tabela 1).

Tabela 1: Estrutura primária e propriedades biofísicas dos peptídeos sintéticos baseados no γ -core da defensina VuDef1.

Defensina/ Nome do peptídeo	Estrutura Primária (Código de uma letra)					Carga Líquida (pH 7.0)	Hidrofobicidade (Kcal/mol)		
	1	11	21	31	41			51	
VuDef1	--MKT	CENL-	ADTYR	GPCFT	TGSCDDHCKN	KEHLL-SG	C R-----DDVR - C CTRNC	+0,7	+54,73
A _{36,42,44} γ ₃₂₋₄₆ VuDef (DD)						L-SG	A R-----DDVR - A ATR	+2	+21,98 (+20,42)
A _{36,42,44} R _{37,38} γ ₃₂₋₄₆ VuDef (RR)						L-SG	A R----- RRVR - A ATR	+6	+18,32 (+21,98)
D-A _{36,42,44} R _{37,38} γ ₃₂₋₄₆ VuDef (D-RR)						L-SG	A R----- RRVR - A ATR	+6	+18,32 (+21,98)
A _{42,44} R _{37,38} W _{36,39} γ ₃₂₋₄₆ VuDef (WR)						L-SG	W R----- RRWR - A ATR	+6	+14,10 (+21,98)

Os números acima da estrutura primária servem apenas de referência e os espaços (-) foram adicionados para melhorar o alinhamento. Em preto e negrito estão os aminoácidos que foram trocados na sequência dos peptídeos desenhados e a caixa vermelha destaca o γ -core, conforme definido por Yount e Yeman (2004). Fonte: Toledo et al. (2021) (adaptado). Na estrutura primária da VuDef₁, é mostrada uma metionina inicial (em negrito e itálico) que foi incluída como requisito para sua expressão usando o vetor pET-32 EK/LIC, conforme descrito por Santos et al. (2010).

Nossos resultados indicaram que os três peptídeos bioinspirados tiveram sua atividade antifúngica nas leveduras testadas melhorada por alterações direcionadas para aumentar tanto a carga quanto sua hidrofobicidade, em geral, todos os AMPs bioinspirados demonstraram baixa toxicidade nas células mamíferas testadas (Toledo et al., 2021).

Torna-se, portanto evidente que AMPs dotados de mudanças estruturais resultaram em diminuição de toxicidade, melhoria de estabilidade e da especificidade da protease, além de uma redução significativa dos custos de fabricação, tais medidas são necessárias para uma possível entrada de determinados peptídeos como medicamentos no mercado (Ramesh et al., 2016). Os dados preliminares presentes em nosso estudo anterior são importantes porque são critérios relevantes para o uso clínico, como o pequeno tamanho do peptídeo biologicamente ativo, que minimiza os custos de produção e diminui o risco de interações inadequados do hospedeiro, e aumenta a estabilidade para uso *in vivo*.

1.6 Peptídeo A_{42,44}R_{37,38}W₃₆₋₃₉γ₃₂₋₄₆VuDef (WR)

Conforme relatado, o peptídeo WR foi desenhado com alterações direcionadas com base na estrutura primária do peptídeo DD, tornando-o mais hidrofóbico e catiônico que o peptídeo original (tabela 1). A atividade de WR foi testada contra leveduras oportunistas e foi comparada com a atividade demonstrada por DD. Os resultados demonstraram que DD não era capaz de inibir o crescimento de nenhuma leveduras testadas, mas WR, desenhado com alterações em aminoácidos e posições com base na estrutura de DD, demonstrou inibir significativamente, diversas leveduras (Tabela 2). Esses resultados demonstram que WR teve sua atividade inibitória melhorada em comparação com DD. Na tabela 2 demonstramos as diferenças nas atividades inibitórias do peptídeo original DD e WR que é o foco deste estudo.

Tabela 2: Resumo dos efeitos biológicos do peptídeo sintético projetado WR sobre diferentes espécies de leveduras e células de mamíferos em comparação com a sequência original (DD).

Nome do peptídeo (abreviatura do nome do peptídeo) e efeitos biológicos						
	A_{36,42,44}Y₃₂₋₄₆VuDef (DD) peptídeo original			A_{42,44}R_{37,38}W₃₆₋₃₉Y₃₂₋₄₆VuDef (WR)		
	% de inibição do crescimento em 18,5 µM	MIC ₁₀₀ (µM)	DL100 (efeito fungicida, µM)	% de inibição do crescimento em 18,5 µM	MIC ₁₀₀ (µM)	DL100 (efeito fungicida, µM)
<i>S. cerevisiae</i>	ni	-	-	26,1%	-	-
<i>C. albicans</i>	ni	-	-	96,2%	18,5	27,5
<i>C. buinensis</i>	ni	-	-	98,5%	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	ni	-	-	ns	-	-
<i>C. peliculosa</i>	ni	-	-	ns	-	-
<i>C. tropicalis</i>	ni	-	-	58,2%	-	-
Células de mamíferos	Redução da atividade metabólica (%)					
				DL100 para <i>C. albicans</i>		
Murinos RAW 264.7				3,6		
Monócitos humanos THP-1				10,2		
Efeito Biológico para <i>C. albicans</i> na DL100						
Tempo de Morte				1 hora		

A MIC₁₀₀, viabilidade (DL₁₀₀) e demais testes foram realizados apenas entre WR e *Candida albicans* escolhida por seu interesse médico e por ser uma das mais sensíveis a atividade de WR determinado pela primeira triagem antimicrobiana a 18,5 µM. (ni): a levedura não foi inibida na condição testada, (ns) não significativo; (-) não determinada. Fonte: os autores e Toledo et al. (2021).

Devido ao potencial antimicrobiano demonstrado e a importância médica das leveduras, optamos por seguir os estudos com a levedura *C. albicans* e WR. Para esse conjunto levedura-peptídeo, foi determinada a mínima concentração inibitória (MIC, do inglês *minimal inhibitory concentration*) em 18,5 µM, a dose letal (DL₁₀₀) em 27,5 µM, ou seja, a concentração necessária para que WR induzissem a morte de toda a população de *C. albicans* (2.000 células/mL) e o tempo de morte, ou seja, o tempo que o peptídeo leva para

matar a toda a população de células, em 1 h. Esses parâmetros serviram de base para os demais ensaios realizados nesta pesquisa. Os resultados deste estudo estão apresentados abaixo e foram divididos em 4 blocos para melhor compreensão.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Estudar o mecanismo de ação do peptídeo bioinspirado A_{42,44}R_{37,38}W₃₆₋₃₉γ₃₂₋₄₆VuDef (WR) sobre células de *Candida albicans*.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Objetivos específicos do bloco 1 – Análise do papel do estresse oxidativo na morte induzida de *C. albicans* por WR

- Analisar o envolvimento das espécies reativas de oxigênio na morte celular induzida em *C. albicans* por WR;
- Avaliar a funcionalidade mitocondrial na morte celular induzida em *C. albicans* por WR;
- Estudar a atividade de NAD desidrogenases na morte celular induzida em *C. albicans* por WR.

2.2.2 Objetivos específicos do bloco 2 – Análise do tipo de morte celular induzida em *C. albicans* por WR

- Analisar o envolvimento de metacaspases na morte celular induzida em *C. albicans* por WR;
- Investigar se há condensação de cromatina na morte celular induzida em *C. albicans* por WR;
- Avaliar se há morte celular acidental induzida em *C. albicans* por WR.

2.2.3 Objetivos específicos do bloco 3 – Avaliar a interação de WR com lipídeos e membranas

- Verificar o papel da permeabilização da membrana na morte de *C. albicans* tratadas com WR;
- Estudar o extravasamento de substâncias citoplasmáticas das células de *C. albicans* tratadas com WR;
- Análise por difração circular;
- Analisar a importância da estabilização osmótica no processo de morte celular das células de *C. albicans* tratadas com WR.

2.2.4 Objetivos específicos do bloco 4 – Investigar a interação de WR com as células de *C. albicans* e o papel do íon K^+ na morte induzida da levedura por WR

- Analisar a morfologia de células de *C. albicans* incubadas com WR por microscopia óptica;
- Verificar a estrutura de WR por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) em água e na presença de K^+ ;
- Analisar da interação de WR marcado com o fluoróforo 5-FAM com as células de *C. albicans* e na presença do K^+ ;
- Avaliar o papel dos fluxos de íons na morte da levedura *C. albicans* induzida por WR;
- Analisar a produção de espécies reativas de oxigênio endógenas (ROS) nas células de *C. albicans* tratadas com WR na presença de K^+ ;
- Analisar as alterações morfológicas no tempo inicial nas células de *C. albicans* tratadas com WR e na presença de K^+ ;
- Analisar da influência do pH do meio na modulação da morte de *C. albicans* induzida por WR;
- Avaliação da acidificação do meio extracelular induzida pela glicose nas células de *C. albicans* tratadas com WR e na presença de K^+ ;
- Verificar a permeabilização da membrana plasmática de *C. albicans* em tempos iniciais e na presença de K^+ .

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Bloco 1 – Análise do papel do estresse oxidativo na morte de *C. albicans* por WR

3.1.1 Material biológico

3.1.1.1 Peptídeo sintético

O peptídeo desenhado A_{42,44}R_{37,38}W₃₆₋₃₉γ₃₂₋₄₆VuDef, abreviado como WR, é resultado de alterações feitas na sequência do peptídeo original L₃₂SGRARDDVRAWATR₄₆, denominado A_{36,42,44}γ₃₂₋₄₆VuDef, abreviado de DD (SOUZA et al., 2019). Em relação à sequência original do DD, as seguintes alterações foram feitas para o peptídeo WR: a Ala₃₅ foi substituída por um Trp e os Asp₃₇ e Asp₃₈ foram ambos substituídos por Arg e a Val₃₉ foi substituída por Trp. O peptídeo foi obtido comercialmente da empresa Aminotech em forma de pó e a pureza do peptídeo foi comprovada por cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa e análises de espectrometria de massa fornecida pela empresa. WR foi dissolvido em água ultrapura na concentração final de 2 µg/µL (aproximadamente 1000 mM). Alíquotas foram armazenadas em frascos de vidro contendo 500 µL e armazenados em -70 °C para o uso posterior.

3.1.1.2 Microrganismos

A levedura *Candida albicans* (CE022), foi cultivada e conservada no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LBFM) do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. A levedura foi cultivada em meio Sabouraud 2% de glicose (10 g/L peptona de carne, 5 g/L peptona de caseína, 20 g/L D(+)glicose e 17 g/L ágar) (Merck) por 24 h a 30 °C e então armazenadas a 4 °C. Para a manutenção da levedura, foi feito repique para meio novo a cada três meses.

3.1.2 Ensaio de inibição do crescimento

Anteriormente, a dose letal (DL₁₀₀) de 27,5 µM e o tempo de morte, ou seja, o tempo necessário para WR eliminasse completamente a população de células de *C. albicans* do ensaio foram determinados como 1 h (Toledo et al., 2021; Lucas et al., 2023). Para os experimentos abaixo, um ensaio antimicrobiano foi configurado conforme descrito em Toledo et al. (2021) e Broekaert et al. (1990). Em resumo, foi obtido um inóculo da levedura *C. albicans* de placas de Petri de estoque contendo colônias desenvolvidas, o qual foi transferido para uma nova placa contendo ágar Sabouraud com 2% de glicose. As placas foram incubadas

a 30 °C por 24 h. Uma alíquota celular desse novo crescimento foi retirada e adicionada a 10 mL de caldo Sabouraud com 2% de glicose (10 g/L de peptona de carne, 5 g/L de peptona de caseína, 20 g/L de D(+)-glicose) (Merck) para a quantificação de células usando uma câmara de Neubauer (Laboroptik), a partir de uma alíquota de 10 µL, utilizando um microscópio óptico Axio Imager.A2 (Zeiss). O ensaio foi configurado em uma placa de 96 poços (Nunc) com 2.000 células/mL da levedura, a DL₁₀₀ de WR (27,5 µM) e meio de cultura para completar 100 µL. O período de incubação foi estabelecido em 1 h (tempo de morte). O controle foi realizado excluindo o peptídeo. Após esse período, as células foram lavadas em caldo Sabouraud e inoculadas em placas de Petri usando uma alça de Drigalski, sendo incubadas a 30 °C por 24 h para permitir a formação de colônias.

Para investigar a influência do estresse oxidativo na morte induzida em *C. albicans* por WR, foram conduzidos ensaios antimicrobianos, incorporando os agentes antioxidantes ácido L-ascórbico (AA), N-acetil-L-cisteína (NAC) ou γ-L-glutamil-L-cisteinil-glicina (GSH). O ensaio antimicrobiano seguiu a metodologia descrita acima, com as seguintes modificações: inicialmente, diferentes concentrações dos três antioxidantes foram avaliadas para determinar a concentração máxima que não apresentava toxicidade para *C. albicans*, determinando as unidades formadoras de colônias, o indicador central da viabilidade celular. Após a identificação das concentrações ideais de cada antioxidante, o ensaio antimicrobiano foi conduzido utilizando a DL₁₀₀ de WR, 70 mM do agente antioxidante AA (preparado a partir de uma solução estoque de 1 M), ou 5 mM de NAC (a partir de uma solução estoque de 0,6 M) ou 3 mM de GSH (a partir de uma solução estoque de 0,5 M) adicionado concomitantemente ao WR. Os antioxidantes foram dissolvidos em água ultrapura, filtrados através de um filtro esterilizado (Millex-GV 0,22 µm, Merck Millipore), e incubados no tempo de morte. Além disso, foram incluídos controles com a adição exclusiva dos agentes antioxidantes. No caso do antioxidante AA, também foi realizado um experimento em que ele foi pré-incubado em relação à adição de WR, nas mesmas condições mencionadas anteriormente.

3.1.3 Padronização do número de células para ensaios ópticos de microscopia

Em pesquisas anteriores, foi estabelecido que 1 h e 27,5 µM eram o tempo e a concentração necessários para o peptídeo WR induzir a morte de uma população de 2.000 células/mL de *C. albicans* do ensaio antimicrobiano. No entanto, para a condução de ensaios envolvendo microscopia, é necessário utilizar uma concentração celular mais alta que permita a detecção de sinais dentro dos limites de resolução da técnica. Por essa razão, decidimos

verificar se os efeitos provocados por WR permaneciam consistentes em concentrações celulares mais elevadas. Dessa forma, os ensaios foram conduzidos conforme descrito no item **3.1.2 Ensaio da inibição do crescimento**, incubando o WR pelo período de morte (1 h) e na DL₁₀₀ (27,5 µM) com 40.000 células/mL, um número previamente estabelecido para os ensaios de microscopia (Soares et al., 2017).

3.1.4 Análise da produção endógena de ROS

Para verificar a presença de estresse oxidativo nas células de *C. albicans*, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi avaliada por meio de microscopia ótica de fluorescência, utilizando a sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA, Calbiochem, EMD). Neste ensaio, com base no protocolo de Mello et al. (2019), as células de *C. albicans* (40.000 células/mL) foram incubadas com WR em sua DL₁₀₀ e no início do período de morte, 20 min. Os controles foram conduzidos sem a adição de WR. Um controle positivo foi feito, com células incubadas com 333 mM de ácido acético (AcA) por 1 h. A presença de ROS, também foi analisada na presença de AA 70 mM pré-incubado por 30 min. O controle positivo foi utilizado para ajustar os parâmetros de intensidade de excitação e tempo de exposição para a aquisição de imagens fluorescentes no microscópio, esses parâmetros foram usados para a aquisição das imagens de todos os outros tratamentos. 15 minutos antes do tempo total do tratamento, as células do controle e tratadas foram incubadas com a sonda H₂DCFDA, transferidos para lâminas, e cobertos com lamínulas. A visualização foi realizada por contraste de interferência diferencial (DIC) no microscópio Axio Imager.A2 (Zeiss) equipado com filtros de fluorescência (450 – 490 nm para excitação e 500 nm para emissão). A aquisição das imagens das células foi realizada usando o software AxionVision LE (versão 4.8.2, Zeiss) equipado com câmera Axio Can MR5 (Zeiss). Os resultados foram expressos em percentual de células fluorescentes calculadas por contagem celular, utilizando os seguintes critérios: 1º - contagem de aproximadamente 200 células campos aleatórios em DIC e campos fluorescentes. 2º - se o número de células fosse muito baixo (uma consequência do tratamento com WR ou com o controle positivo que causa a morte das células de levedura), foram contados 10 campos aleatórios para cada tratamento. O percentual de células fluorescentes, uma indicação de estresse oxidativo, foi calculado na média do número de células fluorescentes e na média de células observadas em DIC para cada amostra de acordo com: $[(\text{número de células fluorescentes} \times 100)/\text{número de células observadas em DIC}]$.

3.1.5 Análise da funcionalidade mitocondrial

A funcionalidade mitocondrial foi avaliada por microscopia de fluorescência óptica com o auxílio das sondas fluorescentes MitoTracker Red FM (Thermo Fisher). O ensaio foi realizado como descrito no item **3.1.4 Análise da produção endógena de ROS**, com modificações. Células de *C. albicans* foram incubadas com WR no início e no final do tempo da morte, 20 min e 1 h, respectivamente. As células do controle positivo foram incubadas com 2% de triton X-100 por 15 min. O controle (célula e meio) foi utilizado para ajustar os parâmetros do microscópio. Posteriormente, as células foram incubadas adicionalmente com 0,1 µg/mL da sonda fluorescente MitoTracker Red FM por 15 min a 30 °C antes do final dos tempos de incubação de WR e observadas sob um microscópio óptico equipado com filtros de fluorescência de 581 nm para excitação e 644 nm para emissão para MitoTracker red FM.

Para o ensaio com WST-1, foi necessário estabelecer um número mínimo de células para obter um sinal positivo. Nós utilizamos 80.000 células/mL e para validar a atividade de WR nessa concentração celular, realizamos o ensaio conforme descrito no item **3.1.3 Padronização do número de células para ensaios ópticos de microscopia**, utilizando 80.000 células/mL.

O reagente de proliferação celular WST-1 (Roche) foi empregado para avaliar a atividade mitocondrial das células de levedura tratadas com WR, conforme descrito por Berridge et al. (2005). O ensaio foi preparado conforme o método apresentado no item **3.1.4 Análise da produção endógena de ROS**, utilizando uma densidade celular de 80.000 células/mL. Em seguida, foram adicionados 10 µL do reagente WST-1 e 2 µL de 2,3,5,6-tetrametila-1,4-benzoquinona (duroquinona) (concentração final de 0,24 mM a partir de um estoque de 12,24 mM em DMSO) como um acoplador de elétrons (Tsukatani et al., 2003) a cada amostra. Um controle positivo foi incluído utilizando células de *C. albicans* incubadas com 2% de triton X-100 por 15 min. Um branco foi preparado com caldo Sabouraud, WST-1 e duroquinona. A densidade óptica foi monitorada a 450 nm por 20 min e 1 h para amostras tratadas com WR, utilizando um leitor de ELISA (Epoch, Biotek) com o software Gen5. O percentual de atividade mitocondrial foi calculado como $[(ABS_{450\text{ nm}} \text{ das amostras de teste} \times 100)/ABS_{450\text{ nm}} \text{ do controle}]$.

3.2 Bloco 2 - Análise do tipo de morte celular induzida em *C. albicans* por WR

3.2.1 Análise do envolvimento de metacaspases na morte de *C. albicans*

Realizamos um ensaio para detectar a atividade de metacaspases e determinar se a via de morte ativada por WR em *C. albicans* é um tipo de morte celular regulada com sinais

semelhantes à apoptose. Esta análise foi realizada por meio de microscopia de fluorescência óptica utilizando a sonda fluorescente FITC-VAD-FMK (CaspACE, FITC-VAD-FMK In Situ Marker, Promega). O ensaio foi conduzido conforme descrito no item **3.1.4 Análise da produção endógena de ROS**, com algumas modificações. As leveduras de *C. albicans* foram incubadas com WR por 20 min. No controle positivo, as células de *C. albicans* foram incubadas com 333 mM de ácido acético (AcA) por 1 h e os parâmetros do microscópio foram configurados a partir dele. O controle foi realizado sem a adição de WR ou AcA. As células dos grupos de controle e tratadas com WR foram incubadas com 50 µM de FITC-VAD-FMK por 15 min a 30 °C, seguido por uma lavagem em PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄ anidro; 2 mM KH₂PO₄; pH: 7,2, do inglês *phosphate-buffered saline*). Posteriormente, foram observadas em um microscópio de fluorescência utilizando um filtro de excitação de 490 nm e um filtro de emissão de 525 nm.

3.2.2 Análise do envolvimento de metacaspases na morte de *C. albicans* induzida por WR pelo inibidor de pan-caspases Z-VAD-FMK

Para confirmar o resultado do ensaio de microscopia com FITC-VAD-FMK e se metacaspases estavam envolvidas na morte induzida de *C. albicans* por WR foi usado o inibidor de pan-caspases Z-VAD-FMK. Para isso um ensaio antimicrobiano foi conduzido na presença do inibidor pan-caspases Z-VAD-FMK (Promega). O ensaio antimicrobiano seguiu a metodologia apresentada no item **3.1.2 Ensaio da inibição do crescimento**, com as seguintes modificações: a DL₁₀₀ do peptídeo, combinado a 50 µM de Z-VAD-FMK (solução estoque de 2 mM em DMSO), foram utilizados e incubados no tempo de morte (1 h). Controles foram também realizados com a adição de 50 µM de Z-VAD-FMK.

3.2.3 Análise da condensação de cromatina em *C. albicans* induzida por WR

A condensação da cromatina foi investigada por meio da coloração com 1 µM de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (solução estoque de 2 mM em água ultrapura, Sigma-Aldrich) em células tratadas conforme o item **3.1.4 Análise da produção endógena de ROS**, com as seguintes adaptações: após os períodos de incubação, tanto as células de controle (contendo apenas células e meio) quanto as células tratadas com o peptídeo foram permeabilizadas com 2% de Triton X-100 por 2 min, antes da coloração com 1 µM DAPI. Este processo foi realizado por 15 min no escuro a 30 °C, e em seguida, as amostras foram examinadas no microscópio de fluorescência com filtro para excitação de 358 nm e de emissão de 454 nm.

3.2.4 Análise da morte celular acidental

A morte celular acidental (termo proposto por Carmona-Gutierrez et al., (2018), em vez de necrose) foi analisada por microscopia de fluorescência utilizando o corante iodeto de propídio (PI, do inglês *propidium iodide*), conforme descrito no item **3.1.4 Análise da produção endógena de ROS**, com as seguintes modificações: as leveduras foram incubadas com WR em sua DL₁₀₀ por 20 min e 1 h. O controle positivo, foi feito com células de *C. albicans* submetidas a aquecimento por 1 min a 100 °C. As células de controle e as tratadas foram incubadas com 0,25 µg/mL de IP por 15 min a 30 °C no escuro antes do final do tempo de incubação de WR, sendo posteriormente observadas sob um microscópio de fluorescência com um filtro de excitação de 506 nm e um filtro de emissão de 530 nm. Essa análise também foi realizada em intervalos de tempo de 10 e 15 min, e nesses casos, o IP foi pré-incubado com as células de *C. albicans*, 15 min antes da adição de WR.

3.3 bloco 3 – Avaliação da interação de WR com lipídeos e membranas

3.3.1 Análise de permeabilização da membrana plasmática de *C. albicans* induzida por WR

Para analisar se a ação de WR causa permeabilização da membrana plasmática nas células de *C. albicans* o ensaio foi preparado conforme descrito no item **3.1.4 Análise da produção endógena de ROS**, com modificações. Inicialmente, foram preparadas alíquotas de 100 µL de suspensões celulares de *C. albicans* que foram cultivadas em microplacas de 96 poços por 20 min a 30 °C. Posteriormente, as células foram incubadas adicionalmente com 0,2 µM de *Sytox green* por 15 min a 30 °C antes do final dos tempos de incubação de WR. As células foram então observadas usando um microscópio DIC (Axio Imager.A2, Zeiss) equipado com um conjunto de filtros de fluorescência para detecção de fluorescência (excitação 450-490 nm; emissão 500 nm). Um controle positivo foi incluído, contendo células aquecidas a 100 °C por 1 min, e um controle não tratado foi incluído para avaliar a permeabilidade basal da membrana.

3.3.2 Ensaio antimicrobiano com 1.000.000 células/mL

Para a condução de ensaios envolvendo o extravasamento de substâncias citoplasmáticas, uma concentração celular mais alta é necessário para permitir a detecção de sinais dentro dos limites de resolução da técnica. Portanto, para validar nossos resultados de extravasamento realizamos o ensaio conforme descrito no item **3.1.2 Ensaio da inibição do**

crescimento incubando WR no tempo de morte (1 h) e DL₁₀₀ (27,5 µM) com 1.000.000 células/mL.

3.3.3 Extravasamento de substâncias citoplasmáticas que absorvem luz ultravioleta

Para testar a extravasamento de constituintes citoplasmáticos de células de *C. albicans* tratadas com WR como uma indicativa indireta da permeabilização de membrana, um experimento foi configurado conforme no item **3.1.2 Ensaio da inibição do crescimento** com as seguintes diferenças: no volume final de 100 µL de água ultrapura, adicionamos 1.000.000 células/mL de *C. albicans*, a dose letal de WR (27,5 µM), e tempo de incubação de 20 min a 30 °C. Controles foram feitos com água ultrapura, e controles positivos foram feitos com 2% de Triton X-100 por 1 min a 30 °C, considerado como 100% de permeabilização. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 1.600 x g por 5 min a 30 °C, os sobrenadantes de cada amostra foram coletados e analisados em absorbância a 260 e 280 nm por espectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) a 260 nm para determinar a presença de DNA, RNA e ATP, a leitura também foi realizada a 280 nm para determinar a presença de proteínas. O controle positivo foi realizado com triton X-100 a 2% por 10 min (Zhou, 2020; Jia, 2018). Os brancos foram feitos com triton X-100 e água.

3.3.4 Análise da interação de WR com lipídios de membrana de *C. albicans*

Os lipídios 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfo-colina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-rac-fosfoglicerol (POPG), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfo-L-serina (POPS), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (POPE) e ergosterol foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Os espectros de CD foram obtidos em um Espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Analytical Instruments, Japão). Inicialmente, oito espectros no ultravioleta distante (UV) foram adquiridos na faixa de comprimento de onda de 190 a 270 nm a 100 nm/min, com uma largura de banda de 1 nm, utilizando uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de comprimento de trajeto, a uma temperatura de 25 °C para cada amostra. WR foi testado separadamente em uma concentração final de 50 µM, em água ultrapura, em tampão de fosfato de potássio a 200 mM, pH 5,6, em tampão de fosfato de sódio a 200 mM, pH 5,6, e em 100% trifluoroetanol (TFE). Eles também foram testados separadamente com 1 mM de diferentes membranas modelo de vesículas unilameares pequenas (SUVs, do inglês *small unilamellar vesicles*) de POPC, POPC/POPG (proporção 40% e 60%, respectivamente), POPC/POPE (proporção 40%

e 60%, respectivamente) e POPC/POPS (proporção 40% e 60%, respectivamente) em tampão de fosfato de potássio a 200 mM, pH 5,6. O software JASCO foi utilizado para a análise dos espectros e convertido para elipticidade molar por resíduo $[\theta]$ (em $\text{deg.cm}^2 \text{dmol}^{-1}$). Quando necessário, a subtração espectral do solvente foi realizada (Melo, 2012). As SUVs foram preparadas conforme descrito em Crusca et al. (2018). O fosfato de potássio foi preparado com a mistura $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ e o fosfato de sódio foi preparado com a mistura $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$ conforme descrito por Sambrook e Russell (2001).

3.3.5 Interação de WR com glucosilceramida

A cepa mutante de *Candida albicans* (Δ)GCS1, que não tem a enzima glicosilceramida sintase (GCS) funcional, e, portanto, não produz o esfingolípido glucosilceramida (GlcCer) e a cepa SC5314 CA14 é a cepa parental sem a deleção do gene (Δ)GCS1 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Dirk Warnecke do *Institut fur Allgemeine Botanik* da Universidade de Hamburgo, na Alemanha e foi obtida do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no Rio de Janeiro, Brasil. As culturas das leveduras foram mantidas em meio batata-dextrose-ágar (infusão de batata 0,4%, dextrose 2,0% e ágar 1,5%). O ensaio antimicrobiano com as cepas foi feito como descrito no item **3.1.2 Ensaio da inibição do crescimento.**

3.3.6 Análise da atividade hemolítica de WR

A atividade hemolítica de WR foi determinada contra eritrócitos de ovelhas defibrinadas, conforme descrito por Oren e Shai (1997) com modificações. Em resumo, eritrócitos de ovelhas frescos, defibrinados e lavados com solução salina (0,15 M de NaCl) foram centrifugados a $2.400 \times g$ por 10 min a 4°C . Em seguida, foram ressuspensos em solução salina. O peptídeo WR foi diluído em microtubos em 50 μL de solução salina em concentrações de 100, 50, 27,5 e 23 μM , sendo 27,5 μM a dose letal WR, contra *C. albicans* (Toledo et al., 2021). Em seguida, 50 μL da suspensão de eritrócitos (concentração final de 1% V/V) foram adicionados, e a solução peptídeo-eritrócito foi incubada a 37°C por 1 h. Após o tempo de incubação, a suspensão foi centrifugada como descrito anteriormente, e o sobrenadante foi transferido para um poço de uma microplaca de 96 poços. A hemoglobina no sobrenadante, que indica hemólise, foi determinada a 405 nm em um leitor de microplacas (EZ Read 400, Biochrom). O detergente Triton X-100 (1%) foi usado como controle positivo, e nenhuma hemólise foi considerada como eritrócitos em solução salina (controle negativo). O percentual de atividade hemolítica de WR foi calculado considerando Triton X-100 como

100% de hemólise, de acordo com a fórmula: % de atividade hemolítica = $100 \times (\text{peptídeoABS}_{405} - \text{salinaABS}_{405}) / (\text{Triton X-100ABS}_{405} - \text{salinaABS}_{405})$.

3.3.7 Análise da importância da permeabilização na morte de *C. albicans* induzida por WR

Para entender se a permeabilização da membrana e o estresse osmótico causado pelo peptídeo WR tem influência direta na morte celular da levedura realizaremos ensaios na presença de estabilizadores osmóticos. Para isso um ensaio antimicrobiano foi realizado conforme descrito na subseção **3.1.2 Ensaio da inibição do crescimento** com as seguintes modificações: O ensaio foi montado com 1,2 M de sorbitol ou glicerol. Controles foram realizados da mesma maneira, excluindo a adição de WR. O ensaio foi incubado a 30 °C por 1 h. Após esse período, as células foram centrifugadas a 1600g por 1 min e lavadas uma vez em meio de Sabouraud contendo os osmoprotetores e semeadas em placas de Petri contendo meio de Sabouraud. As placas de Petri contendo as células semeadas foram incubadas a 30 °C por 24 h, e as unidades formadoras de colônias foram calculadas.

3.4 Bloco 4 – Investigação da interação de WR com as células de *C. albicans* e o papel do íon K⁺ na morte induzida

3.4.1 Análise morfológica de células de *C. albicans* incubadas com WR por microscopia óptica

Durante as análises microscópicas foram observadas alterações fenotípicas como células pequenas e vacuolizadas, e por este motivo foram feitas análises dessas alterações. Para visualização das células de *C. albicans* tratadas com WR por microscopia óptica, fizemos o ensaio antimicrobiano conforme descrito no item **3.1.4 Análise da produção endógena de ROS**. Mas incubamos as células de levedura com WR na DL₁₀₀ e com os tempos de 20 min e 1 h. Os controles foram feitos sem adição de WR. Além disso, foram feitos três controles positivos: leveduras aquecidas a 100 °C por 1 min; leveduras incubadas com Triton X-100 (2%, V/V) por 15 min e leveduras incubadas com AcA de 333 mM por 1 h. Após o período de incubação de cada tratamento, as células foram transferidas para lâminas e, após 5 min, cobertas com lamínulas e analisadas sob o microscópio óptico Axio Imager.A2 (Zeiss). As medições de tamanho celular foram feitas avaliando o tamanho dos eixos transversais e longitudinais (em µm) das células de *C. albicans* após o tratamento descrito acima pelo uso do software AxionVision LE (ferramenta Medida, Comprimento). Para esta medição, medimos os eixos transversais e longitudinais de 50 células selecionadas

aleatoriamente de cada tratamento em diferentes campos de observação. Para fornecer medidas uniformes, essas células foram selecionadas no mesmo plano focal, e pseudohifas, células não intactas e brotamento precoce não foram considerados para fins de medição.

3.4.2 Determinação do efeito tóxico de 5-FAM_WR com células de *C. albicans*

WR foi sintetizado pela empresa Aminotech acoplado ao marcador fluorescente 5-carboxyfluorescein (5-FAM) na porção N-terminal de sua sequência de aminoácidos e preparado como descrito no item **3.1.1.1 Peptídeo sintético** sendo protegido da luz, e foi denominado 5-FAM_WR. Inicialmente verificamos se 5-FAM_WR não perdeu o efeito tóxico ao ser conjugado com a molécula 5-FAM (ver item 2.1.1). Este ensaio foi realizado conforme descrito no item **3.1.2 Ensaio da inibição do crescimento** com 5-FAM_WR (27,5 μ M) A massa molecular da molécula 5-FAM foi descontada para cálculo da concentração de WR.

3.4.3 Análise da interação de 5-FAM_WR com as células de *C. albicans*

A interação de WR com as células de *C. albicans* foi determinada por microscopia confocal. Para isso, repetimos o ensaio antimicrobiano conforme descrito no item **3.1.4 Análise da produção endógena de ROS** com as seguintes modificações: 40.000 células/mL de *C. albicans* foram pré-incubadas por 5 min na presença de 2% de CalcoFluor White. Após esse período, o peptídeo 5-FAM_WR foi adicionado e incubado protegido da luz por 20 min, posteriormente as amostras foram passadas para lâminas, cobertas por lamínulas e observadas utilizando o Microscópio Confocal a Laser (LSM-710, Zeiss) equipado com filtros de fluorescência (450 – 490 nm para excitação e 500 nm para emissão). A aquisição das imagens das células foi realizada usando o software Zen Lite Edition 2011 (Zeiss), utilizando uma lente objetiva de 63x. Controles foram realizados na presença de 2% de CalcoFluor White sem a adição do peptídeo.

3.4.4 Análise da estrutura de WR por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) em água e na presença de K^+

Um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Analytical Instruments, Japão) foi utilizado para obter os espectros de CD. Uma cubeta de quartzo com um comprimento de trajeto de 0,1 cm e uma temperatura de 25 °C foi utilizada para coletar oito espectros de ultravioleta distante (UV) na faixa de comprimento de onda de 190 a 270 nm a 100 nm/min e uma largura de banda de 1 nm para cada amostra. Optamos por usar uma dosagem mais alta

de WR para aumentar o sinal de CD, com quase o dobro da DL_{100} em uma dosagem final de 50 μM , WR foi avaliado independentemente em água ultrapura, 200 mM de fosfato de potássio com pH 5,6. A análise espectral foi realizada usando o software da JASCO e os resultados foram traduzidos para elipticidade molar de resíduo $[\theta]$ (em $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$). A subtração espectral do solvente foi realizada quando necessário.

3.4.5 Determinação da interação de 5-FAM_WR com células de *C. albicans* na presença de K^+

Para analisar se a presença de K^+ causaria alterações na interação de 5-FAM_WR com as células da *C. albicans*, repetimos o ensaio antimicrobiano conforme descrito no item **3.4.3 Análise da interação de 5-FAM_WR com as células de *C. albicans*** com as seguintes modificações: 40.000 células/mL de *C. albicans* foram pré-incubadas por 15 min na presença de 200 mM de fosfato de potássio com pH 5,6 e 5 min antes do término desse tempo foi adicionado 2% de CalcoFluor White. Após esse período, o peptídeo 5-FAM_WR foi adicionado e incubado protegido da luz por 20 min, sendo posteriormente analisados pelo programa Zen Lite Edition 2011 (Zeiss), utilizando uma lente objetiva de 63x. Controles foram realizados na presença de 2% de CalcoFluor White sem a adição do peptídeo.

3.4.6 Análise dos canais de K^+ e Cl^- na morte celular de *C. albicans* induzida por WR

Para analisar o papel dos fluxos iônicos na morte celular por WR, utilizamos os bloqueadores de canal de K^+ tetraetilamônio (TEA) e 4-aminopiridina (4-AP), e o bloqueador de canal de Cl^- ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoico (NPPB). Para isso, realizamos inicialmente um teste de concentração para selecionar a concentração mais elevada dos inibidores que apresentasse a menor toxicidade para as leveduras em um ensaio de viabilidade (inibição da UFC em relação ao controle). O ensaio foi conduzido conforme descrito no item **3.1.2 Ensaio da inibição do crescimento**, com as seguintes modificações: os bloqueadores de canais foram adicionados a 15 μM para o TEA, 3 mM para o 4-AP, pré-incubados por 1 h antes da adição de WR, e 50 μM de NPPB, incubados por 10 min antes da adição de WR. Após o tempo de pré-incubação WR foi adicionado em sua DL_{100} (27,5 μM) e incubado no tempo de morte (1 h).

3.4.7 Análise do papel do K^+ na morte celular induzida por WR

Para analisar o papel do K^+ na morte celular causada por WR, realizamos o ensaio conforme descrito no item **3.1.2 ensaio da inibição do crescimento**, pré-incubando células *C. albicans* por 15 min na presença de 100 e 200 mM de cloreto de potássio ou fosfato de potássio (ambos com pH 5,6). Para o fosfato de potássio, o mesmo ensaio foi repetido em diferentes momentos, adicionando o fosfato de potássio ao mesmo tempo e 10 min após as células de levedura terem sido incubadas com WR.

3.4.8 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio endógenas (ROS) na presença de K^+

A produção de ROS foi avaliada por microscopia de fluorescência na presença de 200 mM de fosfato de potássio, conforme descrito no item **3.1.4 Análise da produção endógena de ROS** com as seguintes modificações: Inicialmente, culturas de *C. albicans* (40.000 células/mL) foram pré-incubadas com 200 mM de fosfato de potássio em pH 5,6, e subsequentemente incubadas com WR em sua DL_{100} e no início do tempo de morte, 20 min. Controles foram realizados sem adição de WR. Um tratamento também foi realizado adicionando 10% de etanol por 10 min na presença de 200 mM de fosfato de potássio pré-incubado por 20 min. O controle positivo (controle⁺) consistiu em células de *C. albicans* incubadas com 10% de etanol por 10 min a 30 °C e foi utilizado para ajustar os parâmetros de intensidade de excitação e tempo de exposição para a aquisição de imagens fluorescentes. Esses parâmetros foram utilizados para adquirir imagens dos outros tratamentos. Após o tratamento com WR, células controle e tratadas foram incubadas com 20 μ M de H_2DCFDA por 15 min antes do final do tempo de morte a 30 °C, transferidas para lâminas de vidro e cobertas com lamínulas.

3.4.9 Análise das alterações morfológicas no tempo inicial e na presença de K^+

Para analisar se alterações morfológicas ocorrem em tempos mais curtos, no início do processo de morte, e na presença de K^+ , o ensaio antimicrobiano foi repetido conforme descrito no item **3.4.1 Análise morfológica das células de *C. albicans*** com as seguintes modificações: os tempos de incubação de apenas 20 min para WR e *C. albicans*. Este ensaio também foi realizado na presença de 100 mM e 200 mM de fosfato de potássio em pH 5,6 adicionados 15 min antes de WR ao meio de cultura de *C. albicans*.

3.4.10 Análise da influência do pH na modulação da morte induzida por WR

A influência do pH foi determinada de duas maneiras: Inicialmente, o teste de viabilidade foi repetido conforme descrito no item **3.1.2 Ensaio da inibição do crescimento**, e o meio Sabouraud foi preparado com os componentes individuais, 5 g/L de peptona de carne, 5 g/L de peptona de caseína, 20 g/L de D(+) glicose tamponado com 50 mM de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico (MES) pH 6,7. Adicionalmente, o mesmo experimento descrito acima foi repetido com o meio sem a adição de glicose e pH tamponado em 5,6 com tampão 50 mM de tampão MES.

3.4.11 Avaliação da acidificação do meio extracelular induzida pela glicose

Para determinar a acidificação induzida pela glicose no meio, células de *C. albicans* cultivadas por 24 h a 30 °C foram ressuspendidas em uma concentração de 20.000.000 células/mL em 800 µL de Tris-HCl 5 mM, pH 6,0, e mantidas a uma temperatura constante de 25 °C com agitação magnética suave. O pH foi monitorado utilizando um eletrodo de vidro combinado em um medidor de pH de bancada (Q400RS, Quimis) por 5 min antes dos tratamentos para estabilização do pH. Os tratamentos foram realizados incubando as células e a DL₁₀₀ de WR (27,5 µM) simultaneamente com 200 µL de glicose 0,5 M (concentração final de 0,1 M), resultando em um volume final de 1 mL. O pH foi monitorado a cada 1 min durante 30 min. Um teste foi realizado nas mesmas condições, com 0,1 M de glicose junto com a adição de 200 mM de cloreto de potássio (pH 5,6). O controle também foi realizado nas mesmas condições, sem a adição de WR ou glicose, e um controle positivo foi realizado contendo apenas 0,1 M de glicose (Diz et al., 2006; Dušková et al., 2021; Bidiuk et al., 2022).

3.4.12 Análise de permeabilização da membrana plasmática de *C. albicans* em tempos iniciais e na presença de K⁺

O ensaio foi repetido conforme descrito no item **3.3.1 Análise de permeabilização da membrana plasmática de *C. albicans* induzida por WR**, com tempos de incubação de 0, 1, 3, 5 e 20 min, e, nesse caso, o *Sytox green* foi pré-incubado com as células por 15 min. O ensaio foi repetido com 200 mM de fosfato de potássio a pH 5,6 nos mesmos tempos. Um controle positivo foi incluído, contendo células aquecidas a 100 °C por 1 min, e um controle não tratado foi incluído para avaliar a permeabilidade basal da membrana. O ensaio de 0 min corresponde ao tempo necessário para colocar o peptídeo, retirar a alíquota para colocar nas lâminas e fazer a observação ao microscópio.

3.4.13 Análise do tempo de morte do *C. albicans* em água

Para verificar se em água WR seria mais potente contra as células de *C. albicans* um ensaio foi realizado conforme o item **3.1.2 Ensaio de inibição do crescimento** com modificações. Inicialmente as células de *C. albicans* foram incubadas em água destilada por 30 min. O ensaio foi configurado em uma placa de 96 poços (Nunc) com 2.000 células/mL da levedura, a DL₁₀₀ de WR e água destilada para completar 100 µL. O período de incubação foi estabelecido em 0 min, ou seja, apenas o tempo necessário para montar e tirar o experimento. O controle foi realizado nas mesmas condições excluindo o peptídeo. Após esse período, as células foram lavadas em água destilada e inoculadas em placas de Petri usando uma alça de Drigalski, sendo incubadas a 30 °C por 24 h para permitir a formação de colônias. O parâmetro de controle foi o tempo de morte de WR (1 h) em meio Sabouraud (Lucas et al., 2023).

3.5 Análises Estatísticas

Todos os experimentos foram realizados três vezes em triplicata, com exceção dos ensaios de microscopia óptica, que foi um experimento repetido três vezes. Testes de ANOVA de uma via foram realizados utilizando o *GraphPad Prism* versão 8.0.2 para Windows. Um valor de $P < 0,05$ é considerado estatisticamente significativo. O *GraphPad Prism* versão 8.0.2 e o *PowerPoint (Microsoft Office 365)* foram utilizados para ilustrar os dados.

4. RESULTADOS

4.1 Bloco 1: Análise do papel do estresse oxidativo na morte induzida de *C. albicans* por WR

4.1.1 Análise do papel do estresse oxidativo por antioxidantes

Para analisamos o envolvimento do estresse oxidativo na morte de *C. albicans* induzida por WR, tratamos as células com antioxidantes. Inicialmente, testamos a concentração dos antioxidantes ácido ascórbico (AA), N-acetil-L-cisteína (NAC) ou glutatona (GSH) para escolher sua maior concentração com a menor toxicidade em um ensaio de viabilidade. Escolhemos 70 mM de AA que incubado com o tempo que WR induz a morte *C. albicans* não apresentou toxicidade (Fig. 9A). Para o NAC, escolhemos 5 mM que incubados com o tempo que WR induz a morte *C. albicans* apresentou toxicidade de 3,6% (Fig. 9A). Para a GSH, foi escolhido 3 mM que incubados com o tempo que WR induz a morte de *C. albicans* apresentou toxicidade de 15,4% (Fig. 9A). O controle⁺ foi feito com ácido acético (AcA) 333 mM, um conhecido indutor de morte celular regulada em fungos com características semelhantes à apoptose (Madeo et al., 1999; Chaves et al., 2021), causou a morte de toda a população de células do ensaio (Fig. 9A). Quando coincubados tanto AA, NAC e GSH, não apresentaram proteção contra a ação tóxica do WR sobre *C. albicans* (Fig. 9A). Nenhum dos antioxidantes demonstraram proteção significativa para *C. albicans* tratadas com WR, mas apesar desse resultado não ser significativo estatisticamente, ele é diferente do 100% de morte observado quando incubamos apenas WR com *C. albicans*. Por este motivo fomos analisar se pré-incubando *C. albicans* com o antioxidante essa proteção aumentaria. Então, para verificar se pré-carregando as células com o antioxidante elas seriam salvas da morte escolhemos AA para fazermos o ensaio pré-incubando o antioxidante com as células de *C. albicans* 30 min antes da adição de WR, assim, as células estariam pré-carregadas com o antioxidante, o que prontamente eliminaria o ROS gerado e protegeria as células de *C. albicans* da morte. No entanto, nossos resultados demonstraram que nesta condição também não houve proteção significativa (Fig. 9B). Com base na ausência de proteção conferida pelos antioxidantes, nossa hipótese é que ROS podem representar um estresse inicial que estabelece ou desencadeia um mecanismo secundário executor da morte celular. Essa suposição justifica o fato de que mesmo na presença de antioxidantes, e conseqüentemente protegidas contra o estresse oxidativo, as células da levedura ainda estariam comprometidas com o processo de morte. O fato de que o WR induziu a morte de *C. albicans* de forma muito rápida (97% de morte celular em 0 h de incubação, tempo necessário para montar o experimento, conforme relatado por Lucas et al. (2023) corrobora essa interpretação. No entanto, mesmo adicionando

30 min antes de WR, nossos resultados demonstraram que AA continuou a ter a mesma resposta que quando adicionado concomitante a WR, sem proteção (Fig. 9B). Esses resultados demonstram que embora as células estivessem sob estresse oxidativo, nenhuma proteção foi observada com os antioxidantes testados, levantando a possibilidade de que, embora desempenhe um papel no processo de morte, o ROS não seja o executor final da morte celular.

(A)

Amostras (tempo de incubação de 1 h)	UFC	% de sobrevivência (proteção)	% de toxicidade (morte)
controle	221 ± 22	nd	nd
controle ⁺ (AcA)	0	0	100 ^a
Ca + 70 mM AA	231 ± 18	104,5	-4,5 ^b
WR (27,5 μM) + 70 mM AA	4 ± 2	1,7	98,3 ^a
Ca + 5 mM NAC	213 ± 20	96,4	3,6 ^b
WR (27,5 μM) + 5 mM NAC	1,3 ± 1,5	0,6	99,4 ^a
Ca + 3 mM GSH	187 ± 28	84,6	15,4 ^b
WR (27,5 μM) + 3 mM GSH	3,6 ± 3,6	1,9	98,1 ^a

(B)

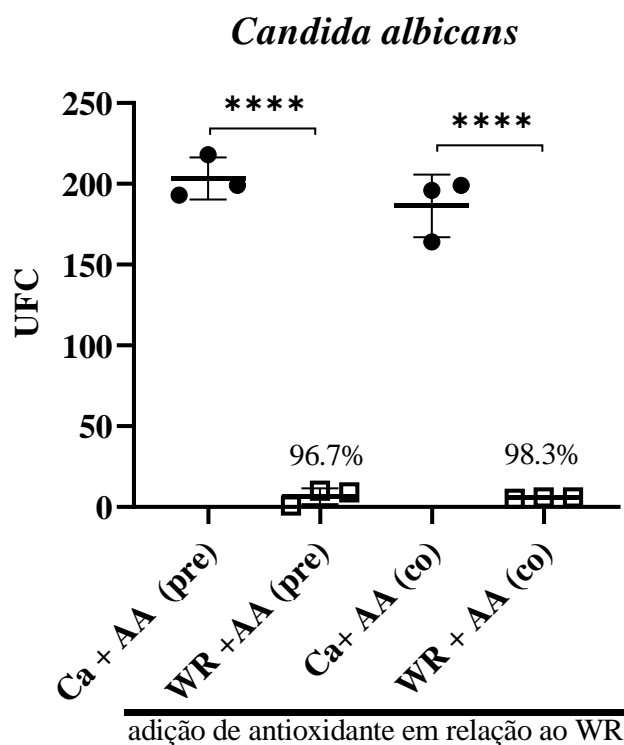


Figura 9: Correlação entre o estresse oxidativo nas células de *C. albicans* induzido por WR e a morte da levedura. (A) Ensaio de viabilidade mostrando unidades formadoras de colônias (UFC) para os tratamentos com os antioxidantes. UFC são médias ± desvio padrão (DP). O controle corresponde a células de levedura cultivadas em meio. Controle⁺ corresponde às células tratadas com ácido acético (AcA). Os controles tratados com antioxidantes foram comparados com o controle. As leveduras tratadas com WR e os antioxidantes foram comparadas com seus respectivos controles com antioxidantes. Letra diferente denota diferenças significativas e a mesma letra denota nenhuma diferença, $P < 0,05$. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três. (B) Efeito do antioxidante ácido ascórbico (AA) na atividade antimicrobiana de WR em diferentes

tempos. O AA foi adicionado antes (pré) e coincubados (co) na adição de WR às células de *C. albicans*. UFC são médias \pm DP. Os dados da coincubação foram obtidos da Tabela A. **** P <0,0001. (Ca) *C. albicans*. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.1.2 Padronização do número de células para ensaios de microscopia

Antes de começarmos os ensaios de microscopia, buscamos padronizar o número de células para validar nossos próximos ensaios de microscopia de fluorescência. Assim, um ensaio antimicrobiano usando 40.000 células/mL em vez de 2.000 células/mL dos ensaios anteriores foi feito para determinar a toxicidade de WR nesta densidade celular mais alta para ficar dentro de um limite de detecção da análise microscópica. Nosso resultado indica que WR na mesma DL₁₀₀ e tempo de morte determinado para o ensaio com 2.000 células/mL retiveram sua toxicidade para vinte vezes mais células do que o ensaio antimicrobiano original, causando perda de viabilidade celular de quase toda a população celular (Fig. 10). As unidades formadoras de colônias não foram determinadas no de controle devido ao número excessivo de colônias formadas, portanto o percentual de morte celular não foi calculado. Com esses resultados, garantimos que os sinais observados na análise microscópica são sinais que foram desencadeados por WR que levam à morte das células de *C. albicans*.

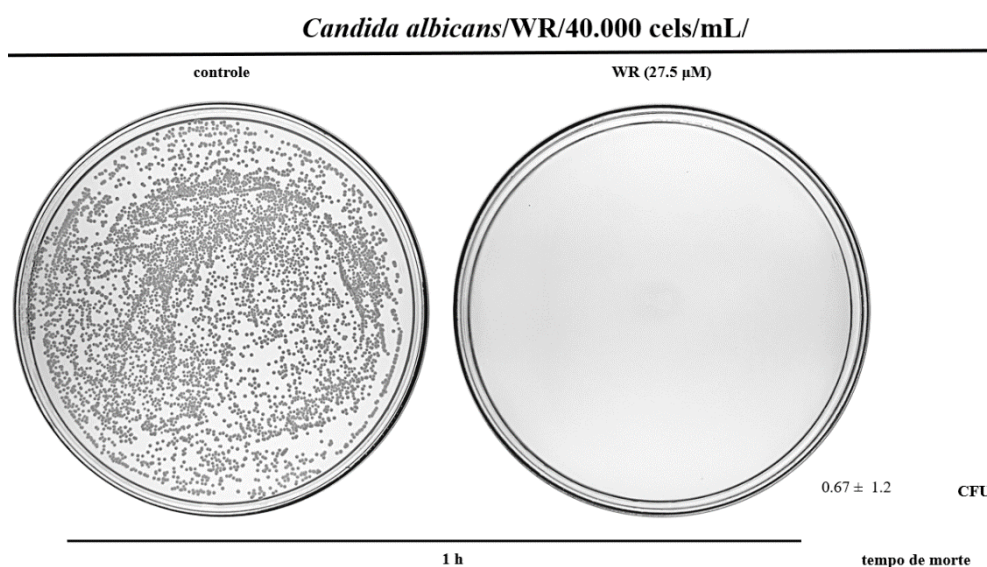


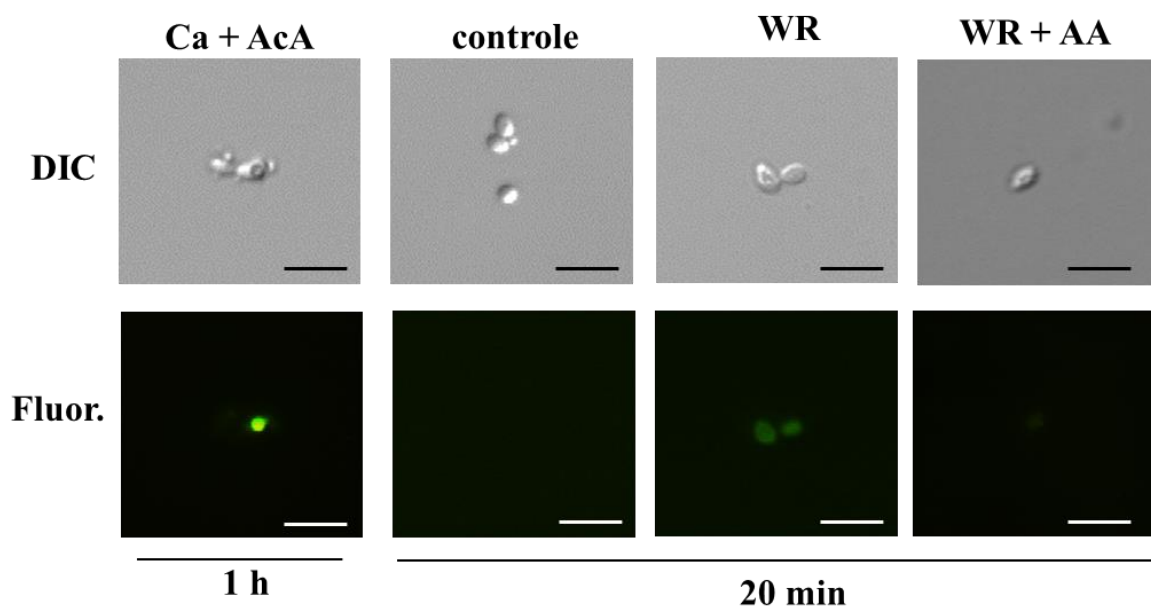
Figura 10: Atividade antimicrobiana de WR na sua DL₁₀₀ (27,5 µM) e no tempo de morte (1 h) em uma densidade celular de 40.000 células/mL. Imagens das placas de Petri do ensaio. UFC = Unidades formadoras de colônia. UFC são médias \pm desvio padrão. (-) indica número excessivo de colônias que impediu a determinação da UFC. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.1.3 Análise da produção endógena de ROS

Apesar da não proteção das células de *C. albicans* induzida por WR pelos antioxidantes, verificamos se havia a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Este ensaio foi realizado por meio do uso da sonda fluorescente H₂DCFDA. Após a incubação de *C. albicans* com WR por 20 min, observamos que 94,4% das células apresentavam

fluorescência verde no citoplasma, indicando que estavam em estresse oxidativo induzido por WR, apesar da intensidade da fluorescência em comparação com o AcA (controle positivo) ser menor (Fig. 11 A e B). A presença do antioxidante AA a 70 mM causou uma diminuição na intensidade do sinal da sonda H₂DCFDA em comparação com o tratado com WR e com o controle positivo. Apesar disso, o antioxidante AA a 70 mM não foi capaz de proteger *C. albicans* do efeito de estresse oxidativo causado por WR (Fig. 11 A e B). Destacamos que, a aquisição de imagens é feita com configurações de intensidade fluorescente e tempo de exposição idênticos, ajustados conforme seus controles positivos, para que a comparação faça sentido.

(A)



(B)

Amostras (20 min)	número de células em DIC	número de células fluorescentes	% de células em estresse oxidativo (H ₂ DCFDA positivo)
controle ⁺ (AcA)	176	171	97,1 ^a
controle	207	12	5,7 ^b
WR (27,5 μM)	178	168	94,4 ^a
WR (27,5 μM) + AA	173	137	79,2 ^a

Figura 11: Estresse oxidativo das células de *Candida albicans* induzido por WR. (A) imagens de microscopia DIC utilizando a sonda H₂DCFDA nos diferentes tratamentos. (B) Contagem de células em estresse oxidativo demonstrado em A. O controle corresponde a células de levedura cultivadas em meio. O controle⁺ corresponde às células de levedura incubadas com ácido acético (AcA). Letra diferente denota diferenças significativas e a mesma letra denota nenhuma diferença, P < 0,05. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

C. albicans tratados com WR estão sob estresse oxidativo, conforme confirmado pela análise com a sonda de detecção de ROS (Fig. 11), e dado que o peptídeo induz a morte de

97% da população celular do ensaio por 0 h (Lucas et al., 2023), suspeitamos que o efeito tóxico muito rápido do WR sobre *C. albicans* pode agir mais rápido do que a proteção conferida pelo antioxidante, mesmo que ele seja adicionado antes de WR (Fig. 9B). Esses resultados demonstram que ROS está envolvido no processo, entretanto como o fato de nenhum dos antioxidantes utilizados proteger as células da ação tóxica do WR, indicam que o estresse oxidativo não constitui o principal mecanismo que induz à morte celular.

4.1.4 Análise da funcionalidade mitocondrial na morte celular

A detecção de ROS em *C. albicans* após o tratamento com WR incentivou nossa investigação sobre a eficiência mitocondrial. Isso se deve ao fato de que as mitocôndrias são a principal fonte de ROS dentro da célula, gerados como subproduto da respiração celular devido ao escape de elétrons em uma ordem específica na cadeia de transporte de elétrons (CTE), direcionando-se diretamente para o oxigênio molecular (Blayir 2008; Kwon et al., 2015; Zhao et al., 2019). Utilizamos a sonda MitoTracker Red FM, sensível ao potencial de membrana mitocondrial, para avaliar a funcionalidade mitocondrial. É importante observar que o sinal de fluorescência dessa sonda é distinto dos demais utilizados, pois indicam inatividade quando não fluorescentes. Nota-se uma marca fluorescente ligeiramente mais intensa de MitoTracker Red FM nas células tratadas com WR por 20 min ou 1 h em comparação com o controle (Fig. 12). Esses resultados também indicam pelo sinal fluorescente mais intenso que a alteração induzida por WR começa no início da morte induzida, ou seja, 20 min (Fig. 12). O controle positivo com AcA também demonstrou um aumento na atividade mitocondrial de *C. albicans* (Fig. 12), embora em uma extensão menor em comparação com WR. Esses resultados também indicam, pelo sinal fluorescente mais intenso, que as alterações induzidas por WR começam no início da morte induzida, ou seja, 20 min (Fig. 12).

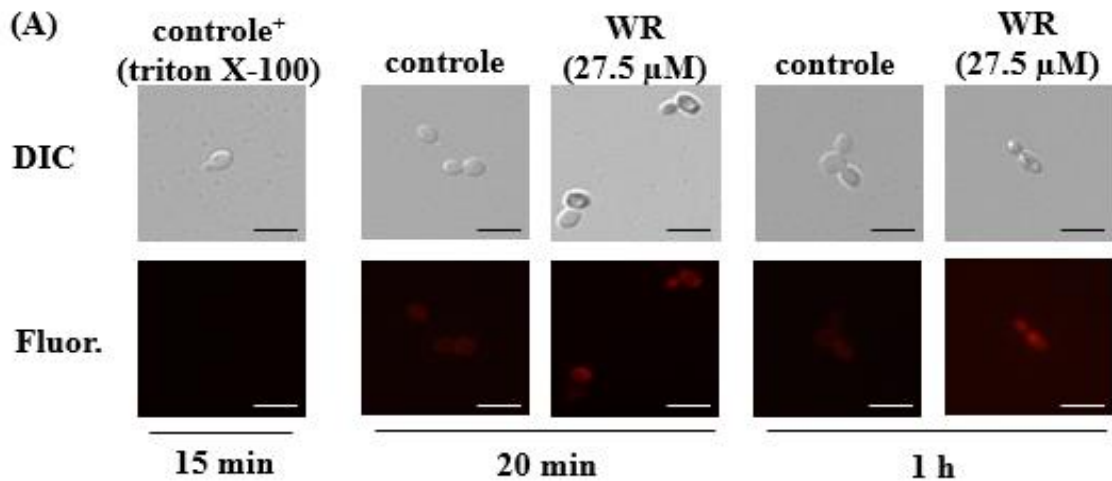


Figura. 12: Funcionalidade mitocondrial em células de *Candida albicans* tratadas com WR. Imagens microscópicas de células de *C. albicans*; a fluorescência vermelha do Mitotracker Red FM no citoplasma indica a funcionalidade mitocondrial. A barra de escala representa 10 μ m. Observe a hiperpolarização das membranas mitocondriais das células de levedura tratadas. Controle⁺ corresponde ao tratamento com Triton X-100. Os controles correspondem a células de levedura cultivadas em meio.

Conduzimos o ensaio com WST-1 para confirmar o aumento do potencial de membrana mitocondrial. Inicialmente, optamos por utilizar 40.000 células/mL, uma concentração que já havia sido padronizada para os ensaios de microscopia (Fig. 9), confirmando a atividade de WR em concentrações mais elevadas de células. Entretanto, não observamos resultados positivos dentro do tempo de incubação letal do WR para o WST-1, possivelmente devido à baixa densidade celular requerida por esse ensaio (Dados não apresentados). Portanto, o número de células deste ensaio foi dobrado para 80.000 células/mL, o que resultou em um sinal positivo (Dados não mostrados). Então testamos a atividade de WR frente a essa proporção celular e o peptídeo demonstrou manter sua atividade em concentrações mais elevadas de células inibindo 99,99% do crescimento celular (Fig. 13).

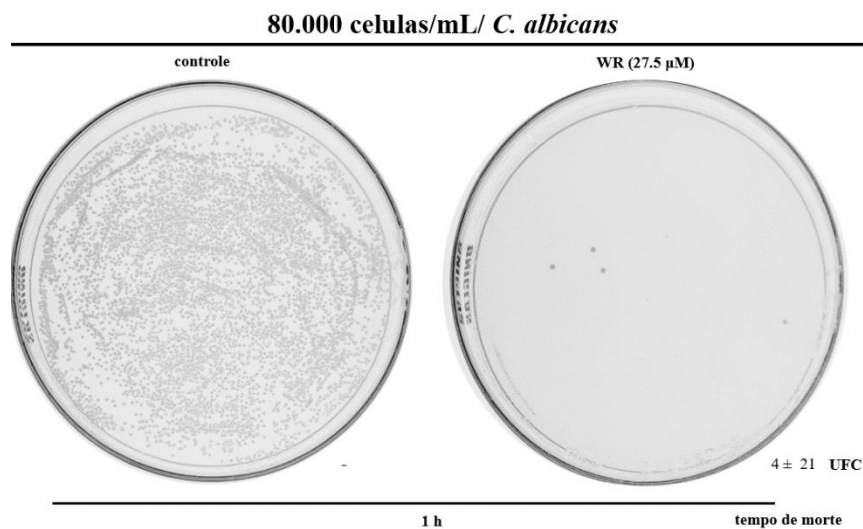


Figura. 13: Atividade antimicrobiana de WR na sua DL₁₀₀ (27,5 µM) e no tempo de morte (1 h) em uma densidade celular de 80.000 células/mL. Imagens das placas de Petri do ensaio. UFC = Unidades formadoras de colônia. UFC são médias ± desvio padrão. (-) indica número excessivo de colônias que impediu a determinação da UFC. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

Após confirmar a atividade de WR na concentração celular 80.000 células/mL realizamos o ensaio com WST-1 para estudar a atividade de NAD desidrogenases na morte celular de *C. albicans* induzida por WR. Nossos resultados indicam um aumento de 835,9% na atividade mitocondrial em apenas 20 min de incubação, mantendo-se elevado em 376,4% após 1 h, o tempo de morte (Fig. 14). O Triton X-100 causou uma inibição no acúmulo mitocondrial da sonda Mitotracker Red FM (Fig. 12) e também impediu totalmente a redução do WST-1 em células de *C. albicans* (Fig. 14). No entanto, os tratamentos com AcA e Triton X-100 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos seus respectivos controles.

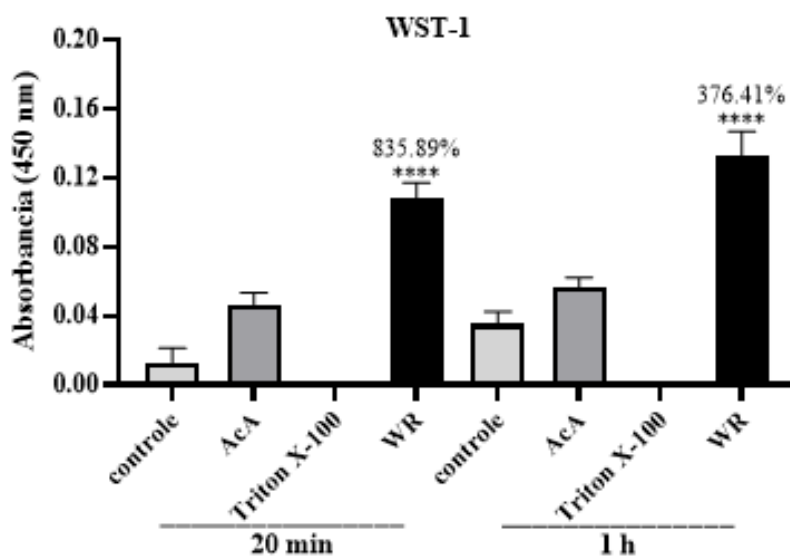


Figura. 14: Determinação da atividade metabólica mitocondrial usando WST-1. Os valores acima das barras de teste indicam a atividade mitocondrial em comparação com o controle. Os controles correspondem a células de levedura cultivadas em meio, os controles positivos correspondem ao tratamento com ácido acético (AcA) e o controle negativo corresponde ao tratamento com Triton X-100. **** P <0,0001. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

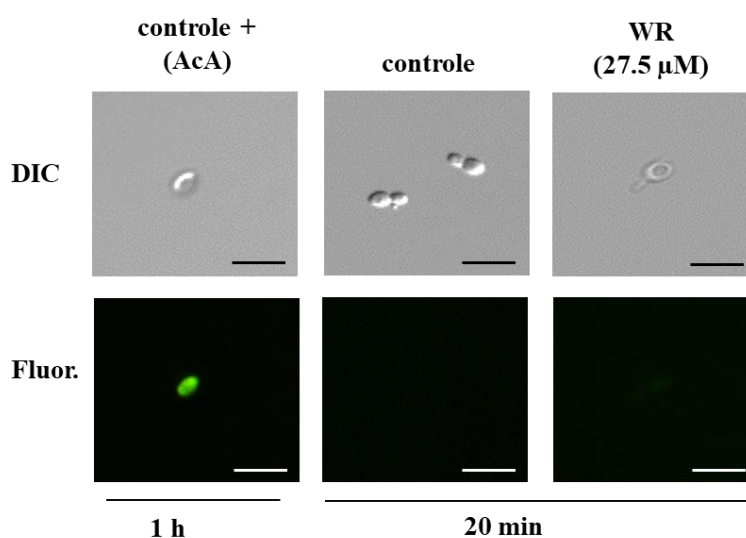
4.2 Bloco 2: Análise do tipo de morte celular induzida em *C. albicans* por WR

Nós investigamos certos fenótipos de morte celular regulada em *C. albicans* porque nossos resultados indicaram que células de *C. albicans* tratadas com WR estavam sob estresse oxidativo mediado por ROS, sendo este um papel importante na morte celular regulada com fenótipo semelhante a apoptose em leveduras (Carmona-Gutierrez et al., 2018; Madeo, et al., 2002; Kumar, et al., 2011).

4.2.1 Análise do envolvimento de metacaspases na morte celular (FITC-VAD-FMK)

Para analisar se há o envolvimento de metacaspases na morte de *C. albicans* provocada por WR, nós utilizamos o Kit CaspACE FITC-VAD-FMK para verificar se houve ativação de metacaspases nas células de *C. albicans* tratadas com WR. Nossos resultados demonstraram que *C. albicans* tratada com WR não exibiu nenhum sinal positivo no momento inicial da indução de morte por WR (Figs. 15A, B). O controle positivo feito com AcA induziu a ativação de metacaspase na levedura (Figs. 15A e B).

(A)



(B)

amostras (1 h)	número de células em DIC	número de células fluorescentes	% de células com caspases ativadas (FITC-VAD-FMK positivo)
controle ⁺ (AcA)	161	147	91,3 ^a
controle	174	0	0,0 ^b
WR (27,5 μM)	175	12	6,8 ^b

Figura 15: Análise da ativação de metacaspases em células de *Candida albicans* tratadas com WR. (A) Imagens microscópicas de células de levedura; fluorescência verde do FITC-VAD-FMK no citoplasma indica ativação de metacaspase. A barra de escala representa 10 μm. (B) Número de células com metacaspases ativadas, determinado após contagem de células em campos DIC e de fluorescência aleatórios, conforme observado em A. Letras diferentes indicam uma diferença estatisticamente significativa. P <0,05. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.2.2 Análise do envolvimento de metacaspases na morte de *C. albicans* induzida por WR pelo inibidor de pan-caspases Z-VAD-FMK

Para confirmar a contribuição de metacaspases na morte induzida por WR em *C. albicans* foi testada pelo inibidor de pan-caspase Z-VAD-FMK no ensaio antifúngico. No entanto, Z-VAD-FMK não protegeu a levedura da ação de WR. Indicando que não há o envolvimento de metacaspases na morte celular induzida por WR em *C. albicans* (Fig. 16) corroborando com os dados da não ativação de metacaspases (Fig. 15).

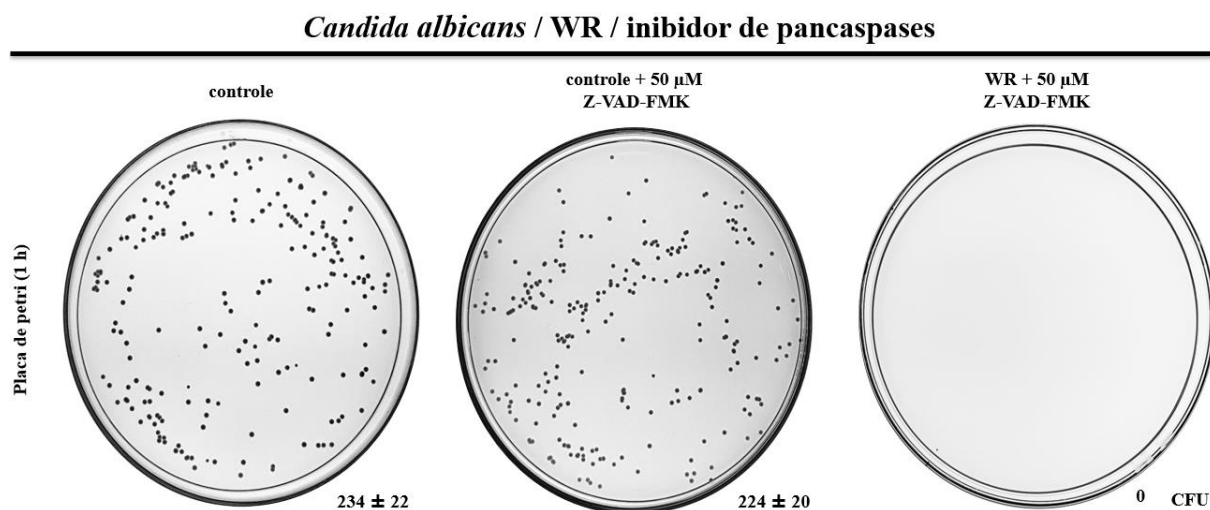


Figura 16: Ensaio de viabilidade com *C. albicans* incubada com WR na presença do inibidor de pan-caspase Z-VAD-FMK. O ensaio foi realizado no tempo morte (1 h). Imagens das placas de Petri do ensaio. UFC = Unidades formadoras de colônia. UFC são médias \pm desvio padrão O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.2.3 Análise da condensação de cromatina na morte induzida por WR

Buscamos então analisar se WR induziu a condensação de cromatina em *C. albicans*. Nossa análise revelou que as células do controle apresentavam um núcleo circular com um sinal fluorescente uniforme azulado do DAPI, enquanto as células tratadas com WR exibiam uma coloração mais intensa e pontual (Fig. 17). A coloração fluorescente foi ainda mais evidente nos tempos de incubação posteriores (Fig. 17). O mesmo padrão de coloração fluorescente também foi observado para AcA (Fig. 17).

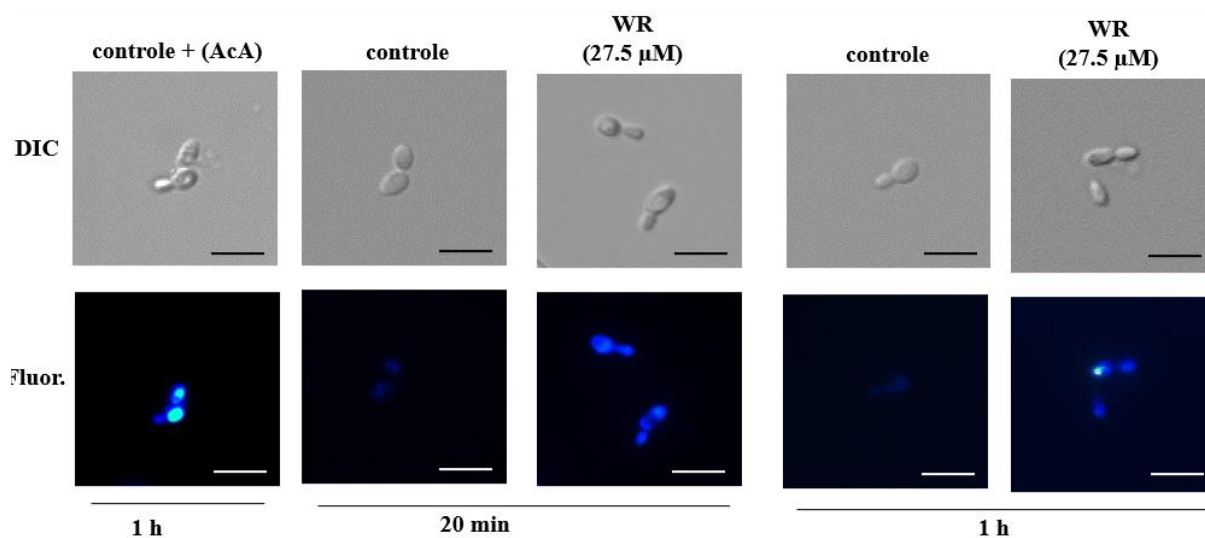
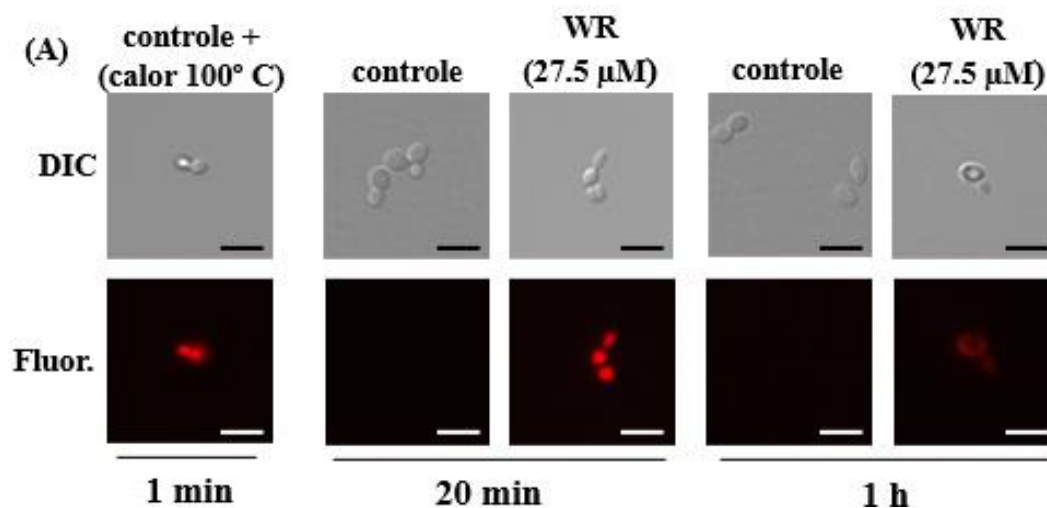


Figura 17: Detecção de condensação de cromatina por coloração com DAPI. Note que as células de controle apresentam um núcleo em forma de círculo com um sinal fluorescente uniforme, enquanto as células tratadas com o peptídeo apresentam uma coloração mais intensa e pontual, indicando condensação de cromatina. A barra de escala representa 10 μm . Controles correspondem a células de levedura cultivadas em meio. Controle⁺ corresponde a tratamento com ácido acético (AcA). O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.2.4 Análise da morte celular acidental

Para diferenciar melhor o tipo de morte celular induzida por WR, investigamos a marcação com iodeto de propídeo (IP). Nossos resultados indicaram que *C. albicans* tratada com WR mostraram marcação positiva para IP desde os 20 min de incubação até o final do tempo de morte (Fig. 18), refletindo a presença de células em morte celular acidental.



(B)

Amostras (20 min)	número de células em DIC	número de células fluorescentes	% de células ativas para necrose (IP positivo)
controle ⁺	191	187	97.9 ^a
controle	228	2	0.9 ^b

WR (27.5 μ M)	180	175	97.2 ^a
-------------------	-----	-----	-------------------

(C)

Amostras (1 h)	número de células em DIC	número de células fluorescentes	% de células ativas para necrose (IP positivo)
controle ⁺	191	187	97.9 ^a
controle	222	14	6.3 ^b
WR (27.5 μ M)	198	198	100 ^a

Figura 18: Análise da morte celular acidental em células de *Candida albicans* tratadas com WR. (A) Imagens microscópicas de células de *C. albicans* tratadas com WR e com a sonda IP. O ensaio foi realizado em tempo inicial de 20 min e no tempo de morte 1 h. A barra de escala representa 10 μ m. O número de células passando por necrose (células positivas para PI) foi determinado após a contagem celular em campos aleatórios DIC e de fluorescência após os tempos de incubação de 20 min (B) e 1 h (C). O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

Como a marcação de IP nos ajudaria a diferenciar melhor o efeito de WR, testamos tempos iniciais, a partir de 10 min e constatamos que a marcação de IP começa em 15 min de incubação (Tabela 3). Vale ressaltar que dada a velocidade com que WR induz a morte de *C. albicans*, 97% em 0 h (Lucas et al., 2023), esta marcação de IP em 15 min já seria um tempo mais avançado dentro do intervalo temporal que as células de *C. albicans* levam para morrer e por isso indicam um processo de necrose secundária (Carmona-Gutierrez, et al., 2018). Em conjunto nossos dados indicam que WR pode estar causando uma morte celular regulada (RCD, do inglês *regulated cell death*) independente de metacaspases em *C. albicans*. Adicionalmente, a presença de células positivas para IP apontou para outro resultado do efeito de WR: a permeabilização da membrana plasmática em *C. albicans* tratada com WR.

Tabela 3: Análise de morte celular acidental em células de *Candida albicans* induzidas por WR em diferentes tempos.

Amostras	número de células em DIC	número de células fluorescentes	% de células com necrose (IP positivo)	número de células em DIC	número de células fluorescentes	% de células necróticas (IP positivo)
	10 min			15 min		
controle ⁺ (calor)	160	151	94,4 ^a	171	167	97,7 ^a
controle	173	2	1,1 ^b	170	2	1,2 ^b
WR (27,5 μ M)	157	8	5,1 ^b	161	135	83,8 ^a

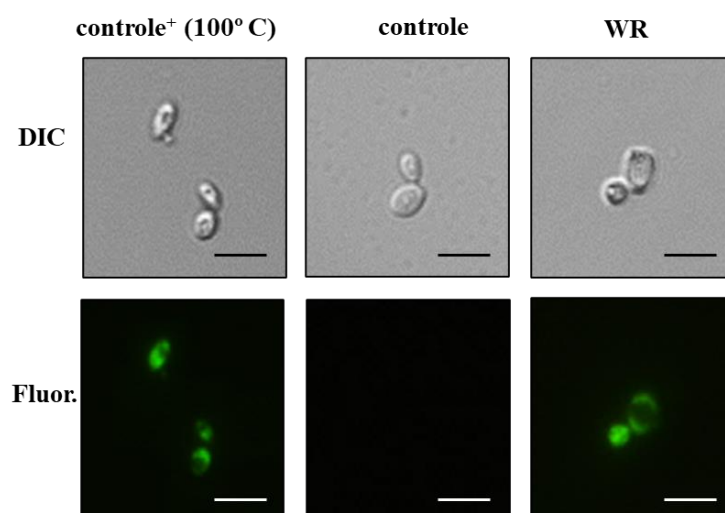
O número de células passando por morte celular acidental (células positivas para IP) foi determinado após a contagem celular em campos aleatórios DIC e de fluorescência após os tempos de incubação indicados. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.3 Bloco 3: Análise da interação de WR com lipídeos e membranas

4.3.1 Análise da permeabilização da membrana de células de *C. albicans* induzida por WR

Devido ao resultado da marcação positiva para IP que indicava um processo de permeabilização de membrana poderia estar envolvido na morte da *C. albicans* induzida por WR analisamos se WR causa permeabilização da membrana em células de *C. albicans*. Para isso utilizamos a sonda fluorescente específica *Sytox green*. Células de *C. albicans* incubadas por 20 min com WR mostraram 92,3% de células permeabilizadas (Fig. 19A e B). Para o controle positivo, células de *C. albicans* aquecidas a 100 °C por 1 min, mostraram 95,3% de células permeabilizadas, o que foi estatisticamente igual aos tratamentos (Fig. 19A e B). Para o controle sem tratamento, houve 5,8% de células marcadas com *Sytox green* o que não foi estatisticamente significativo e foi considerado um nível basal de permeabilização (Fig. 19A e B). Nossos resultados indicam que as membranas das leveduras estavam permeabilizadas, permitindo a entrada da sonda *Sytox green* (Fig. 19) em 20 min nas células tratadas com WR. Esses resultados são convergentes com o observado anteriormente para IP (Fig. 18 e Tabela 3) e demonstram que a ação de WR causa a permeabilização da membrana plasmática das células de *C. albicans* e indica que a membrana plasmática pode ser o alvo da ação tóxica de WR.

(A)



(B)

Amostras	número de células em DIC	número de células fluorescentes	% de células permeabilizadas (<i>Sytox green</i>)
controle+ (calor)	192	183	95,3 ^a
controle	206	12	5,8 ^b
WR (27,5 μM)	209	192	92,3 ^a

Figura 19: Permeabilização da membrana plasmática em *Candida albicans* tratadas com WR. (A) Imagens microscópicas de células de *C. albicans* para tratamentos com WR em 20 min (27,5 μ M). (B) Número de células permeabilizadas, determinado após a contagem de células em campos de DIC e fluorescência aleatória, conforme observado em A. A fluorescência verde de Sytox no citoplasma indica permeabilização da membrana. A barra de escala representa 10 μ m. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.3.2 Ensaio antimicrobiano com 1.000.000 células/mL

Para verificar a contribuição da permeabilização da membrana plasmática para a morte de *C. albicans* induzida por WR verificamos se a ação de permeabilização induzida por WR causa extravasamento do material citoplasmático. Antes de iniciar os ensaios de extravasamento de material citoplasmático, procuramos padronizar o número de células para validar nossos testes de absorbância em 1.000.000 células/mL. Assim, conduzimos um ensaio antimicrobiano utilizando uma densidade celular de 500 vezes maior que a densidade celular usada quando iniciamos esse trabalho (2.000 células/mL). Nossos resultados demonstraram que mantendo a mesma DL_{100} e tempo de morte determinados para o ensaio com 2.000 células/mL, o WR manteve sua toxicidade para quinhentas vezes mais células do que o ensaio antimicrobiano original, resultando em uma perda de viabilidade celular em quase toda a população celular (Fig. 20). Para o controle as unidades formadoras de colônias não puderam ser determinadas devido ao número excessivo de colônias formadas, impossibilitando o cálculo do percentual de morte celular. Com base nesses resultados, podemos garantir que os efeitos observados em análises com essa concentração celular, foram consequência da ação de WR.

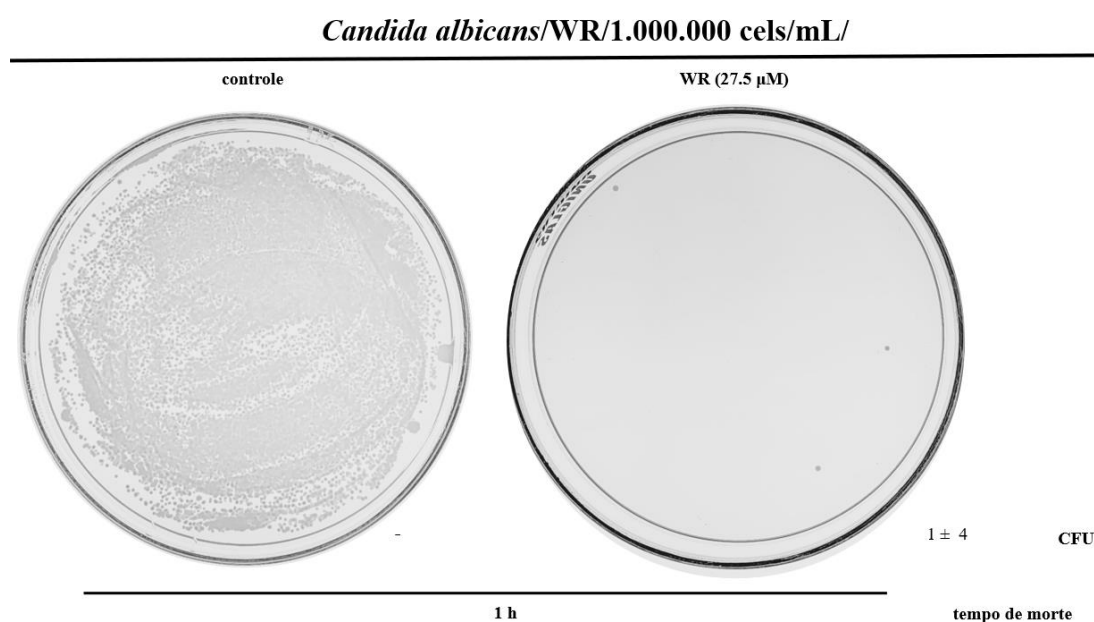


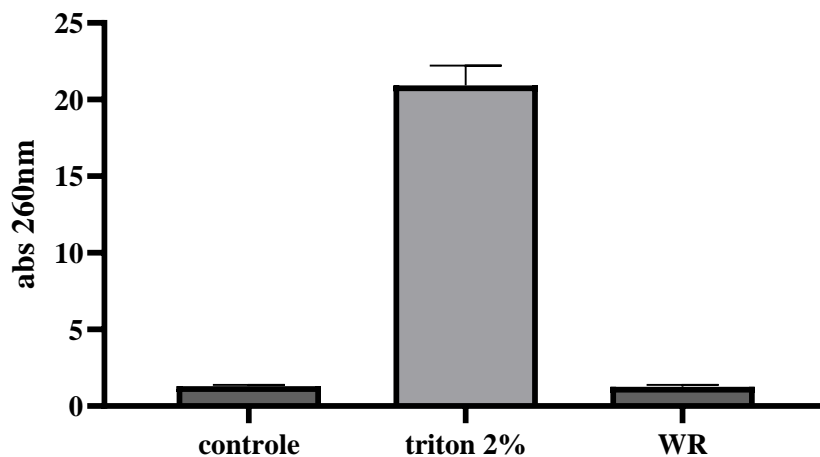
Figura 20: Teste de toxicidade de WR sobre *C. albicans* na concentração celular de 1.000.000 células/mL. imagens das placas de Petri do ensaio. UFC = Unidades formadoras de colônia. UFC são médias \pm desvio

padrão. (-) indica número excessivo de colônias que impediu a determinação da UFC. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.3.3 Análise do extravasamento de substâncias citoplasmáticas induzido por WR

Como foi observado que a membrana das células de *C. albicans* já estava permeabilizada a partir dos primeiros momentos de incubação, analisamos se WR causa a liberação de constituintes citoplasmáticos pelo aumento da absorbância a 260 e 280 nm para detecção de DNA/RNA e proteínas do citoplasma celular, respectivamente, extravasados para o meio externo. Nossos resultados indicaram que WR não foi capaz de induzir a liberação de constituintes citoplasmáticos a 260 nm e a 280 nm com 20 min de incubação (Fig. 21A e B). O controle positivo com triton X-100 induz um aumento significativo na absorbância a 260 e 280 nm, indicando que as membranas de levedura foram comprometidas. Estes resultados indicam que apesar da membrana das células da levedura estar permeabilizada permitindo a entrada das sondas IP e *Sytox green* (Figs, 18 e 19) não há extravasamento de constituintes citoplasmáticos dentro do tempo de 20 min após a interação inicial.

(A)



(B)

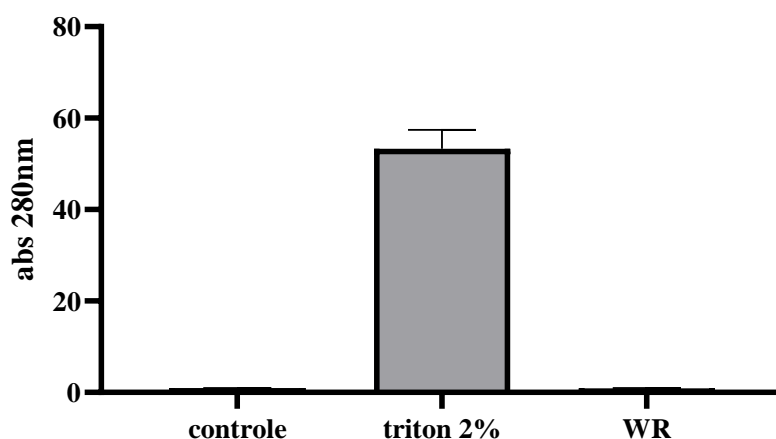


Figura 21: Extravasamento de constituintes citoplasmáticos de células de *C. albicans* incubadas com WR. (A) Aumento na absorbância a 260 nm do sobrenadante de células de *C. albicans* incubadas por 20 min com 27,5 μ M de WR. (B) Aumento na absorbância a 280 nm do sobrenadante de células de *C. albicans* incubadas por 20 min com 27,5 μ M de WR. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.3.4 Análise da interação de WR com lipídios de membrana de *C. albicans*

Para confirmar se WR interage com as membranas microbianas, analisamos se a presença de lipídios da membrana plasmática de *C. albicans* causaria alteração do espectro de dicroísmo circular de WR em uma concentração de 50 μ M, quase duas vezes mais alta, que a DL₁₀₀, de WR, mas que foi usada porque deu um sinal de dicroísmo circular (CD, do inglês *circular dichroism*) (Dado não mostrado). Inicialmente, analisamos a estrutura de WR na presença de água e dos tampões necessários para realizar a análise de CD com os lipídeos. Inicialmente, WR foi analisado por espectroscopia de dicroísmo circular em água, em 200 mM de fosfatos de potássio e sódio (necessários para a realização dos ensaios subsequentes). Em todas as três condições WR apresentou um pico negativo com espectros mínimos em aproximadamente 190 nm, o que indica que WR estava em uma conformação desestruturada (Fig. 22). Na presença de 100% de trifluoroetanol (TFE), que imita o ambiente hidrofóbico das membranas, WR mostrou espectros diferentes com um pico positivo em aproximadamente 190 nm e dois picos negativos em aproximadamente 205 e 222 nm, o que indica que no ambiente hidrofóbico WR mudou de uma conformação não estruturada para uma configuração de α -hélice (Fig. 22). Esses resultados indicam que WR está em uma configuração não estruturada em meio aquoso e assume uma conformação de α -hélice na presença de um ambiente que imita o ambiente hidrofóbico da membrana, indicando possível interação com membranas biológicas.

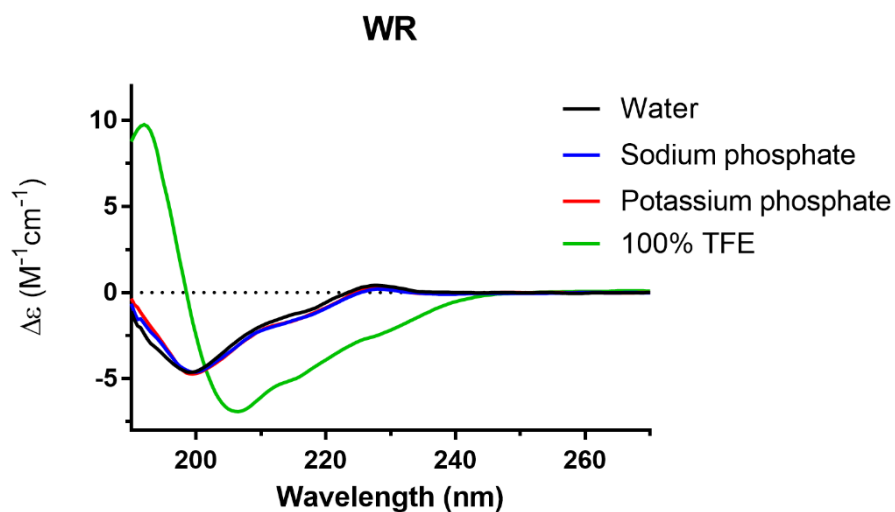


Figura 22: Espectros de dicroísmo circular (CD) no ultravioleta de WR em água (linha preta), e nos tampões fosfato de potássio a 200 mM, pH 5,6 (linha azul), fosfato de sódio a 200 mM, pH 5,6 (linha vermelha) e trifluoroetanol a 100% (TFE, linha verde). Os espectros foram registrados a 25 °C. Note que WR em água, osfato de potássio e fosfato de sódio apresentaram-se desestruturados, enquanto em TFE WR mostra uma transição para a configuração de α -hélice.

Considerando que WR formou uma α -hélice em um meio hidrofóbico, testamos se na presença de modelos membranas que imitam a membrana plasmática de *C. albicans* (Mishra et al., 2017) para avaliar se, na presença de um modelo de membrana, essa formação de α -hélice também ocorreria. WR em combinação com POPC e POPC/POPE mostraram um pico negativo com espectros mínimos em aproximadamente 190 nm, o que indica que WR está desestruturado (Fig. 23). Enquanto na presença de POPC/POPG apresentaram espectros diferentes, com um pico positivo em aproximadamente 190 nm e dois picos negativos em aproximadamente 205 e 222 nm, o que indica que na presença de modelos de membranas com lipídios carregados negativamente, ou seja, POPG, WR mudou de uma conformação não estruturada para uma configuração de α -hélice (Fig. 23). Esses resultados indicam que WR é capaz de interagir com membranas artificiais compostas por lipídeos carregados negativamente em vez de com membranas zwitteriônicas.

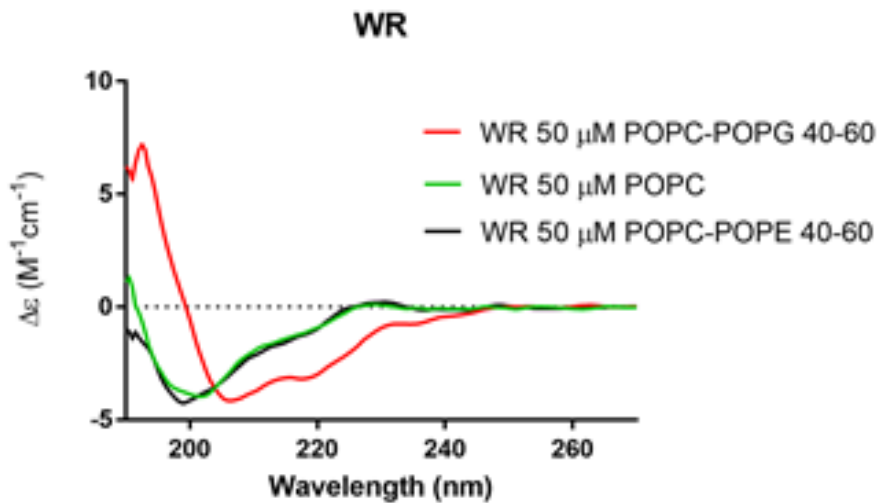


Figura 23. Espectros de dicroísmo circular no ultravioleta de WR em POPC/POPG (linha vermelha), em POPC/POPE (linha preta) e POPC (linha verde). Os espectros foram registrados a 25 °C na presença de fosfato de potássio a 200 mM, pH 5,6. Note que WR em POPC/POPE e POPC apresentou-se desestruturado, enquanto em POPC/POPG ele apresenta uma transição para a configuração de α -hélice. 40-60 indicam as proporções de lipídeos que compunham as vesículas em cada tratamento.

Também testamos WR na presença do POPS carregado negativamente, embora o sinal obtido fosse mais fraco porque na presença deste fosfolipídio observamos uma agregação que mascarou o sinal de CD (Fig. 24). Em seguida analisamos se WR na presença de ergosterol, o principal esteroide da membrana fúngica, há interferência na interação peptídeo-membrana. Não foram observadas diferenças espectrais na presença de ergosterol, o que indicou que o esteroide não interferiu na interação (Fig. 24).

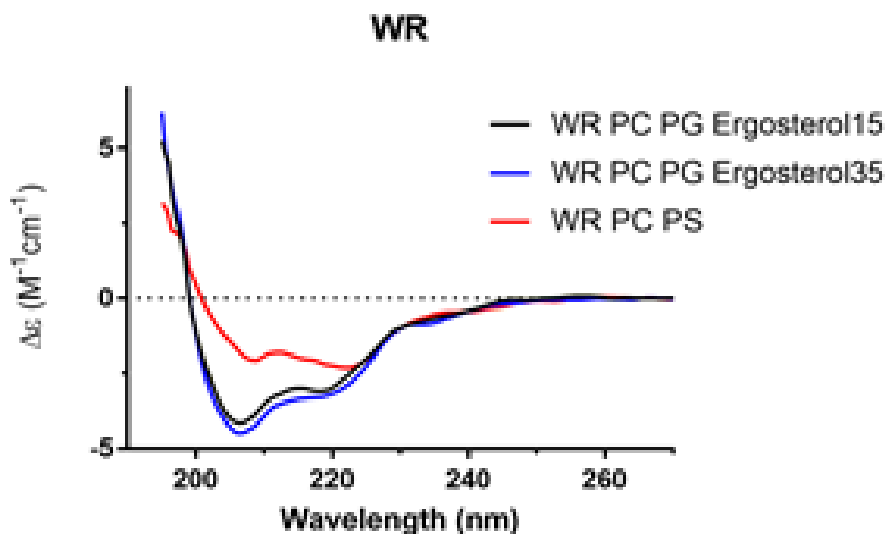


Figura 24: Espectros de dicroísmo circular (CD) no ultravioleta de WR em membranas modelo contendo ergosterol. Note que os espectros se sobrepõem, o que indica que a configuração do peptídeo não se alterou em relação à membrana de controle (POPC/POPG). 15 e 35 indicam as proporções de ergosterol testado em cada tratamento.

Em conjunto nossos resultados indicam que na presença de fosfolipídios carregados negativamente, como POPG e POPS, WR adquire a conformação de α -hélice. Essa mudança na conformação pode indicar uma interação mais forte com esses fosfolipídios do que com os fosfolipídios zwitteriônicos, confirmando a capacidade de permeabilizar membranas.

4.3.5 Cepa mutante *Candida albicans* (Δ)GCS1

Buscamos verificar a importância do esfingolipídio GlcCer na morte celular induzida por WR, visto que para algumas defensinas de plantas, peptídeos dos quais WR foi derivado, tem como alvo membranas este esfingolipídeo. Para isso utilizamos a cepa mutante de *Candida albicans* (Δ)GCS1, que não tem a enzima glicosil ceramida sintase (GCS) funcional, e que, portanto, não produz glicosilceramida, e a cepa SC5314 CA14 que é a cepa correspondente sem a deleção do gene (Δ)GCS1 que foi utilizada como controle. Nossos resultados demonstraram que WR na DL₁₀₀ e tempo de morte descritos para a cepa de *C. albicans* CE022 induziu a morte de todas as células do ensaio para ambas as cepas (Fig. 25). Este resultado indica que a atividade antimicrobiana de WR não foi influenciada, mostrando que a glicosilceramida não tem aparente interferência no processo de morte induzido por WR em *C. albicans* e também não é alvo da interação de WR como mostrado para outras defensinas de plantas.

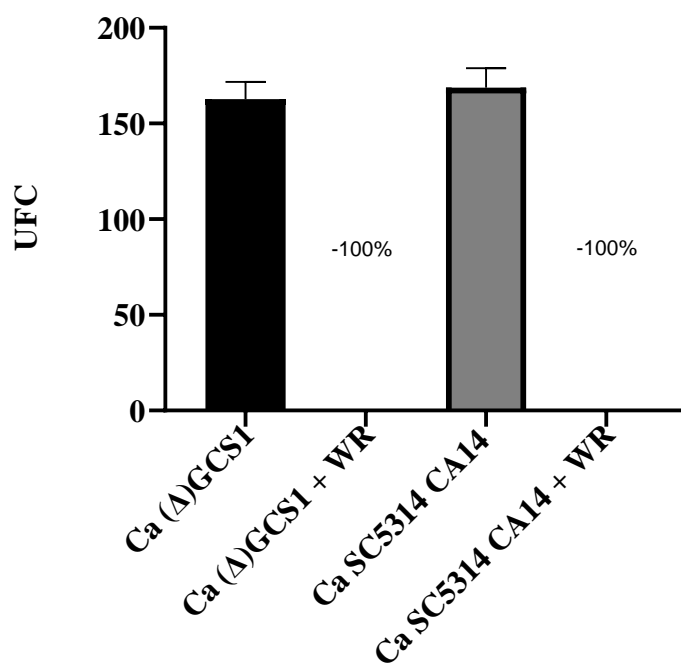


Figura 25: Análise da atividade de WR sobre a cepa mutante (Δ)GCS1, que não tem a enzima glicosilceramida sintase (GCS) funcional e, portanto, não acumula o esfingolípido glicosilceramida em suas membranas, e a cepa correspondente SC5314 CA14 que é a cepa parental sem a deleção do gene (Δ)GCS1. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.3.6 Análise da atividade hemolítica de WR

Como não observamos aparente interação de WR com lipídios de membranas de *C. albicans*, realizamos um teste de hemólise utilizando 27,5, 50 e 100 μ M de WR e eritrócitos de ovelhas. Nossos dados demonstraram que WR aumentou 10,6, 11,7 e 8,4% da liberação de hemoglobina em comparação com o controle de salina (Fig. 26) em 27,5, 50 e 100 μ M, respectivamente. Esses resultados indicam que as membranas de eritrócitos foram permeabilizadas, embora de forma fraca.

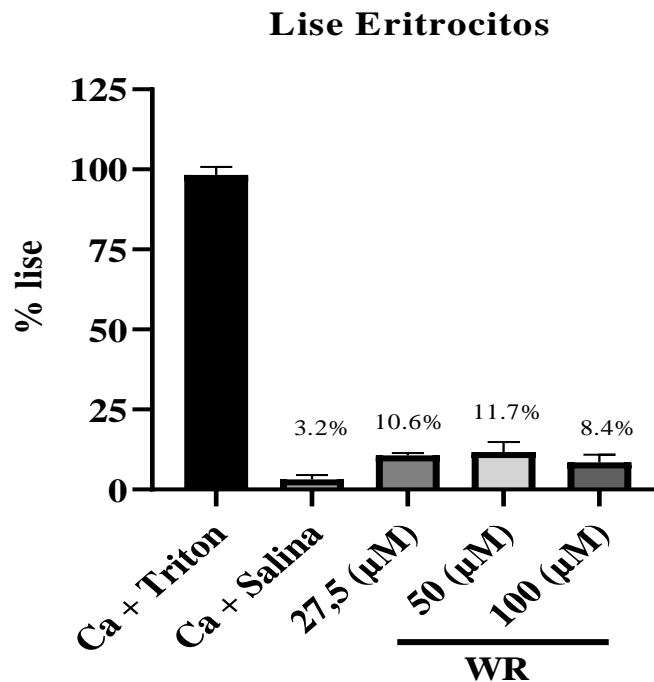


Figura 26: Atividade hemolítica de WR sobre eritrócitos de ovelhas. Os resultados são mostrados como uma porcentagem da lise total de eritrócitos considerando o controle com Triton X-100 como 100% de lise. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.3.7 Análise da importância da permeabilização na morte de *C. albicans* induzida por WR

Realizamos experimentos na presença de agentes estabilizadores osmóticos para investigar se a morte celular é impactada diretamente pela permeabilização da membrana e pelo estresse osmótico induzidos pelo peptídeo WR. Para isso, utilizamos os estabilizadores osmóticos sorbitol 1,2 M e glicerol 1,2 M que sozinhos demonstraram toxicidade de 38% e 32,4% para as células de *C. albicans*, respectivamente. Nenhum dos estabilizadores demonstrou proteger as células da morte induzida por WR (Fig. 27). Este resultado sugere que a permeabilização de membrana é um efeito secundário do processo de morte das células de *C. albicans*.

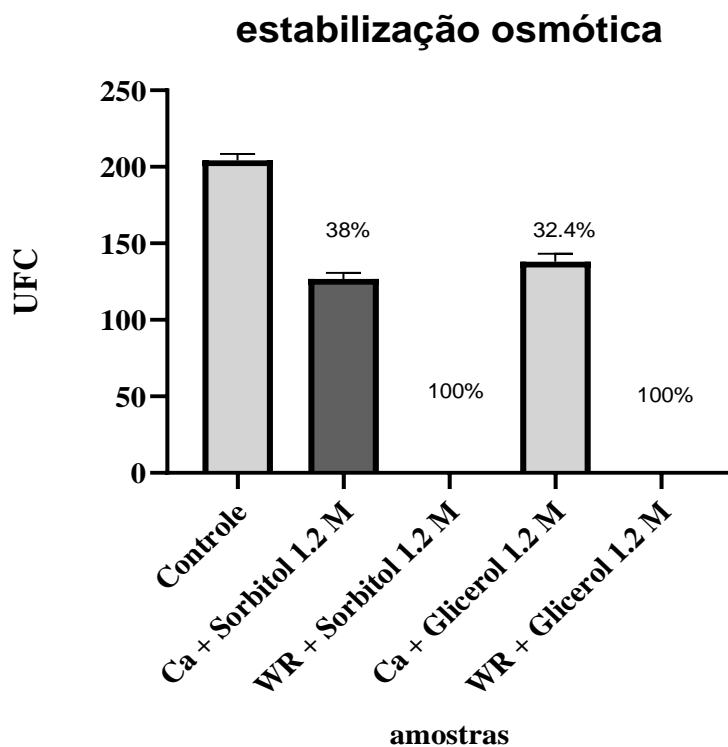


Figura 27: Análise da atividade de WR sobre *C. albicans* na presença dos estabilizadores osmóticos. UFC = Unidades formadoras de colônia. UFC são médias \pm desvio padrão. Os números acima das colunas representam as porcentagens de inibição de WR sob *C. albicans* em cada condição testada. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.4 Bloco 4: Investigação da interação de WR com as células de *C. albicans*

4.4.1 Análise morfológica de células de *C. albicans* incubadas com WR por microscopia óptica

Até aqui nossos resultados demonstraram que embora o estresse oxidativo seja uma consequência da ação de WR, não foi observada nenhuma proteção com os antioxidantes testados. Indicando que embora esteja presente no processo de morte, ROS não é o executor final da morte de *C. albicans* por WR. No entanto, durante as análises das imagens das células tratadas com WR por microscopia óptica foram observadas alterações morfológicas como granularidade do citoplasma e um aparente encolhimento celular. O efeito de encolhimento celular é relatado como característica da morte celular regulada em células de mamíferos e fungos (Baev et al., 2002; Yun et al., 2017; Lee et al., 2018). Por este motivo estas alterações foram avaliadas. Nossos dados demonstraram que o citoplasma das células tratadas após 20 min e 1 h com WR apresentavam uma aparência granular e/ou vacuolar, além de uma perceptível diminuição de tamanho celular em relação aos controles. Essas alterações também foram observadas nos controles positivos, principalmente aqueles compostos por AcA e calor (Fig. 28). Independentemente do fato de os ensaios antioxidantes não terem mostrado

proteção para *C. albicans* (Fig. 9), utilizamos AA como controle para essas análises microscópicas. Nos primeiros 20 min após a incubação não observamos qualquer proteção na redução de tamanho, mas a indução da granulosidade do citoplasma está atenuada, o que indicou que a ROS pode estar envolvida na alteração morfológica (Fig. 28). Para a tempo da morte, 1 h, foram observadas granulosidade de citoplasma e redução de tamanho (Fig. 28), o que está de acordo com a não proteção das leveduras por este antioxidante (Fig. 9).

Candida albicans / WR / alterações morfológicas

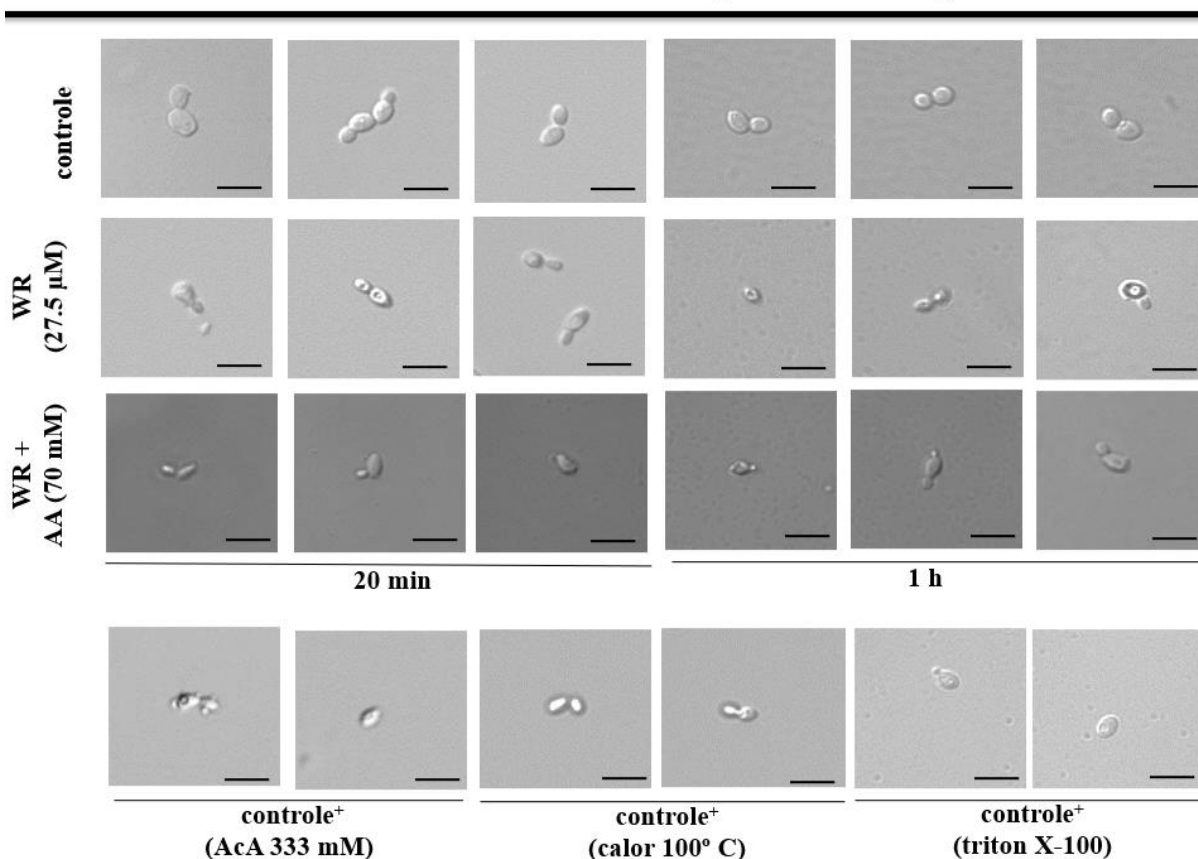


Figura 28: Alterações morfológicas e redução de tamanho nas células de *Candida albicans* tratadas WR. Imagens microscópicas de células de *C. albicans* tratadas com 27,5 μM de WR. A barra de escala representa 10 μm. AA, ácido ascórbico; AcA, ácido acético. Note a granulosidade do citoplasma e a redução no tamanho celular. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

Para confirmar o encolhimento celular visualmente observado (Fig. 28), medimos os eixos longitudinais e transversais das células no tempo de morte. As células de *C. albicans* tratadas com WR apresentaram redução de 38,3 e 33,8% para os eixos longitudinais e transversais, respectivamente (Fig. 29). Embora a AA não tivesse protegido *C. albicans* da morte, o usamos neste ensaio, como um captador de ROS, e como observado anteriormente, a redução do tamanho da célula não foi inibida e o tamanho dos eixos longitudinais e transversal foram de 38,4 e 49,5%, respectivamente, que não foram significativamente

diferentes de WR sozinho (38,5 e 33,9%) (Fig. 29). AcA, um indutor de morte celular regulada com características semelhantes à apoptose em fungos (Madeo et al., 1999; Chaves et al., 2021), provocaram uma redução nos eixos longitudinal e transversal em 30,6 e 26% em *C. albicans*, respectivamente (Fig. 29). Este resultado indica que as células de *C. albicans* tratadas com WR estavam sofrendo um encolhimento celular. Em células de mamíferos o encolhimento celular é característico de diversos tipos de morte celular regulada (Arrigoni et al., 2002). Em fungos, o encolhimento celular foi caracterizado em *C. albicans* e o efluxo de íons, especialmente do K^+ , foi apontado como causa do encolhimento (Baev et al., 2002; Yun et al., 2017; Lee et al., 2018), o que corrobora nossos dados indicando RCD como o tipo de morte causado por WR em *C. albicans*. Com a análise destes dados, sugerimos que o desbalanço de íons, principalmente o K^+ , poderia estar envolvido nesse processo de morte celular induzido por WR *C. albicans*. Estes resultados levantam duas possibilidades, o encolhimento celular é reflexo do efluxo do íon K^+ , ou este desbalanço do íon K^+ pode ser o outro sinal desencadeado por WR que é independente do estresse oxidativo que leva as leveduras à morte.

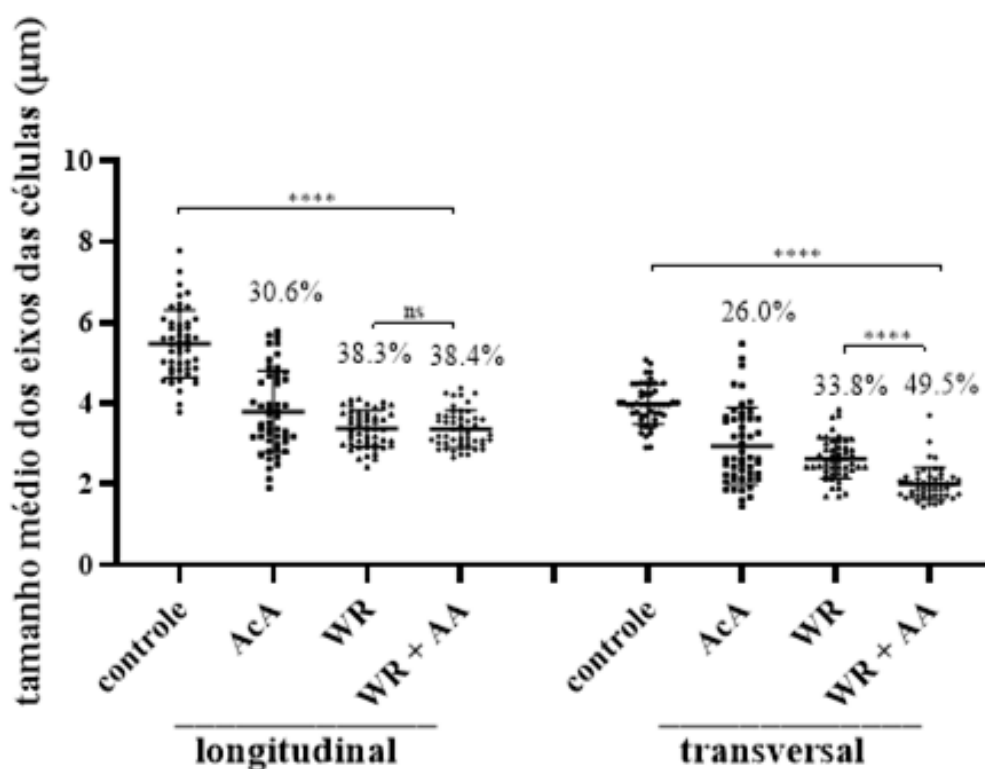


Figura 29: Comprimento dos eixos longitudinal e transversal das células de *C. albicans*. Os números percentuais indicam uma redução do eixo em relação aos seus controles respectivos. Os controles correspondem a células de levedura cultivadas em meio, controle⁺ corresponde a tratamentos com AcA, calor ou Triton X-100. **** P <0,0001. (ns) indica não significativamente diferente. O tamanho médio de cada amostra para *C. albicans* para o eixo longitudinal é: controle 5,4 µm, AcA 3,7 µm, WR 3,3 µm, WR+AA 3,3 µm. O tamanho médio de cada

amostra para *C. albicans* para o eixo transversal é: controle 3,9 µm, AcA 2,9 µm, WR 2,6 µm, WR+AA 2,0 µm. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.4.2 Determinação do efeito tóxico de 5-FAM_WR com células de *C. albicans*

Antes de investigarmos o papel do K^+ na morte celular de *C. albicans* induzida por WR verificamos se a interação de WR com as células de *C. albicans* era prejudicada pelo íon como relatada para vários AMPs a perda da atividade inibitória na presença de cátions (Smith et al., 1996; Goldman et al., 1997; Ganz e Lehrer, 1999). Então, inicialmente, excluímos a possibilidade de WR perder seu efeito antimicrobiano na presença do íon K^+ , devido à neutralização das cargas em suas superfícies e nas células de levedura, impedindo assim a interação inicial necessária para o efeito tóxico do peptídeo, como comumente descrito para diversos AMPs (Smith et al., 1996; Goldman et al., 1997; Ganz e Lehrer, 1999). Para avaliar isso utilizamos WR conjugado com o fluoróforo 5-FAM, denominado 5-FAM_WR, para analisar sua interação com as células da levedura. Inicialmente, para confirmar que não houve perda do efeito tóxico nas leveduras ao conjugarmos WR com o fluoróforo 5-FAM em seu N-terminal, realizamos o ensaio antimicrobiano na presença de WR marcado com 5-FAM na DL_{100} e no tempo de morte. Os resultados indicaram que 5-FAM_WR mata toda a população de células do ensaio como o WR não conjugado, mostrando que não houve perda do efeito tóxico de WR conjugados ao fluoróforo 5-FAM (Fig. 30).

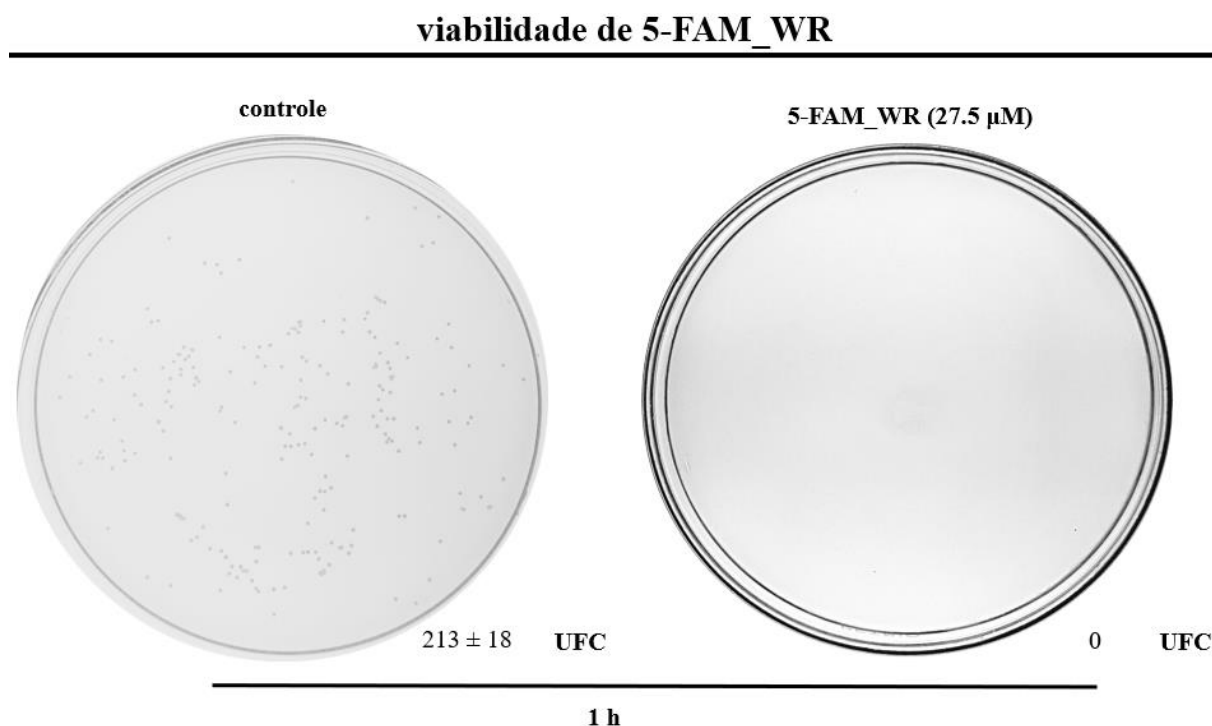


Figura 30: Atividade antimicrobiana de 5-FAM_WR na sua DL_{100} e no tempo de morte (1 h) sobre *Candida albicans* (2.000 células/mL). A não formação de colônias no tratado indica que 5-FAM_WR não perdeu

atividade biológica com a marcação do fluoróforo. Imagens das placas de Petri do ensaio. UFC = Unidades formadoras de colônia. UFC são médias \pm desvio padrão. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.4.3 Análise da interação de 5-FAM_WR com as células de *C. albicans*

Em seguida, analisamos a interação de WR com as células de *C. albicans* usando microscopia confocal. Utilizamos 20 min de tempo de incubação para compreender mais sobre o início do processo de morte celular induzido por WR. Observamos que em 20 min, o sinal de fluorescência acoplado a WR dentro da área delimitada pelas paredes celulares de leveduras marcadas com calcofluor white (fluorescência azulada), indicando que 5-FAM_WR (fluorescência verde) entra no citoplasma das células de *C. albicans* (Fig. 31). Além disso, é possível notar que, nos tratamentos com 5-FAM_WR, áreas próximas ao broto marcavam mais intensamente pelo sinal fluorescente, indicando que 5-FAM_WR provavelmente foi internalizado próximo a esse local. Adicionalmente, em todas as imagens há uma área oval escura, sem a marcação de 5-FAM, que acreditamos ser a vacúolo (Fig. 31). Com base nesse resultado, concluímos que WR entra nas células de levedura e que essa entrada ocorre nos momentos iniciais após a interação. Além disso, esses resultados indicam que WR pode ter um alvo citoplasmático, o que será investigado no futuro.

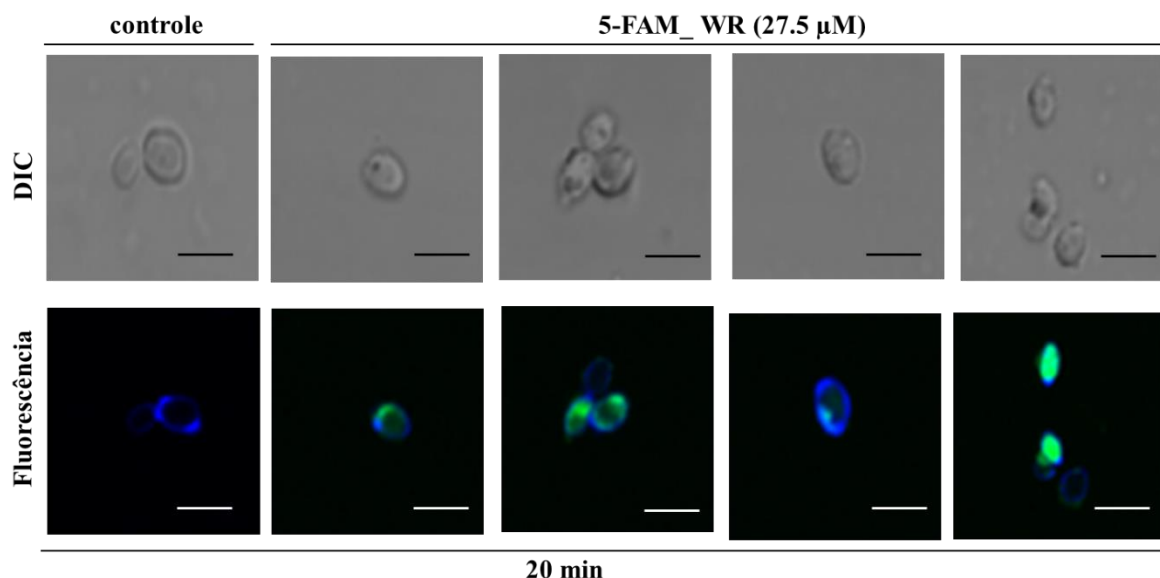


Figura 31: Interação de 5-FAM_WR com células de *Candida albicans*. Imagens microscópicas de células de *C. albicans* incubadas na presença de 5-FAM_WR. A fluorescência verde no citoplasma indica a presença do peptídeo. Em todas as imagens, a fluorescência azul indica marcação da parede celular da levedura com calcofluor white. Controles referem-se a tratamentos sem adição de WR. As fotos referem-se a observações de colocalização sob um microscópio confocal com aumento de 63x. A barra de escala representa 10 µm. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.4.4 Análise da estrutura de WR por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) em água e na presença de K⁺

Para verificar se há perda de interação de WR com as células de *C. albicans* devido à neutralização de carga pelo K⁺, verificamos se há uma mudança na conformação de WR na presença de K⁺ por meio do CD. Nossos resultados indicam sobreposição entre os espectros obtidos em água e na presença de K⁺, indicando que WR não sofre alterações estruturais na presença de K⁺ que possam explicar ou ser responsáveis por sua inativação (Fig. 32). Este resultado corrobora com os dados do CD com WR nos tampões para a estabilização das SUVs onde também não foram observadas alterações (Fig. XXXX). Análises de CD não foram realizadas com KCl pois o íon Cl⁻ causou interferência espectral e consequente perda do sinal do CD.

Análise da estruturação de WR na presença de K⁺

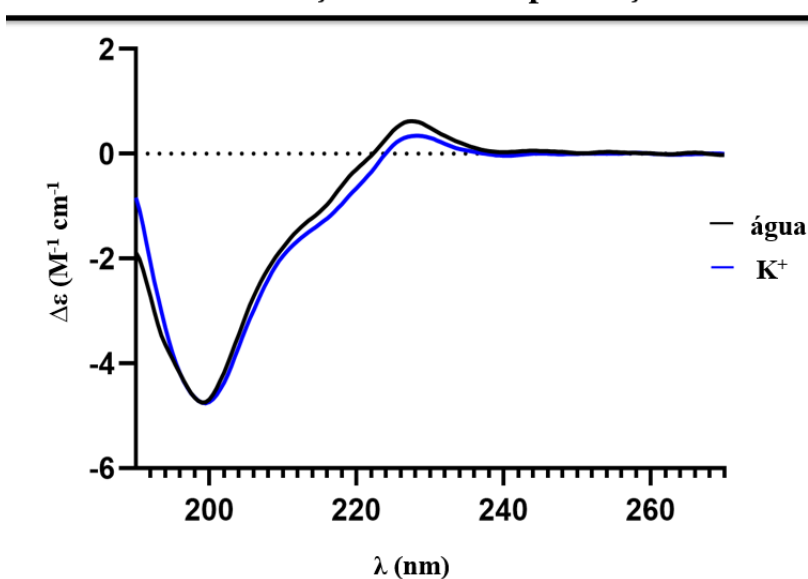


Figura 32: Espectros de dicroísmo circular no ultravioleta do peptídeo WR em água (linha preta) e em soluções de fosfato de potássio a 200 mM com pH 5,6 (K⁺) (linha azul). Os espectros foram registrados a 25 °C. Note que WR, tanto em água quanto em solução com K⁺, apresentou os mesmos espectros, o que indica que o K⁺ não interfere na estrutura do peptídeo. Os espectros também indicam que, nessas condições, WR está sem estrutura definida. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.4.5 Determinação da interação de 5-FAM_WR com células de *C. albicans* na presença de K⁺

Para compreender se há perda de interação entre o peptídeo e as células de levedura mediada pelo bloqueio de carga, repetimos o ensaio confocal na presença de K⁺ pelo mesmo tempo de incubação, 20 min. Células de *C. albicans* pré-incubadas por 15 min na presença de 200 mM de fosfato de potássio, exibiram uma alteração na marcação de CalcoFluor White 2%, que foi mais fraca do que a marcação de células incubadas sem K⁺, mas apesar dessas

diferenças em relação ao tratamento sem a adição de K^+ , 5-FAM_WR continua localizado dentro da célula (Fig. 33). Esses resultados indicam que WR não perdem sua interação com as células de levedura na presença de K^+ . A relevância dessas descobertas será discutida abaixo. Para uma discussão das concentrações de sal utilizadas, consulte o item **3.4.7 Análise do papel do K^+ na morte celular induzida por WR** nos resultados.

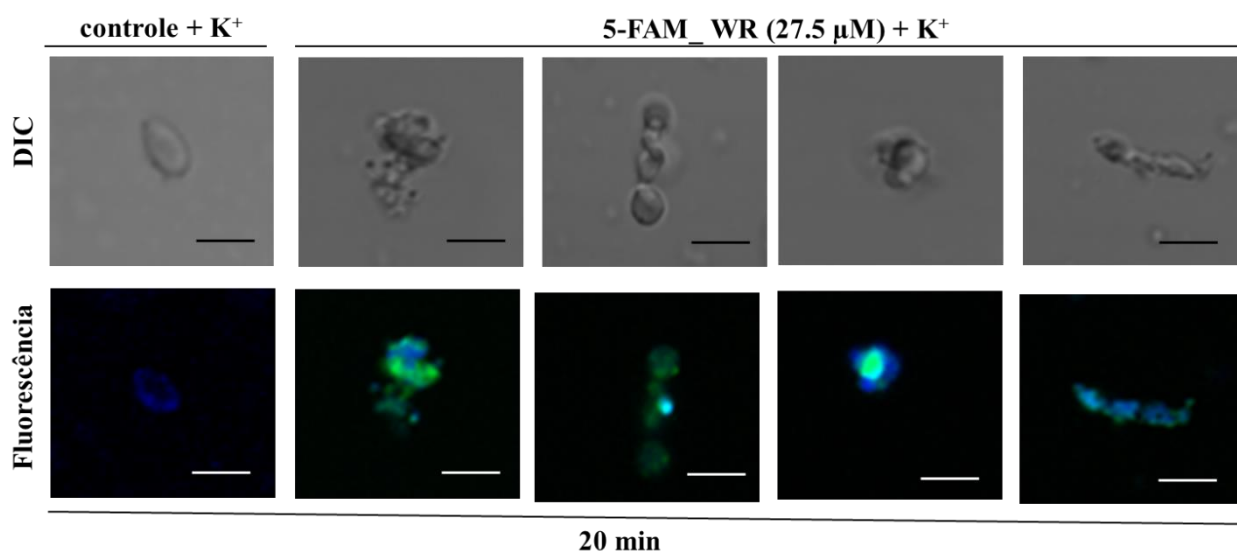


Figura 33: Interação de WR com o fluoróforo 5-FAM com células de *C. albicans* na presença de K^+ . Imagens microscópicas de células de *C. albicans* incubadas na presença de 5-FAM_WR e o íon K^+ . A fluorescência verde no citoplasma indica a presença do peptídeo. Em todas as imagens, a fluorescência azul indica marcação da parede celular da levedura com calcofluor white. Controles referem-se a tratamentos sem adição de WR. As fotos referem-se a observações de colocalização sob um microscópio confocal com aumento de 63x. K^+ refere-se à presença de 200 mM do sal $K_2HPO_4 + K_2HPO_4$ pré-incubado por 15 min antes da adição do peptídeo. A barra de escala representa 10 μm . O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.4.6 Análise dos canais de K^+ e Cl^- na morte celular induzida por WR

Como nossos resultados indicaram que o íon K^+ não prejudica a interação de WR com as células de *C. albicans*, começamos a investigar o envolvimento desse íon na morte de *C. albicans* induzida por WR. Primeiramente, para compreender a influência do íon K^+ na morte celular induzida por WR, com base no encolhimento celular, a qual em fungos é mediada pelo efluxo de K^+ , utilizamos os bloqueadores de canais de K^+ dependentes de voltagem TEA e 4-AP, pré-incubados com as células de *C. albicans* por 1 h, e também o bloqueador de canal de Cl^- NPPB, pré-incubado com as células de *C. albicans* por 10 min para bloquear o efluxo iônico. TEA e 4-AP bloqueiam o canal de efluxo Tok1p, um canal de K^+ dependente de voltagem ativado pela despolarização da membrana plasmática (Li et al., 2018; Andrés et al., 2019), enquanto o NPPB inibe a abertura dos canais aniônicos, incluindo o de Cl^- , que está envolvido na manutenção do estado iônico eletricamente neutro da célula (Tanida et al., 2006). Inicialmente, foi realizado um teste para selecionar a concentração mais alta dos

inibidores que apresentasse a menor toxicidade para as leveduras. Os ensaios de viabilidade na presença de inibidores de canais de K^+ e Cl^- foram realizados usando os parâmetros da DL_{100} e tempo de morte de WR, $27,5 \mu M$ e 1 h. Escolhemos $15 \mu M$ de TEA que não mostrou toxicidade e $3 mM$ de 4-AP que demonstrou 12,5% de toxicidade em 1 h de incubação, o tempo de morte induzida por WR (Fig. 34), e para o NPPB escolhemos $50 \mu M$, que mostrou 56,6% de toxicidade em 1 h de incubação para *C. albicans* (Fig. 34). Nossos resultados demonstraram que nenhum dos bloqueadores de canais testados foi capaz de proteger as células de *C. albicans* da morte induzida por WR (Fig. 34). Apesar da não modulação da morte induzida por WR na presença de bloqueadores de canais, a toxicidade observada no teste de padronização de concentração indica que os bloqueadores utilizados estavam tendo um efeito nos canais, pois afetaram a viabilidade celular. Nossos resultados indicam que os canais de K^+ e Cl^- , e, portanto, o efluxo iônico, não parecem estar envolvidos na morte induzida por WR, considerando nossa hipótese de que se o efluxo de K^+ fosse a causa da morte das leveduras, e, portanto, inibir o efluxo de K^+ por bloqueadores deveria conferir proteção, o que não foi observado.

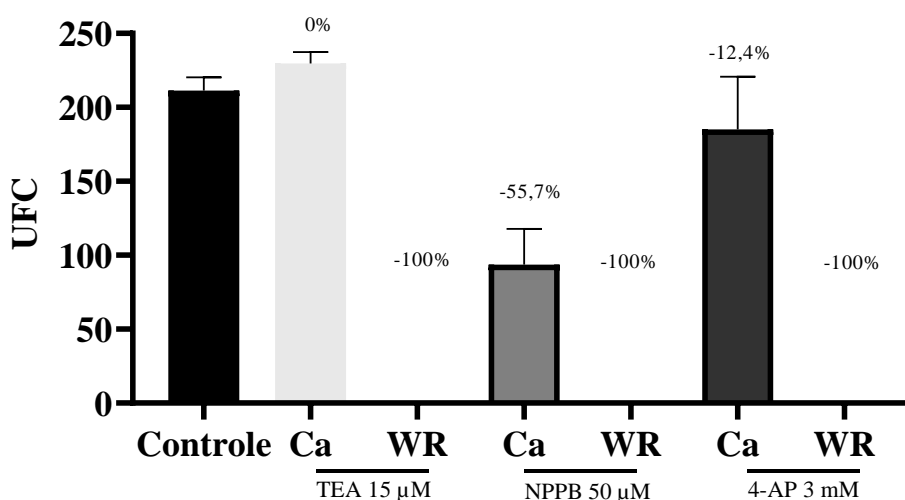


Figura 34: Viabilidade de *Candida albicans* (Ca) incubadas com WR na presença dos inibidores de canais de K^+ TEA e 4-AP, e do canal de Cl^- NPPB. Acima das barras, é mostrado o percentual de inibição em relação ao controle refere-se apenas a levedura e meio. Ca refere-se as células de levedura e meio, e o respectivo inibidor. UFC refere-se aos valores de unidades formadoras de colônias. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.4.7 Análise do papel do K^+ na morte celular induzida por WR

Experimentos de bloqueio de efluxo de K^+ não modularam a morte induzida por WR, então usamos outra abordagem e expusemos células de *C. albicans* ao K^+ adicionando-o exogenamente ao meio, supondo que as células de levedura estavam perdendo o íon, como indicado pelo encolhimento celular, para estudar seu papel na morte induzida por WR.

Portanto, realizamos o ensaio antimicrobiano adicionando separadamente 100 mM de cloreto de potássio e 100 mM de fosfato de potássio ao meio de cultura de *C. albicans*, pré-incubando-os 15 min antes de adicionar a DL₁₀₀ de WR e subsequente incubação com o tempo de morte. Escolhemos essa concentração de sal porque está próxima à concentração citoplasmática de K⁺ em leveduras, que em geral é cerca de 200 a 300 mM, incluindo *Candida* (Ariño et al., 2010). Observamos que os sais em si eram tóxicos para as células de levedura. Para as células de *C. albicans*, incubadas com 100 mM de cloreto de potássio por 1 h, o tempo de morte induzido por WR de 1 h, houve uma toxicidade de 11,9% (Tabela 4). Para 100 mM de fosfato de potássio, a toxicidade para as células de *C. albicans* incubadas por 1 h, a toxicidade foi de 3,6% (Tabela 1C). Todos os dados de toxicidade apresentados referem-se à comparação com controles sem a adição de sal. Nossos resultados indicaram que, para *C. albicans* incubadas com WR por 1 h, a proteção foi de 14,2% (Tabela 1C). Para 100 mM de fosfato de potássio e *C. albicans* e incubadas com WR por 1 h, a proteção foi de 13,3% (Tabela 1C). Os resultados com WR foram comparados com os controles dos respectivos sais. Embora não tenha havido proteção significativa da morte induzida por WR em *C. albicans* por 100 mM dos sais, no ensaio pré-incubado é possível ver uma pequena proteção, considerando que, na condição sem sais, WR induz a morte de todas as células no ensaio (Tabela 4). Por esse motivo, dobramos a concentração de íons para verificar se a pequena porcentagem de proteção observada aumentaria. Para fazer isso, repetimos o ensaio pré-incubando as leveduras com 200 mM dos sais previamente testados. Esta concentração está mais próxima da concentração intracelular do íon para leveduras (Ariño et al., 2010). Nossos resultados indicaram que, a 200 mM, os sais em si também mostraram toxicidade às células de *C. albicans*. O cloreto de potássio foi tóxico em 30,2%, e o fosfato de potássio foi tóxico em 37,6% (Tabela 4). Nossos resultados demonstraram que, para células pré-incubadas com 200 mM de cloreto de potássio e 200 mM de fosfato de potássio, 15 min antes da adição de WR, a proteção observada foi de 69,77% e 51,30%, respectivamente (Tabela 4). Esses resultados indicam que a adição exógena de íons K⁺ 15 min antes da adição de WR protege *C. albicans* induzida por WR. Além disso, ao comparar os sais utilizados, como cloreto de potássio (KCl) e fosfato de potássio (K₂HPO₄ + KH₂PO₄), e o efeito protetor observado, concluímos que os ânions fosfato (PO₄⁻²) e cloro (Cl⁻) não têm interferência aparente no resgate das células de levedura da morte induzida por WR, sendo o efeito protetor conferido pelo íon K⁺, o elemento comum de ambos os sais utilizados. Como o íon K⁺ é relatado como um dos agentes envolvidos no processo de morte celular (Arrigoni et al., 2002; Baev et al., 2002 Yun e Lee, 2017; Lee et al., 2018), escolhemos continuar os testes com ele, mas no

futuro investigaremos o envolvimento de outros íons como Na^+ e Ca^{+2} , porque alguns estudos mostram que esses íons se desregulam com o efluxo de K^+ das células (Lauf e Santa-Maria, 2010).

Tabela 4: Influência de sais na morte de *C. albicans* induzida por WR na DL_{100} e tempo de morte. As leveduras foram pré-incubadas por 15 minutos na presença de sais de KCl, K_2HPO_4 + K_2HPO_4 , nas concentrações de 100 e 200 mM.

Condição/15 min de pré-incubação	Amostras (1 h)	UFC	% de sobrevivência (proteção)	% de toxicidade (morte)
sem sal	controle	212 ± 10	100	0 ^a
	WR (27,5 µM)	0 ± 0	0	100 ^b
KCl (100 mM)	controle	187 ± 11	88,0	11,9 ^a
	WR (27,5 µM)	26 ± 14	14,2	85,7 ^b
KH_2PO_4 + K_2HPO_4 (100 mM)	controle	205 ± 12	96,3	3,61 ^a
	WR (27,5 µM)	27 ± 5	13,3	86,6 ^b
Condição/15 min de pré-incubação	Amostras (1 h)	UFC	% de sobrevivência (proteção)	% de toxicidade (morte)
sem sal	controle	204 ± 11	100	0 ^a
	WR (27,5 µM)	0 ± 0	0	100 ^b
KCl (200 mM)	controle	142 ± 7	69,7	30,2 ^c
	WR (27,5 µM)	74 ± 7	47,7	52,2 ^c
KH_2PO_4 + K_2HPO_4 (200 mM)	controle	127 ± 8	62,3	37,6 ^c
	WR (27,5 µM)	65 ± 2	48,7	51,3 ^c

Os valores das UFC (unidades formadoras de colônias) são médias ± desvio padrão. Os controles correspondem às células de levedura sem os WR. As leveduras tratadas com os WR em cada sal foram comparadas com seus respectivos controles na presença de sal. A toxicidade do sal foi calculada comparando o controle na presença do sal com os controles sem a adição de sal. A porcentagem de sobrevivência foi calculada comparando os tratados na presença do sal com o tratado sem a presença do sal. Letra diferente denota diferenças significativas e a mesma letra não denota diferença, $P < 0,05$. O resultado é representativo de um ensaio de três. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

Resultados anteriores demonstraram que as células de levedura tratadas com os WR estavam passando por estresse oxidativo (Fig. 11). Os antioxidantes ácido ascórbico (AA), bem como o N-acetil-L-cisteína (NAC), ou γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glicina (GSH) não foram capazes de reverter o efeito tóxico causado por WR em *C. albicans*. Por esse motivo, sugerimos que além do estresse oxidativo deve haver um segundo sinal desencadeado que leva à morte da levedura, o que poderia ser o íon K^+ , considerando seu papel fundamental na regulação de volume celular em fungos (Baev et al., 2003; Andrés et al., 2008; Han et al., 2016; Yun e Lee, 2016; Lee e Lee, 2017; Yun e Lee, 2017). Outra possibilidade é que as células atinjam temporal e fisiologicamente um ponto de não retorno, ou seja, uma vez que a

célula atinge esse ponto, não há mais reversão da morte. Também foi observado que após 15 min já havia coloração positiva para IP para *C. albicans* incubada com WR, indicando que provavelmente após 15 min as células de levedura já haviam ativado a via que as leva à morte. Para verificar se a proteção fornecida pelo K^+ diminui após a adição de WR, e entender se eles poderiam ser o segundo sinal que leva à morte da levedura, foi adicionado ao mesmo tempo e após a adição de WR. Nos ensaios em que 200 mM de fosfato de potássio foi adicionado ao mesmo tempo que WR, a proteção observada foi de 4,4% para as células *C. albicans* (Fig. 35). Quando 200 mM de fosfato de potássio foi incubado 10 min após a adição de WR, não houve proteção das células de *C. albicans* (Fig. 35). Não foram realizados ensaios de WR com a adição de K^+ a partir de 20 min após a adição do peptídeo, pois não foi mais observada proteção após 10 min (Fig. 18). Esses resultados corroboram nossas observações anteriores, de que a partir de 15 min as células de levedura já ativaram a via que leva à morte após a indução por WR (Fig. 18). Esses resultados também indicam que íons como K^+ estão envolvidos no processo, mas que não são os executores que levam à morte, considerando que quando adicionados após a adição de WR não há mais proteção contra a morte, ou seja, a célula não pode mais ser salva do efeito tóxico de WR. Chamamos essa fenômeno de "ponto de não retorno" e acreditamos que ele seja atingido até os 5 min, considerando a não proteção do K^+ adicionado 10 min depois e a inibição de 97% das colônias em 0 h de incubação (Toledo et al., 2021). É provável que os íons K^+ sejam um sinal intermediário no processo de morte induzida por WR, assim como o AA.

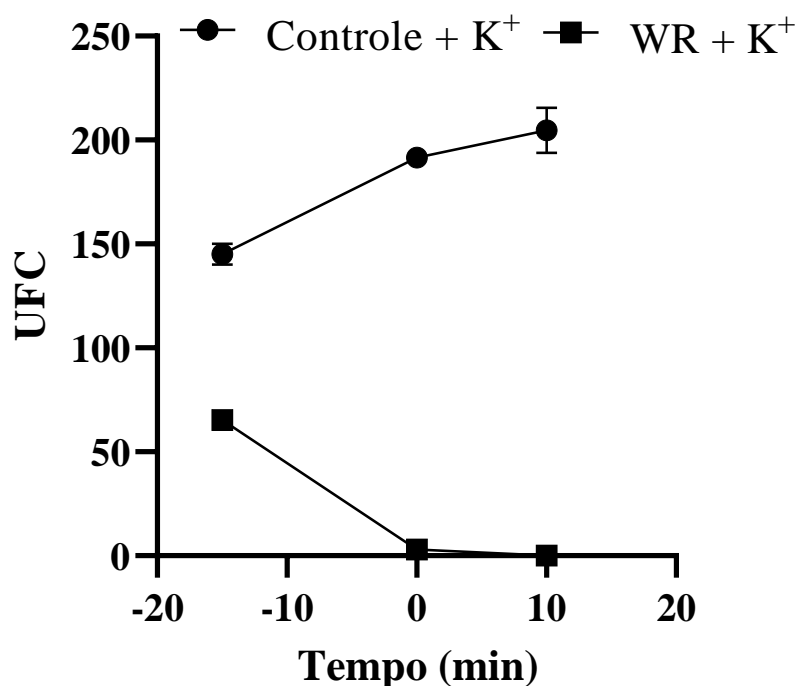


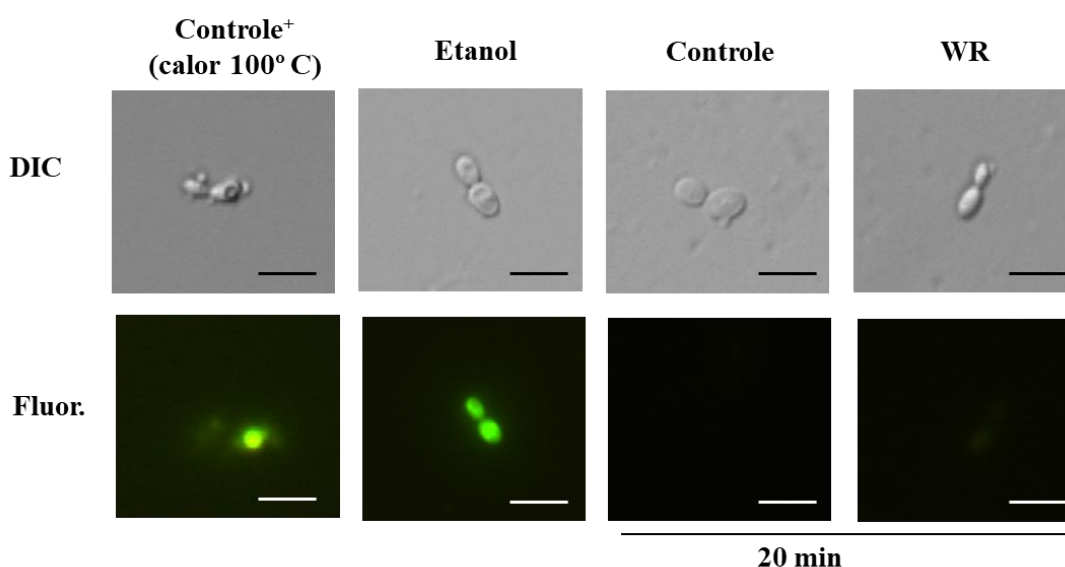
Figura 35: Viabilidade de *Candida albicans* incubadas com WR na presença de K⁺ em diferentes momentos (pré-incubação, coincubação e pós-incubação) em relação à adição de WR. Os dados de pré-incubação foram retirados da figura 32. UFC refere-se a unidades formadoras de colônias. K⁺ refere-se à presença de 200 mM do sal K₂HPO₄ + K₂HPO₄. (-15 min representa a pré-incubação 15 min antes da adição de WR, 0 min representa a coincubação ao mesmo tempo que WR e 10 min representa a pós-incubação, 10 min após a adição de WR). O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.4.8 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio endógenas (ROS) na presença de K⁺

Anteriormente, foram observados efeitos intracelulares, como encolhimento celular, granulação citoplasmática e estresse oxidativo em células de levedura tratadas no tempo de morte de WR. Para verificar se esses efeitos já estavam ocorrendo no início do tempo de morte (20 min) e se continuavam a ocorrer na presença de K⁺, analisamos as mudanças morfológicas, como o encolhimento celular e o estresse oxidativo na presença do íon K⁺. Ao analisar a produção endógena de ROS, verificamos que no controle⁺ incubado com 10% de etanol, 93,9% das células de *C. albicans* estavam em estresse oxidativo (Fig. 36). Quando 10% de etanol foi incubado na presença de 200 mM de fosfato de potássio, 84,1% das células de *C. albicans* mostraram estresse oxidativo (Fig. 36). Na presença de 200 mM de fosfato de potássio, houve um sinal positivo de 97,4% para estresse oxidativo (Fig. 36). Para as células controle, sem adição de etanol ou WR, observou-se que 19,7% das células estavam sob estresse oxidativo (Fig. 36). A presença de ROS intracelular em células tratadas com WR e na presença de K⁺ indica que a proteção conferida pelo íon não é causada pelo bloqueio da

produção de ROS, uma vez que as células tratadas com WR apresentaram estresse oxidativo e o íon K^+ não reverteu os efeitos intracelulares como o estresse oxidativo, apesar de ter provocado uma aparente diminuição no sinal de ROS em comparação com o anteriormente observado (Fig. 9). Esse resultado reforça novamente a hipótese de que o K^+ não é o executor, mas um sinal intermediário no processo de morte das leveduras induzido por WR. Em conjunto, esses resultados confirmam que a proteção observada na presença do íon não está ocorrendo por meio do bloqueio de carga, pois WR causando efeitos intracelulares, como o estresse oxidativo.

(A)



(B)

Amostras	número de células em DIC	Número de células fluorescentes (H2DCFCD)	% de células em estresse oxidativo (H2DCFCD)
controle ⁺	215	202	93,9 ^a
etanol + K^+	202	170	84,1 ^a
controle	198	39	19,7 ^b
WR (27,5 μ M) + K^+	227	221	97,4 ^a

Figura 36: Estresse oxidativo das células de *Candida albicans* induzido por WR. (A) imagens de microscopia DIC utilizando a sonda H₂DCFCD nos diferentes tratamentos. (B) contagem de células em estresse oxidativo demonstrado em A. O controle corresponde a células de levedura cultivadas em meio. Letra diferente denota diferenças significativas e a mesma letra denota nenhuma diferença, $P < 0,05$. K^+ refere-se à presença de 200 mM do sal $K_2HPO_4 + K_2HPO_4$ pré-incubado por 15 min antes da adição do peptídeo. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

4.4.9 Análise das alterações morfológicas no tempo inicial e na presença de K^+

Para analisar o encolhimento celular na presença de K^+ , medimos os eixos longitudinal e transversal das células de *C. albicans* pré-incubadas com K^+ por 15 min e por mais 20 min

com WR. As células de *C. albicans* tratadas com WR sem a presença de K^+ mostraram uma redução de 33,2% e 39,9% para os eixos longitudinal e transversal, respectivamente (Fig. 35). Embora 100 mM de fosfato de potássio não tenha sido capaz de proteger *C. albicans* da morte, também utilizamos essa concentração neste ensaio, pois havíamos observado pouca proteção no ensaio de viabilidade, comparado ao WR em que todas as células são mortas (Tabela 4) e queríamos confirmar se essa proteção também ocorria para o efeito de encolhimento celular. Para 100 mM de fosfato de potássio em *C. albicans*, observamos uma redução de 30,1% no eixo longitudinal e uma redução de 29,5% no eixo transversal, uma proteção de 3,1% e 10,4% em relação aos tratamentos sem K^+ (Fig. 37). Para 200 mM de fosfato de potássio, a redução no eixo longitudinal foi de 24,4%, e para o eixo transversal a redução foi de 25,3%, o que corresponde a uma proteção de 8,8% e 14,6%, respectivamente (Fig. 37), confirmando o resultado observado anteriormente (Tabela 4). Para todos os tratamentos, a proteção observada no encolhimento celular não foi total e foi estatisticamente diferente em comparação com o controle (células e meio) para ambos os eixos (Fig. 37), o que indica que a proteção foi parcial. Além disso, notamos que na presença de 200 mM de fosfato de potássio, o citoplasma de *C. albicans* parecia sofrer menos efeitos de granulação/vacuolização observados anteriormente, no entanto, apesar disso, o efeito de redução de tamanho continua ocorrendo, reforçando a hipótese de que o provável efluxo de K^+ é um efeito secundário nas células induzido por WR. Essa proteção parcial também foi observada no ensaio de viabilidade (Tabela 4). O controle positivo feito com 333 mM de ácido acético (AcA), conhecido por induzir morte celular regulada em fungos com características semelhantes à apoptose (Chaves et al., 2021), resultou em uma redução nos eixos longitudinal e transversal de 20,2% e 20,4% em *C. albicans*, respectivamente (Fig. 37). Esses resultados indicam que WR causa efeitos intracelulares a partir dos primeiros minutos de interação, e que os efeitos intracelulares continuam a ocorrer mesmo na presença de K^+ , corroborando que o K^+ não dificulta a interação de WR com as células da levedura.

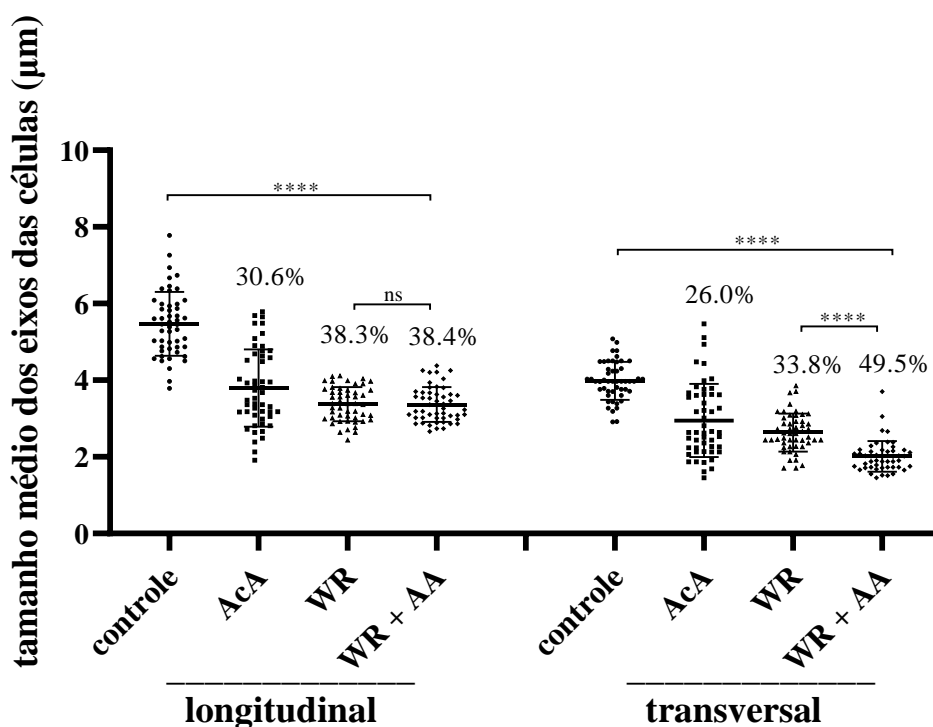


Figura 37: Análise do encolhimento celular nas células *Candida albicans* tratadas com WR e na presença do íon K^+ . Acima das barras é mostrado a porcentagem de redução do tamanho do eixo em relação ao controle. K^+ refere-se a presença 200 mM do sal $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$.

4.4.10 Análise da influência do pH na modulação da morte induzida por WR

A proteção da morte induzida por peptídeos em leveduras conferida pelo K^+ adicionado ao meio tem semelhança com os resultados da proteção conferida pelo K^+ na morte induzida por glicose em *S. cerevisiae* na fase estacionária (Granot et al., 2003; Bidiuk et al., 2022). Nesse fenômeno, o metabolismo da glicose causa a acidificação do pH intracelular, estimula a extrusão de H^+ pela H^+ -ATPase de membrana Pma1, causando acidificação do meio externo, aumentando os potenciais transmembrana ($\Delta\psi$) e químico (ΔpH) e induzindo ROS. Nesse fenômeno, o K^+ protege a levedura da morte porque dissipa o $\Delta\psi$ e a proteção também é conferida quando o pH do meio externo é tamponado em pH 7,0 (Bidiuk et al., 2022). Inicialmente, analisamos se o aumento do pH externo dissiparia o ΔpH criado pela acidificação do meio e protegeria as células de *C. albicans* da morte induzida por WR, como mostrado na morte induzida por glicose em *S. cerevisiae* (Bidiuk et al., 2022). Nossos resultados demonstraram que, quando incubadas em meio tamponado com 50 mM de MES pH 6,7, as células de *C. albicans* não foram protegidas da ação tóxica de WR neste meio com pH 6,7 (Tabela 5). Quando o mesmo ensaio foi repetido sem a adição de glicose tamponado no mesmo pH do meio Sabouraud, pH 5,6, condição que não induziria acidificação do meio devido à ausência de um açúcar fermentável, inibindo assim a

acidificação do meio externo (ver abaixo), também não houve proteção das células de *C. albicans* da ação tóxica WR (Tabela 5). Esses resultados indicam que a mudança externa no pH não modula a atividade de WR na morte induzida em células de *C. albicans*. Este resultado já nos deu uma indicação de que o efeito protetor do K⁺ na morte induzida por WR pode não tem um mecanismo semelhante ao descrito por Bidiuk et al. (2022).

Tabela 5: Correlação entre pH e a morte de *C. albicans* induzida por WR na DL₁₀₀ e no tempo de morte. As leveduras foram incubadas em meio contendo 5 g/L de peptona de carne, 5 g/L de peptona de caseína, 20 g/L de D(+) glicose tamponado com 50 mM de ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico (MES) pH 6,7. Adicionalmente, foi repetido o mesmo experimento descrito acima sendo o meio sem a adição de glicose e pH tamponado em 5,6.

Amostras (1 h)	UFC	% de sobrevivência (proteção)	% de morte (toxicidade)
controle + sem glicose	205 ± 10	100 ^a	0 ^b
WR (27,5 µM) + sem glicose	0 ± 0	0 ^a	100 ^a
controle + MES (pH 6,7)	186 ± 12	100 ^a	0 ^b
WR (27,5 µM) + MES (pH 6,7)	0 ± 0	0 ^b	100 ^a

Os valores das UFC (unidades formadoras de colônias) são médias ± desvio padrão. Os controles correspondem às células de levedura sem a presença de WR. As leveduras tratadas com WR em cada meio foram comparadas com seus respectivos controles. Letra diferente denota diferenças significativas e a mesma letra não denota diferença, P < 0,05. O resultado é representativo de um ensaio de três.

4.4.11 Avaliação da acidificação do meio extracelular induzida pela glicose

Para confirmar se o efeito de acidificação do meio externo estava relacionado à indução da morte de *C. albicans* causado por WR, as células de levedura foram ressuspensas em tampão Tris-HCl 5 mM, pH 6,0, e o pH do meio externo foi monitorado minuto a minuto por 30 min. Nos controles, não foi observada nenhuma alteração no pH externo, como esperado, com o pH extracelular permanecendo estável em cerca de 6,0 para *C. albicans* (Fig. 38). A presença de glicose induziu uma acidificação gradual do pH externo, atingindo pH 4,8 aos 30 min (Fig. 38). WR estimulou fortemente a acidificação do meio externo em *C. albicans* para 5,7 no primeiro minuto, o declínio da curva de acidificação entre o primeiro e o segundo minuto de monitoramento, atingindo pH 5,7, e subsequentemente a acidificação do meio foi inibida, com o pH ficando 5,8 aos 30 min (Fig. 38).

Para confirmar o efeito protetor do K⁺ observado anteriormente no ensaio de viabilidade (Tabela 4), adicionamos 200 mM de KCl combinado a 0,1 M de glicose e, nessas condições, *C. albicans* não acidificou o meio externo, com o pH extracelular permanecendo estável (Fig. 38). Nesse contexto, a proteção contra a morte induzida por WR pelo K⁺ parece ser causada pelo bloqueio da formação do ΔpH e corrobora os dados de que a proteção não é causada pela neutralização de cargas entre o peptídeo e a superfície celular. Esses resultados também indicam que a H⁺-ATPase pode estar envolvida no processo e estudos futuros

investigarão o envolvimento da bomba e se a H⁺-ATPase é o alvo direto de WR. Devido a esses resultados, incluindo a presença de ROS em células de levedura tratadas com K⁺, refutamos a hipótese de que a proteção oferecida pelo K⁺ seja a dissipação do $\Delta\psi$, como demonstrado por Bidiuk et al. (2022).

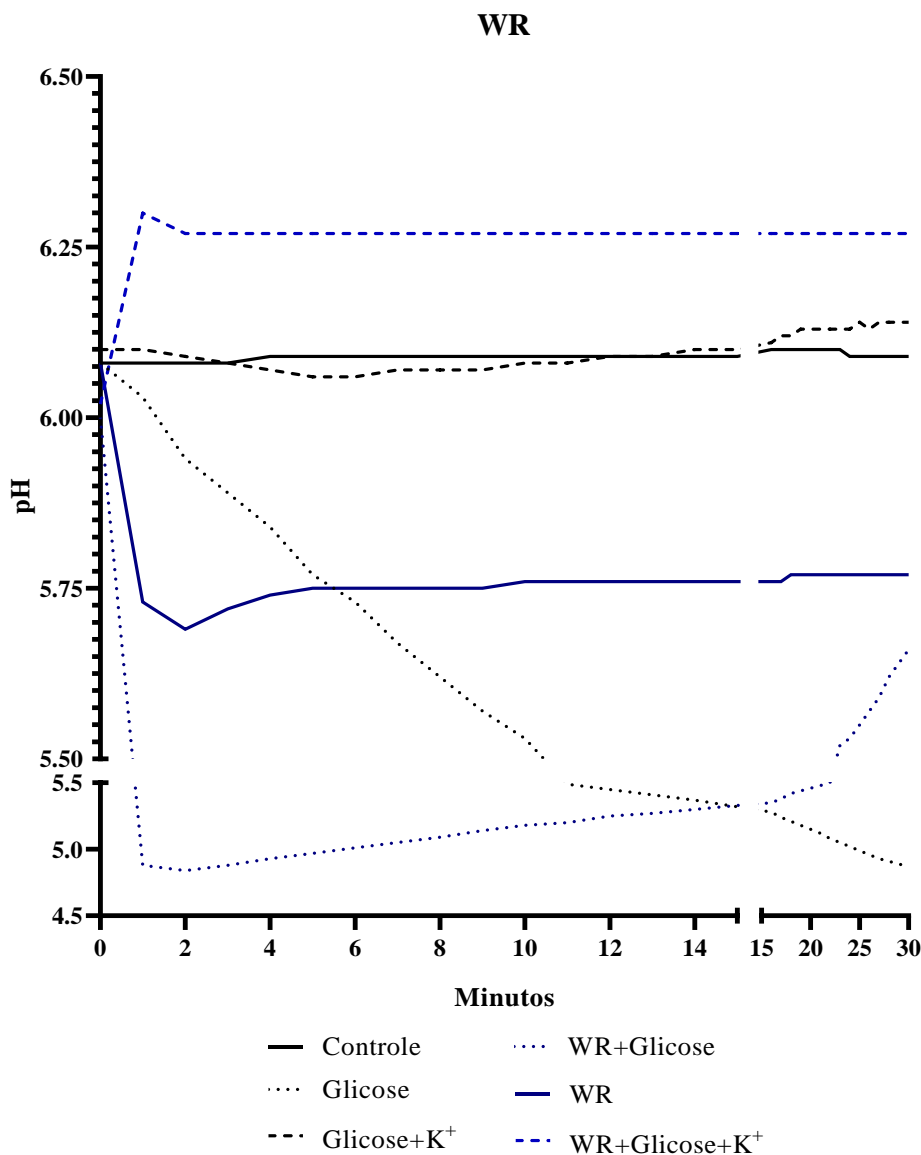


Figura 38: Acidificação do meio externo em células *Candida albicans* estimuladas por glicose e na presença do peptídeo e WR e K⁺. Células de *C. albicans* foram ressuspensas a 20.000.000 células/mL em 800 μ L de Tris-HCl 5 mM pH 6.0 e mantidas a uma temperatura constante de 25 °C com agitação magnética suave. O pH foi monitorado por 30 minutos em células de *C. albicans* tratadas com WR e K⁺. Observe a acidificação estimulada por glicose e a inibição da acidificação em células tratadas com WR. K⁺ refere-se à adição de 200 mM de KCl.

4.4.12 Análise de permeabilização da membrana plasmática de *C. albicans* em tempos iniciais e na presença de K⁺

Nossos dados mostram que os efeitos intracelulares, como indução de ROS e, principalmente, encolhimento celular, continuaram a ocorrer mesmo na presença de K^+ adicionado exogenamente ao meio de cultura e há a inibição da acidificação do meio externo a partir de 1 min após a adição de WR. A permeabilização observada em 20 min (Fig. 19) explica a falta de proteção das leveduras contra a morte pelos bloqueadores de canais, já que os íons provavelmente saíram devido a danos na membrana, explicando também a reversão parcial de efeitos intracelulares, como encolhimento celular, pois os íons devem atingir um equilíbrio entre a concentração intracelular e extracelular por meio da permeabilidade da membrana, proporcionando proteção parcial contra o encolhimento celular. No entanto, esses resultados não explicam a mudança na inclinação da acidificação a 1 min após a incubação com WR. Por esse motivo, estudamos a permeabilização da membrana em intervalos de tempo mais curtos. Descobrimos que *C. albicans* tratada com WR, teve sua membrana permeabilizadas desde o início, com 0 min de incubação (ou o tempo suficiente para montar e fazer observações sob o microscópio) (Tabela 6) e que a presença de K^+ demonstrou retardar a permeabilização inicial. Esses resultados indicam que a mudança na inclinação da acidificação do meio observada para as leveduras tratadas com WR não está relacionada à permeabilização da membrana e será estudada em mais detalhes no futuro.

Tabela 6: Permeabilização da membrana plasmática em *C. albicans* tratadas com WR em diferentes tempos e na presença de K^+

Amostras	tempo (min)	número de células em DIC	número de células fluorescentes	% de células com permeabilizadas (<i>Sytox green</i>)
controle ⁺ (calor)	1 min	189	182	96,3 ^a
controle	20 min	193	10	5,2 ^b
K^+ (200 mM)		182	26	12,6 ^c
WR	0 min	180	140	77,8 ^a
WR + K^+ (200 mM)		183	22	12,0 ^c
WR	1 min	178	176	98,9 ^a
WR + K^+ (200 mM)		187	16	8,6 ^c
WR	3 min	184	184	100 ^a
WR + K^+ (200 mM)		186	26	14 ^c
WR	5 min	187	186	99,5 ^a
WR + K^+ (200 mM)		189	29	15,3 ^c
WR (27,5 μ M)	20 min	201	188	93,5 ^a
WR + K^+ (200 mM)		204	103	50,5 ^d

Os controles correspondem às células de levedura sem a presença de WR. As leveduras tratadas com WR em cada meio foram comparadas com seus respectivos controles. Letra diferente denota diferenças significativas e a mesma letra não denota diferença, $P < 0,05$. O resultado é representativo de um ensaio de três. K^+ refere-se a adição de 200 mM de fosfato de potássio pré incubado por 15 min antes da adição de WR.

4.4.13 Análise do tempo de morte da *C. albicans* induzido por WR em água

O movimento de íons, especialmente o K^+ , para dentro e para fora da célula tem sido implicado no controle do volume celular, mas também atua como uma etapa crítica necessária para a progressão da morte celular programada (Bortner e Cidlowski, 2020). Por esse motivo, formulamos a hipótese de que a proteção proporcionada pelo K^+ adicionado exogenamente ao meio, pode ser resultado da manutenção desse íon dentro da célula que deixaria de sair a favor do gradiente eletroquímico agora invertido pela sua adição exógena ou a reposição do íon que pode entrar por meio de danos na membrana, equilibrando a concentração interna de K^+ , em ambas as situações o nível do K^+ intracelular se manteria a um nível protetor para as células. Se essa premissa estiver correta, as células incubadas em meio hipotônico deveriam expandir devido ao influxo de água para dentro da célula, e para regular seu volume, liberam K^+ , mantendo o volume celular em níveis normais. A liberação de K^+ reduz sua concentração intracelular, tornando a célula mais suscetível à ação de WR, uma vez que este também podem causar o efluxo do íon. Dessa forma, testamos se WR poderia induzir a morte de maneira mais rápida nas de *C. albicans* previamente incubadas em água. Para isso, realizamos o ensaio em água com 0 min de incubação, ou seja, o tempo necessário para montar e plaquear o ensaio, pois essa condição faria com que a célula reduzisse a concentração celular de K^+ ao perdê-lo para o ambiente externo para regular seu volume. Dados anteriores demonstravam perda de viabilidade de 97% das colônias em 0 h em meio Sabouraud (Lucas et al., 2023). Na condição da pré incubação das células em água WR, e mantendo os outros parâmetros de tempo de incubação e a DL_{100} , WR causou a perda de viabilidade de 100% das células de *C. albicans*. Portanto, nossos dados demonstraram que WR foi mais potente em água, matando todas as células do ensaio e em menos tempo (Tabela 7).

Tabela 7: Atividade antimicrobiana de WR incubado com as células de *Candida albicans* em meio Sabouraud e em água.

Amostras	tempo (min)	condição	UFC	número de células sobreviventes	% de células sobreviventes
controle	0 min	meio sabouraud	218	218	100 ^a
WR (27,5)			209	8	3,8 ^b
controle		água	203	203	100 ^a
WR			206	0	0 ^b

Os valores das UFC (unidades formadoras de colônias) são médias \pm desvio padrão. Os controles correspondem às células de levedura sem a presença de WR. As leveduras tratadas com WR em cada meio foram comparadas com seus respectivos controles. Letra diferente denota diferenças significativas e a mesma letra não denota diferença, $P < 0,05$. O ensaio é representativo de um ensaio independente em um total de três.

5. DISCUSSÃO

5.1 Bloco 1: Análise do papel do estresse oxidativo na morte induzida de *C. albicans* por WR

Devido à sua ampla capacidade de inibir microrganismos, os AMPs ganharam destaque no cenário farmacêutico. No entanto, a falta de compreensão completa de seu desempenho *in vivo* representa um desafio significativo no desenvolvimento farmacêutico, atrasando sua adoção clínica. Essa lacuna inclui a ação tóxica contra células mamíferas, resultando em um índice seletivo reduzido, somado a limitações na farmacocinética e farmacodinâmica, diminuindo a biodisponibilidade das AMPs. Além disso, os custos elevados de produção, devido à complexidade estrutural e comprimento dessas moléculas, são uma preocupação válida (Barreto-Santamaría et al., 2019). No entanto, as próprias características estruturais das AMPs estão sendo exploradas para superar esses desafios. A diversidade estrutural, aliada a estudos que correlacionam atividade e estrutura, proporciona uma compreensão mais profunda das posições e natureza dos aminoácidos cruciais para a eficácia. A síntese química possibilita a incorporação de aminoácidos não naturais, melhorando a estabilidade e a atividade dessas moléculas (Torres et al., 2019). Essas descobertas têm viabilizado o design de AMPs modificadas com propriedades terapêuticas aprimoradas. Adotando uma abordagem semelhante, correlacionamos a estrutura primária e as atividades biológicas de defensinas de plantas, resultando na concepção de três novos peptídeos chamados RR, D-RR e WR, com uma atividade antimicrobiana superior em relação ao peptídeo original sobre leveduras oportunistas e baixa toxicidade para células mamíferas (Toledo et al., 2021). Nesse contexto, iniciamos uma série de experimentos para elucidar o possível mecanismo de ação dos três peptídeos sobre leveduras oportunistas e nesse trabalho apresentamos os dados de WR em relação à levedura *C. albicans*.

Neste estudo, escolhemos também um momento no início desse intervalo para os experimentos seguintes. Esses parâmetros são importantes para evitar a má interpretação da via de morte celular induzida por WR (Soares et al., 2017). Um mecanismo de ação compartilhado por diversas substâncias antimicrobianas, incluindo os AMPs, é a indução de estresse oxidativo, do qual a atividade inibitória ou a morte dos microrganismos parece convergir (Kusch, et al., 2007; Bortner e Cidlowski, 2007). Inicialmente, com base nessas evidências do estresse oxidativo como possível efeito tóxico principal, investigamos se WR promoviam tal estresse nas células de *C. albicans*. Para realizar essa análise, examinamos a contribuição do estresse oxidativo para a morte induzida por WR, submetendo as leveduras a agentes antioxidantes como AA, NAC ou GSH em um ensaio de viabilidade. Essas

substâncias agem como antioxidantes não enzimáticos, protegendo as células contra os efeitos oxidantes dos radicais livres (Arrigoni et al., 2002; Lee & Lee, 2018). Assim, essa abordagem permite inferir se há geração de ROS nas células de levedura expostas a WR e, além disso, esclarecer o envolvimento mecanicista de ROS na morte da levedura. Nossos resultados indicaram ausência de proteção para *C. albicans* quando incubada com o peptídeo WR e os antioxidantes (Fig. 9). O antioxidante AA demonstrou reduzir as atividades antifúngicas de NaD1 (defensina vegetal de *Nicotiana glauca*) (Hayes, et al., 2018) Rs-AFP₂ (defensina da planta *Raphanus sativus*) (Aerts, et al., 2007) e ApDef₁ (defensina da planta *Adenanthera pavonina*) (Soares et al., 2017) contra *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Essa última família de AMPs de plantas é a mesma da qual o peptídeo WR foi bioinspirado (Toledo, et al., 2021), sugerindo a possibilidade de compartilharem o mesmo mecanismo de ação. O antioxidante NAC é amplamente conhecido como eliminador de ROS em células de levedura (Lee e Lee, 2017; Hayes, et al., 2013; Guaragnella et al., 2010) e demonstrou proteger *C. albicans* do efeito tóxico do itraconazol a 5 mM (Lee e Lee, 2017), bem como proteger *C. albicans* e *S. cerevisiae* do efeito tóxico do KM29 (AMP sintético derivado da histatina 5 de *Homo sapiens*) a 10 mM (Bullock et al., 2020). Além disso, o NAC protegeu *C. albicans* do efeito tóxico do LfcinB15 (AMP derivado da clivagem proteolítica da lactoferrina) a 60 mM (Chang et al., 2021). No entanto, não teve efeito contra o efeito tóxico de 10 mM de farnesol em *S. cerevisiae* (Machida et al., 1999). No entanto, em nossas condições de teste, 3 mM de NAC não conseguiu resgatar as células de *C. albicans* da morte induzida por WR (Tabela 2). Além disso, em concentrações superiores a 5 mM, o NAC tornou-se tóxico para *C. albicans*, inibindo completamente o crescimento celular (Dados não mostrados). É importante destacar que estudos anteriores relataram a toxicidade do NAC em concentrações superiores a 15 mM para *C. albicans* (Andrés et al., 2008), e a toxicidade de AA para *Candida* também foi documentada (Ojha et al., 2008). A ação tóxica desses antioxidantes pode ocorrer devido ao possível comprometimento das vias de sinalização reguladas pelo status oxidativo das células (Costa et al., 2001; Rinnerthaler et al., 2012; Schippers et al., 2012). Uma explicação possível para a falta de proteção de *C. albicans* pelo NAC é que este atua de maneira mais eficaz como eliminador de ânion hidroxila (OH⁻) (Aruoma et al., 1989). Isso poderia indicar a não participação significativa do OH⁻ na morte induzida pelo peptídeo ou a sua não produção por esta espécie de levedura nas condições estudadas. Outra possibilidade para a atividade antioxidante do NAC é um efeito indireto, servindo como precursor para a síntese de GSH, uma molécula antioxidante em última instância (Aldini et al., 2018). Entretanto, a síntese de GSH pode não ocorrer de modo rápido o suficiente para conferir proteção antioxidante,

considerando que a toxicidade de WR foi de 97% após 0 h de contato celular (Lucas et al., 2023). Optamos por usar a maior concentração de GSH que minimamente afetou o crescimento celular nas condições testadas. Mesmo o GSH falhou em salvar a levedura testada da ação tóxica de WR. O GSH é conhecido por ser uma molécula antioxidante eficaz em fungos (Pócsi et al., 2004; Toledano et al., 2013), mas em concentrações de 3 mM ou mais, impactou negativamente o crescimento de *C. albicans* (15,4%, Fig. 9) em nossas condições de teste. É importante notar que a presença dos três diferentes antioxidantes não salvou *C. albicans* da morte, apesar das células estarem sofrendo estresse oxidativo. Uma explicação pode ser a rapidez com que o WR induziu a morte dessa espécie de levedura, pois imediatamente após a adição de WR (tempo de morte 0 h), 97% da população celular já estava morta (Lucas et al., 2023). Essa rapidez pode impedir que o antioxidante tenha o efeito protetor, mesmo quando adicionado antes do WR (veja também a discussão da Fig. 9B). Outra possibilidade para explicar a falta de eficácia na proteção antioxidante é discutida mais adiante nesta seção.

Com base na não proteção observada, nossa suposição foi que o ROS pode ser um estresse inicial que, uma vez estabelecido, desencadeia outro(s) executor(es) de morte celular que leva(m) à morte da célula. Essa suposição explica que, mesmo na presença do antioxidante e, portanto, protegidas do ROS, as células de *C. albicans* ainda estariam comprometidas com a morte. Para discriminar esse efeito, repetimos os ensaios antimicrobianos e de viabilidade na presença do antioxidante AA, mas adicionando-o 30 minutos antes da adição WR, o que teoricamente deveria proporcionar uma maior proteção contra ROS, uma vez que a célula estaria pré-carregada com o antioxidante e este eliminaria prontamente os ROS gerados. No entanto, mesmo adicionado 30 min antes do WR, o AA continuou a mostrar a mesma resposta do que quando adicionado concomitantemente ao peptídeo, nenhuma proteção (Fig. 9B). O tratamento de *C. albicans* com WR resultou em estresse oxidativo, conforme confirmado pela análise de microscopia fluorescente (Fig. 11, adiante). Uma vez que o peptídeo induziu a morte de 97% da população celular no ensaio em 0 h (Lucas et al., 2023), suspeitamos que o efeito tóxico forte e rápido do WR sobre *C. albicans* pode sobrepujar a proteção do antioxidante, mesmo quando adicionado antes do WR (Fig. 9B).

Apesar da não proteção observada pelos antioxidantes fomos verificar se as células de *C. albicans* estavam sofrendo de estresse oxidativo pela indução endógena de ROS e para isso utilizamos a sonda fluorescente H₂DCFDA. Primeiramente, padronizamos o número de células para a análise por microscopia. Os ensaios antimicrobianos realizados até agora

utilizaram um total de 2.000 células/mL. No entanto, essa quantidade de células é inviável para análise por microscopia óptica, pois está abaixo do limite de detecção da técnica. Portanto, uma maior quantidade de células foi utilizada para permitir sua visualização sob um microscópio óptico. WR manteve sua toxicidade em maior número de células de levedura (Fig. 10) validando o efeito tóxico de WR sobre esta maior densidade celular e consequentemente os ensaios a partir dele.

A sonda H₂DCFDA é permeável à célula e, uma vez dentro da célula, é desacetilada por esterases intracelulares e, quando oxidada por ROS, gera o composto fluorescente diclorofluoresceína, permitindo a detecção de ROS dentro da célula. AcA foi utilizado como controle positivo neste ensaio, pois é um conhecido indutor de morte celular regulada em fungos com características semelhantes à apoptose (Madeo et al., 1999; Chaves et al., 2021). Além disso, para esta análise fluorescente, células tratadas com o controle⁺ feito com AcA foram usadas como parâmetros para ajustar o microscópio para o controle e tratamentos com WR, e todas as imagens foram capturadas com o tempo de exposição e intensidade de excitação ajustados para esse controle⁺ (Fig. 11). Os pontos temporais escolhidos representavam um ponto no início do intervalo de tempo de morte necessário para que WR causasse a morte da população celular do ensaio (Lucas et al., 2023). Estudos futuros devem abordar o ponto sem retorno ou outro sinal de morte celular.

A detecção da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em *C. albicans* após a exposição a WR motivou a investigação da funcionalidade mitocondrial. As mitocôndrias representam a principal fonte de ROS intracelular, resultantes do vazamento de elétrons da cadeia de transporte de elétrons (CTE) para o oxigênio molecular (O₂) durante a respiração celular (Kwon et al., 2015; Zhao et al., 2019). Para avaliar a funcionalidade mitocondrial, utilizamos a sonda Mitotracker Red FM sensível ao potencial de membrana. Os resultados revelaram que o peptídeo WR induziu disfunção mitocondrial em *C. albicans*, conforme ilustrado na Figura 12. Além disso, a intensificação do sinal fluorescente sugere que as alterações provocadas pelos WR ocorreram precocemente no processo de morte celular induzido, aproximadamente 20 minutos após o início (Fig. 12). Resultados semelhantes foram observados para o Rodamina 123 (Dados não mostrados), evidenciando um aumento de intensidade no sinal fluorescente. Esses achados sugerem que as mitocôndrias de *C. albicans* tratadas com WR estão passando por estresse disfuncional. A maior captação das sonda mitocondrial observada nas células de *C. albicans* tratadas com WR pode indicar uma hiperpolarização do potencial de membrana mitocondrial. Este fenômeno está em consonância com o sinal intensificado da sonda de ROS na células de *C. albicans* tratadas com WR,

indicando um aumento na intensidade de fluorescência devido à produção intensa de ROS (Fig. 11). Esses resultados parecem estar relacionados porque a produção de ROS depende do fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons (CTE) mitocondrial (Venditti et al., 2013; Mailloux et al., 2015; Napolitano et al., 2021).

Uma condição conhecida que leva à produção de ROS no complexo I é o chamado transporte reverso de elétrons (RET, do inglês *reverse electron transport*). No RET, a membrana mitocondrial deve ter uma alta reserva de coenzima Q (CoQ) reduzida e um alto potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), que atuam juntos para reverter o fluxo de elétrons de volta ao complexo I, onde, no sítio de Flavina mononucleotídeo (do inglês, FMN, *flavin mononucleotide*) são transferidos para o O₂, gerando ânion superóxido (Robb et al., 2018). *C. albicans* e *C. parapsilosis* são conhecidas por possuir os cinco complexos mitocondriais denominado via respiratória clássica, e além disso, outras duas vias conhecidas foram descritas nessas espécies de leveduras denominados de oxidase alternativa e paralela (Milani et al., 2001). Essas duas últimas são consideradas vias compensatórias quando a via clássica é de alguma forma bloqueada (Ruy et al., 2006). As vias alternativas e paralelas se ramificam da via clássica no local da CoQ, portanto, podem desoxidar a CoQ, bloqueando assim um dos requisitos para o RET acontecer nestas leveduras (Ruy et al., 2006; Robb et al., 2018).

Alguns trabalhos demonstraram que o principal local de geração de ROS em fungos é o complexo mitocondrial I (Ruy et al., 2006; Castro et al., 2008; Li et al., 2011). Alguns relatos correlacionam positivamente um alto $\Delta\psi_m$ e uma baixa concentração de ATP com um aumento na produção endógena de ROS para o efeito tóxico de substâncias antifúngicas em espécies de *Candida*, por exemplo, em uma cepa de *C. albicans* resistente ao fluconazol tratada com uma combinação de fluconazol e berberina (Robb et al., 2018; Xu et al., 2009) e *C. albicans* tratada com plagioquina E (Wu, et al., 2009). O alto $\Delta\psi_m$ também foi associado à produção de ROS em mitocôndrias hiperpolarizadas de *S. cerevisiae* tratada com o isoprenóide farnesol (Machida, et al., 1999). Além disso, o sulfato de protamina, um medicamento usado em cirurgia cardiovascular, causa uma redução no consumo de oxigênio cardíaco. Seu mecanismo de ação está relacionado à inibição da atividade da citocromo c oxidase, causando inibição da respiração, hiperpolarização do $\Delta\psi_m$ e produção de ROS (Ramzan et al., 2019). O aumento no $\Delta\psi_m$ para a geração de ROS é corroborado por Skulachev et al. (2006), que destacou que, para a produção de ROS nos complexos I e III, é necessário um aumento no $\Delta\psi_m$. Nossos resultados também se correlacionam com o aumento no $\Delta\psi_m$ e o aumento na produção de ROS (Fig. 11). Mas o que aumenta o potencial de membrana mitocondrial em primeiro lugar? Uma possível explicação foi dada por

Pozniakovsky et al. (2005) que correlacionou o aumento no $\Delta\psi_m$ com o aumento transitório de Ca^{+2} intracelular em *S. cerevisiae* tratada com o agente antiarrítmico amiodarona, que, por sua vez, aumentou a atividade das NADH desidrogenases mitocondriais, que fornecem elétrons para a CTE e, conseqüentemente, para a produção de ROS. Isso explica tanto o aumento no $\Delta\psi_m$ quanto o aumento na produção de ROS pelo aumento no fluxo de elétrons. A expressão aumentada da isocitrato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs, em *C. albicans* tratada com fluconazol e berberina corrobora com a observação de Pozniakovsky et al. (2005) e Li et al. (2011). Outra possibilidade para a hiperpolarização do potencial de membrana mitocondrial foi sugerida por Machida et al. (1999), que indicaram que o farnesol impede a sinalização celular, resultando na aceleração da $\text{F}_1\text{-ATPase}$ enquanto reverte sua atividade de síntese de ATP para hidrólise de ATP em *S. cerevisiae*, resultando no transporte de H^+ de volta para o espaço intermembranar, hiperpolarização do potencial de membrana mitocondrial e produção de ROS. É notável que esse cenário de estresse mitocondrial com hiperpolarização de membrana não apenas explica tentadoramente o efeito tóxico de WR em *C. albicans*, mas também explica por que *S. cerevisiae*, que carece do complexo I da via respiratória clássica e também das vias alternativa e paralela (Gabaldón et al., 2005), é resistente a WR (Toledo et al., 2021), considerando que o complexo I seja o local de geração de ROS.

Para confirmar a alta atividade mitocondrial, já observada com as sondas Mitotracker Red FM (Fig. 12) e Rodamina 123 (Dados não mostrados), usamos o ensaio WST-1 para avaliar a atividade mitocondrial nas leveduras tratadas com WR, com base em estudos que mostram que o NADH formado pelo ciclo de Krebs mitocondrial é o principal doador de elétrons para a redução do WST-1 para a forma solúvel em água fora das células na presença de um aceptor de elétrons intermediário, permitindo a quantificação da atividade metabólica mitocondrial por ensaio colorimétrico (Berridge et al., 2005). A alta atividade observada na redução do WST-1 no momento da morte das leveduras pode representar uma atividade residual das enzimas envolvidas no processo (Chaves et al., 2021). Portanto, os resultados do ensaio WST-1 apoiam os resultados da marcação mais intensa da sonda fluorescente dependente do potencial de membrana e confirmam que as mitocôndrias das células de *C. albicans* tratadas com WR estavam hiperpolarizadas. Para o ensaio WST-1, tivemos que padronizar o número mínimo de células para obter um sinal positivo no ensaio. Inicialmente, usamos 40.000 células/mL, que já estavam normalizadas para os ensaios de microscopia (Fig. 10), validando que WR tinha atividade em concentração celular mais elevada. No entanto, não obtivemos sinal positivo dentro do tempo de incubação letal de WR, provavelmente devido à

baixa densidade celular necessária para este ensaio (Dados não mostrados). Portanto, o número de células deste ensaio foi dobrado para 80.000 células/mL, o que resultou em um sinal positivo (Fig. 13). Para validar que WR ainda estavam ativos nessa concentração celular 40 vezes maior que o ensaio inicial (Fig. 9), realizamos um ensaio de viabilidade. É importante destacar que WR, na mesma DL_{100} e tempo de morte determinado para o ensaio com 2.000 células/mL, mantiveram sua toxicidade para quarenta vezes mais células do que o ensaio antimicrobiano original, causando perda de viabilidade celular para quase toda a população celular (Fig. 13). Nossos dados indicam claramente que WR induziu hiperpolarização do potencial de membrana mitocondrial, levando à disfunção mitocondrial na levedura testada. Esses resultados podem excluir a morte como um processo tipo-apoptose, pois a perda do potencial de membrana mitocondrial é uma característica da apoptose (Guaragnella et al., 2012). Estudos futuros devem investigar o local de produção de ROS nas mitocôndrias da levedura para obter uma compreensão melhor de como o estresse desencadeado por WR se propaga dentro das células da levedura, atingindo e interferindo nas mitocôndrias.

Como ROS parecem ser executores essenciais na morte celular regulada com fenótipos de apoptose em leveduras (Kumar et al., 2011; Madeo et al., 2002), e nossos resultados apontam que os ROS estão ligados a esse processo, exploramos alguns fenótipos de morte celular regulada *C. albicans*. De fato, a apoptose em fungos foi questionada recentemente (Hardwick, 2018). No entanto, é inegável que, sob certas condições, as células fúngicas morrem e que sua morte exhibe características fenotípicas de apoptose intrínseca em células de mamíferos (Madeo et al., 1999). Por esse motivo, investigamos alguns marcadores conhecidos de apoptose de células de mamíferos para reforçar nossos resultados, que indicam que um tipo de morte celular regulada com características fenotípicas da apoptose de células de mamíferos está sendo induzido em *C. albicans* tratadas com WR como sugerido por Carmona-Gutierrez et al. (2018).

5.2 Bloco 2: Análise do tipo de morte de *C. albicans* induzida por WR

Inicialmente, demonstramos que as leveduras tratadas estão sob estresse oxidativo e com a mitocôndria hiperpolarizada (Figs. 11 e 12). Ambas as características são marcadores de apoptose em células de mamíferos e leveduras (Bortner e Cidlowski, 2020; Chaves et al., 2021). Em seguida, avaliamos se as metacaspases da levedura foram ativadas após o tratamento com WR usando o CaspACE FITC-VAD-FMK, um derivado do inibidor de pancaspase carbobenzoil-valil-alanil-aspartil-[O-metil]-fluorometilcetona (Z-VAD-FMK), onde o

grupo bloqueador N-terminal foi substituído pelo grupo isotiocianato de fluoresceína (FITC). Essa substituição dotou o inibidor de pan-caspase com fluorescência e a capacidade de entrar nas células e se ligar às caspases ativadas. Apenas o controle positivo (AcA) que foi usado para ajustar parâmetros como tempo de exposição e intensidade de excitação apresentou células positivas para FITC-VAD-FMK, assim (Fig. 15). A ativação de metacaspases em *Candida* por AcA, assim como por outros AMPs, está de acordo com outros trabalhos (Aerts et al., 2009; Taveira et al., 2018; Mello et al., 2019) e também com a descrição do gene CaMAC1, que codifica uma metacaspase em *C. albicans* (Cao et al., 2009), e portanto, apoia nossos resultados. Para obter uma compreensão melhor do papel que a ativação da metacaspase desempenha na morte induzida por WR, tratamos as células de levedura com o inibidor de pan-caspase Z-VAD-FMK. Este inibidor entra na célula e se liga de forma irreversível ao sítio catalítico de caspases ativas, inibindo sua atividade. Portanto, se esta for a via de morte, o tratamento com Z-VAD-FMK deveria proteger as leveduras da ação de WR. Descobrimos que a adição de 50 μ M do inibidor de pan-caspase no ensaio antifúngico não protegeu as células da ação de WR (Fig. 16). Esses resultados indicam que a morte induzida por WR em *C. albicans* é independente de metacaspase. Guaragnela et al. (2006) estudaram a morte de *S. cerevisiae* pelo tratamento com AcA e mostraram a ativação de metacaspases por FITC-VAD-FMK e a não proteção da morte pelo inibidor de caspase pan-caspase Z-VAD-FMK. Seus resultados indicaram que a morte induzida por AcA na levedura de brotamento era independente de metacaspase. Estudos posteriores demonstraram que muitos fatores podem induzir a morte de *S. cerevisiae* independentemente da atividade de metacaspase (Liang et al., 2008). A ativação de metacaspases foi demonstrada por FITC-VAD-FMK para *C. albicans* tratadas com *Rs*-AFP₂, e a coincubação com Z-VAD-FMK interrompeu a morte induzida por *Rs*-AFP₂. No entanto, a deleção do CaMCA1 não interferiu na morte induzida pelo peptídeo, indicando que outras proteases semelhantes a caspases podem estar envolvidas (Aerts et al., 2009).

Portanto, nossos resultados podem indicar que as vias de morte ativadas por WR em *C. albicans* são independentes de metacaspase, ou há outro sinal que, uma vez acionado, compromete as células à morte, como será discutido posteriormente. Outra forma de morte regulada com características semelhantes à apoptose em células de mamíferos analisada no presente estudo foi a detecção de condensação de cromatina pela sonda fluorescente DAPI, que se liga às sequências ricas em adenina e timina nas fendas menores do DNA. Nossos resultados mostraram que WR induz uma alteração no padrão de coloração do DAPI (Fig. 17). AMPs levam tanto à morte celular dependente de caspase (Lee e Lee, 2017) quanto

independente de caspase (Morton et al., 2007) com condensação de cromatina. Devido à rapidez com que a morte induzida por WR ocorreu em *C. albicans* (Tabela 1) investigamos se a morte celular era um tipo de morte celular acidental (ACD) corando as células com IP. IP é uma sonda fluorescente que se intercala no DNA e só penetra em células com membrana celular rompida, não sendo permeável à membrana plasmática inteira, sendo excluída de células vivas ou células passando por apoptose precoce, mas se liga ao ácido nucleico de células passando por ACD (do inglês, *accidental cell death*) e apoptose tardia. O tratamento com WR resultou em marcação positiva de IP em *C. albicans* (Fig. 18).

Além disso, considerando que o tempo de 15 min é o mais precoce em que ocorreu a marcação de IP (Tabela 3) e levando em consideração a rapidez com que WR induz a morte de *C. albicans* (Lucas et al., 2023), esse resultado indica que a marcação de IP ocorre em um momento mais tardio do tempo de morte indicando que o processo de morte é regulada com necrose tardia (Carmona-Gutierrez, et al., 2018). Esse resultado indicou que o destino das células de *C. albicans* após a incubação com WR está sendo determinado pelas células dentro deste intervalo de tempo de 15 min, essa descoberta será investigada mais adiante. Em resumo, nossos resultados sugerem uma morte celular regulada com marcação de necrose tardia, uma vez que as células tratadas com WR mostraram marcação positiva para IP (Tabela 3) (Bortner e Cidlowski, 2020; Chaves et al., 2021; Carmona-Gutierrez et al., 2018). Um outro aspecto que sustenta nossos dados é o fato de que as células de *C. albicans* tratadas com WR apresentam um aspecto de vacuolização do citoplasma e um tamanho menor em relação ao controle, esse resultado será investigado com mais detalhes adiante. Nossos resultados indicaram que as células de *Candida* tratadas WR eram positivas para IP, esse resultado aponta para um outro efeito da ação de WR sobre *C. albicans*, a permeabilização da membrana plasmática (Fig. 18).

5.3 Bloco 3: Interação de WR com lipídeos e membranas

O principal mecanismo de ação sugerido para AMPs contra microrganismos é a perturbação da barreira da membrana. Esse mecanismo está intrinsecamente associado às características de cationicidade e anfipaticidade dos AMPs. Essas características permitem que eles sejam atraídos eletrostaticamente para lipídios com carga oposta, comumente encontrados na face externa das membranas microbianas, e posteriormente se insiram na membrana, causando comprometimento estrutural e levando à permeabilização pela formação de poros ou rompimento da membrana, assemelhando-se a um detergente (Lang et al., 1998; Thevissen et al., 1999; Henzler-Wildman et al., 2004). Este mecanismo de ação, pela

perturbação da barreira da membrana, juntamente com o entendimento geralmente aceito de que peptídeos carregados positivamente têm como alvo a membrana dos patógenos contribuiu para a visão predominante do amplo e inespecífico efeito das AMPs sobre os microrganismos (Zaslhoff, 2002; Toke, 2005; Matsuzaki, 2019; Lazzaro et al., 2020). No entanto, há evidências que mostram que esse mecanismo de ação, devido à perda de funcionalidade da membrana como uma barreira seletiva, não explica o mecanismo de ação de alguns AMPs. O Buforin II, um AMP inicialmente isolada de tecido estomacal de *Bufo bufo garagriozans* (sapo asiático) derivado de histonas, penetra e mata células microbianas sem causar permeabilização da membrana (Park et al., 1998). *R_s-AFP₂* não permeabilizou modelos de membrana artificial compostos por fosfolipídios e esfingolipídios nas proporções encontradas nas células fúngicas (Aerts et al., 2007). Portanto, a contribuição da permeabilização da membrana para a morte do fungo induzida por AMPs *in vivo* pode não ser o principal mecanismo de ação. Buscamos então analisar se WR era capaz de causar permeabilização da membrana plasmática em *C. albicans*. Para isso, a permeabilização da membrana plasmática foi avaliada por meio da captação de *Sytox green* (Thermo Fisher), que penetra apenas em membranas celulares permeabilizadas. Uma vez dentro da célula, a sonda se liga aos ácidos nucleicos e se torna fluorescente. Em 20 min de incubação, WR demonstrou causar permeabilização da membrana plasmática nas células de *C. albicans* (Fig. 19).

Para confirmar esse resultado buscamos analisar se WR causa a liberação de constituintes citoplasmáticos nas células de *C. albicans*. Testamos a atividade de WR em uma concentração celular de 1.000.000 células/mL, concentração necessária para realização do ensaio, e, WR demonstrou manter sua atividade mesmo frente a essa concentração celular (Fig. 20). No entanto, quando analisamos a liberação de constituintes citoplasmáticos nossos resultados demonstraram que WR não foi capaz de induzir o extravasamento de materiais como DNA/RNA e proteínas dentro do tempo estudado de 20 min. Apesar disso, anteriormente já havíamos observado que a membrana das leveduras estava permeabilizada (Fig. 21). De acordo com Brogden (2005) diante da ação de AMPs a função da membrana é irreversivelmente perturbada, levando à perda do conteúdo celular e à rápida morte celular. Entretanto, há relatos de AMPs que passam da face externa para a interna da membrana plasmática e depois para o citoplasma, onde encontram um alvo intracelular (Park et al., 2000). De fato, alguns AMPs foram relatados por interagir com componentes da membrana microbiana, como fosfolipídios e esfingolipídios (Thevissen et al., 1999; Schmitt et al., 2016; Chang et al., 2021). No entanto, alguns trabalhos relataram resultados que não explicam totalmente que a interação AMP-membrana é o principal evento responsável pela inibição do

crescimento microbiano ou causa de morte. Outros demonstraram que o dano à membrana é um efeito cascata, ou seja, a membrana microbiana é um alvo secundário ou indireto da ação das AMPs com outros alvos primários (Park et al., 1998; Aerts et al., 2007; Mello et al., 2011; Soares et al., 2017;). Além disso, outros mecanismos de ação foram descritos (Muñoz et al., 2013). No entanto, a interação das AMPs com os componentes da membrana microbiana parece ser crucial para os processos de inibição do crescimento e/ou morte. Entre eles estão os pontos de ancoragem para AMPs nos componentes da membrana microbiana por atração de carga oposta, o que permite sua acumulação na superfície da membrana e sua posterior entrada na célula. Essa visão encontra suporte nos relatos de que alguns mecanismos conhecidos de resistência bacteriana às AMPs são mediados pela diminuição de cargas negativas nos componentes lipídicos da membrana e na parede celular (Peschel et al., 2001; Abdi et al., 2019).

Para entendermos relevância da interação com fosfolipídeos da membrana de *C. albicans* com WR nós analisamos a interação deles com membranas artificiais compostas com fosfolipídeos que mimetizam a membrana da levedura *C. albicans* (Mishra et al., 2007). Inicialmente analisamos se WR não interagiria com os tampões necessários para realizar o ensaio. Tanto em água como em 200 mM de WR tem a mesma conformação indicando que não havia perturbação dos tampões usados para a estabilização das SUVs (Fig. 22). Após a adição de TFE, o espectro de CD mudou para uma configuração de α -hélice (Fig. 22). Curiosamente, a análise dos espectros de CD demonstrou que WR na presença do PS carregado negativamente, induziu uma agregação que mascarou o sinal de CD, enquanto na presença das vesículas POPC/POPG WR adotou uma conformação helicoidal, mas permaneceu desestruturado na presença POPC e POPC/POPE, sugerindo assim que a α -hélice é provavelmente induzida por uma interação seletiva com os PGs aniônicos através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas (Fig. 23). A presença de ergosterol também não demonstrou causar qualquer alteração estrutural em WR (Fig. 24), indicando que o principal esterol da membrana fúngica, não tem interferência na interação peptídeo-membrana. Em comparação com vesículas contendo colesterol a defensina de ervilha *Psd2* demonstrou maior afinidade por vesículas lipídicas incluindo fosfatidilcolina (POPC), espécies de fosfatidilinositol e Glicosilceramida (GlcCer), esfingolipídio que foi recentemente identificado como um componente essencial para a virulência em *C. albicans* (Amaral, et al., 2019; Noble et al., 2010).

Para investigar a relevância da glicosilceramida na atividade antifúngica de WR utilizamos a cepa mutante de *Candida albicans* (Δ)GCS1, que não tem a enzima glicosil

ceramida sintase (GCS) funcional e, portanto, não tem o esfingolípido glicosilceramida e sua cepa correspondente *C. albicans* SC5314 CA14 sem a deleção do gene (Δ)GCS1 que foi utilizada como controle. Entretanto, WR demonstrou não perder a atividade frente a nenhuma das duas cepas, indicando que não há aparente relação entre a ausência de GlcCer e a atividade de antifúngica de WR sobre *C. albicans* (Fig. 25). A defensina RsAFP2 do rabanete (*Raphanus sativus* L.) demonstrou interagir com GlcCer (Thevissen et al., 2004). A interação entre RsAFP2 e GlcCer resulta em uma permeabilização subsequente da célula, seguida pelo influxo de íons de cálcio (Ca^{2+}) e interrupção do crescimento celular, como relatado por Thevissen et al. (1996, 1999). Adicionalmente, a existência de insaturação e/ou metilação na esfingóide base da Glicosilceramida (GlcCer) também foi identificada como um aspecto crucial para o reconhecimento por alguns AMPs (Ramamoorthy et al., 2009; Oura e Kajiwara, 2010; Oguro et al., 2014; Fernandes et al., 2016; Gonçalves et al., 2017).

Ainda buscando entender mais sobre a interação de WR com lipídeos e membranas, buscamos analisar se WR causaria lise em células de mamíferos. Para isso, testamos a atividade hemolítica de WR sobre eritrócitos de ovelhas utilizando a DL₁₀₀ e concentrações mais altas. Nossos resultados demonstraram que WR, mesmo em concentrações muito mais altas não causou lise nos eritrócitos de ovelhas, mas causou permeabilização das membranas, embora essa permeabilização tenha acontecido de forma fraca (Fig. 26). Além disso, utilizamos os estabilizadores osmóticos sorbitol e glicerol que demonstraram não ser capazes de proteger as células da morte induzida por WR (Fig. 27). Esse resultado indica que a morte celular não é impactada diretamente pela permeabilização da membrana e pelo estresse osmótico. Em conjunto, nossos resultados indicam que a membrana plasmática não é o alvo direto de WR e que a permeabilização de membrana é um efeito secundário do processo de morte das células de *C. albicans*.

5.4 Bloco 4: Interação de WR com as células de *C. albicans*

O encolhimento celular é uma característica bem conhecida de vários tipos de morte celular regulada em células de mamíferos (Arrigoni et al., 2002). Em fungos, o encolhimento celular foi caracterizado durante a morte induzida em *C. albicans* por moléculas exógenas como ácido clorogênico (Yun e Lee, 2017) e histatina 5 (AMP da saliva de *Homo sapiens*) (Baev, et al., 2002). Em ambos os exemplos, o efluxo de íons, especialmente K^+ , foi apontado como a causa do encolhimento celular. Se esse for o caso, isso levanta duas possibilidades: primeiro, o efluxo de K^+ é a causa do encolhimento celular; segundo, pode ser outro sinal independente da ação antioxidante desencadeada por WR, e ambas serão analisadas adiante.

A análise morfológica celular indicou que as leveduras tratadas com WR exibiram citoplasma granular e encolhimento celular (Fig. 28). Vale ressaltar que a mesma característica fenotípica, ou seja, granulosidade citoplasmática, também foi induzida por AcA, conhecido indutor de morte celular regulada em fungos com características semelhantes às da apoptose (Chaves et al., 2021). Isso, em conjunto com os resultados dos ensaios de estresse oxidativo (Figs. 9 e 10), reforça a ideia de que a morte celular regulada pode estar ocorrendo em *C. albicans* tratadas com WR. Outra característica interessante observada nas células tratadas foi o encolhimento em comparação com as células de controle no tempo de morte (Fig. 28). Tanto as alterações citoplasmáticas quanto o encolhimento celular foram observados desde o início até o momento da morte das leveduras testadas (Fig. 28). Além disso, é interessante observar que as células de tratadas com WR, combinado ao antioxidante AA, restauraram as mudanças citoplasmáticas, mas não a redução do tamanho (Fig. 28), reforçando novamente que esses efeitos tóxicos de WR são mediados por ROS. Nossas medições confirmam a redução visualmente observada no tamanho celular (Fig. 29). Como o mesmo efeito, ou seja, encolhimento celular, foi observado tanto para WR quanto para o AcA, isso evidencia mais uma vez um tipo de morte celular regulada induzida por WR e descarta a morte celular acidental (ACD, do inglês *accidental cell death*) como o tipo de morte causado por WR, isto porque mesmo com o sinal positivo para IP, o ACD é marcado por uma característica bem definida, o aumento no volume celular, tanto em células de mamíferos quanto em leveduras (Bortner e Cidlowski, 2020; Chaves et al., 2021).

Em conjunto, a indução de ROS (Fig. 9), a condensação de cromatina (Fig. 17) e a redução do tamanho celular (Figs. 28 e 29) sustentam fortemente nossa hipótese de que WR induz RCD, um tipo de morte celular regulada com características semelhantes à da apoptose em *C. albicans* independente de metacaspases.

Diante da redução do tamanho celular, levantamos a hipótese de que o íon K^+ poderia estar envolvido na morte induzida por WR, pois o encolhimento celular é uma característica principal da apoptose em células eucarióticas, incluindo fungos (Yun e Lee, 2016; Bortner e Cidlowski, 2007) e é causada pelo extravasamento de íons, principalmente K^+ , e, portanto, poderia ser o evento relacionado à morte de leveduras induzida por WR. Nossa hipótese foi que a interação de WR com as células de *C. albicans* causava a liberação de K^+ das células e isso desregulava sua homeostase, levando à morte.

Mas para estudarmos a participação de K^+ na morte de *C. albicans* induzida por WR, tivemos que levar em consideração o fenômeno comumente descrito de inativação da atividade antimicrobiana de AMPs na presença de íons (Smith et al., 1996; Goldman et al.,

1997; Ganz e Lehrer, 1999; Viejo-Dias et al., 2004). Portanto, para estudar a interação de WR com as células de *C. albicans*, precisamos excluir se a interação deles seria bloqueada por K^+ , causada pela neutralização de cargas no peptídeo e na superfície celular por íons presentes no meio, impedindo assim a interação inicial necessária para que os efeitos tóxicos de WR ocorressem.

Para confirmar a ocorrência da interação entre os WR e as células de levedura na presença do íon K^+ , marcamos WR com o fluoróforo 5-FAM e verificamos sua interação com as células de *C. albicans*. Antes, para verificar se não houve perda da atividade em função da marcação com 5-FAM realizamos um ensaio de viabilidade e confirmamos que 5-FAM_WR manteve sua atividade antimicrobiana (Fig. 30). A análise por microscopia confocal demonstrou que 5-FAM_WR foi localizado no citoplasma de *C. albicans* após 20 min de interação (Fig. 31). Indicando que WR é internalizado pelas células de *C. albicans*, esse resultado é condizente com os observados no bloco 3 deste trabalho que indicam que WR não tem como alvo primário os componentes da membrana plasmática de *C. albicans* como geralmente relatados para vários AMPs (Zasloff, 2002; Toke, 2005; Matsuzaki, 2019; Lazzaro et al., 2020). Adicionalmente, esses resultados apresentam dados interessantes, indicando que WR pode ter um alvo citoplasmático. Alguns AMPs já foram mostrados entrar nas células de microrganismos e interferir nas funções celulares, como buforina II que entra no citoplasma e interfere no metabolismo de DNA e RNA (Park et al., 1998). A histatina 5 também foi mostrada entrando nas células de *C. albicans*, e a permanência do peptídeo no citoplasma foi associada à perda de viabilidade celular (Mochon e Liu, 2008). A defensina de planta NaD_1 entra nas células de *C. albicans*, e sua entrada é essencial para a indução da morte das leveduras (Hayes et al., 2018). A importância da entrada de WR no citoplasma da levedura e o potencial alvo citoplasmático serão investigados no futuro. Buscamos então verificar se a presença de K^+ poderia atrapalhar a entrada citoplasmática de WR nas células de *C. albicans*. O espectro CD de WR em água demonstrou não estar estruturado em solução (Fig. 32). A presença de 200 mM de fosfato de potássio ou de sódio também não induziu a estruturação (Fig. 32), demonstrando não haver um bloqueio por carga entre WR e o K^+ ou Na^+ descartando a possibilidade de interferência do íon por um bloqueio de cargas, necessárias para a atração entre peptídeo e célula, como observado para outros AMPs (Ganz e Lehrer, 1999; Andres et al., 2008). Esses resultados indicam que WR não é inativado na presença de K^+ por alterações em sua conformação. Depois, buscamos analisar se na presença de K^+ , 5-FAM_WR continuaria a ser localizado dentro do citoplasma da levedura. Nossos dados de microscopia confocal demonstraram que a presença de K^+ não atrapalhou o sinal de WR que

continuou a ser localizado dentro do citoplasma (Fig. 33) e, portanto, nossos dados demonstram que a interação de WR com *C. albicans* por neutralização de cargas não é afetada por K^+ , além disso, esse resultado reforça nossa hipótese de que WR pode ter um alvo citoplasmático que será investigado no futuro.

No entanto, nossos dados sobre a interação de WR com as células de *C. albicans*, ocorrendo mesmo na presença do íon K^+ , estão em desacordo com a literatura. A adição de cátions, monovalentes ou divalentes, ao meio de cultura de microrganismos causa inativação da atividade antimicrobiana de vários AMPs de diferentes famílias (Ganz e Leher, 1999; Andrés et al., 2008). Essa característica foi relatada para AMPs como lactoferrina (Andrés et al., 2008), histatina 5 (Baev et al., 2002; Baev et al., 2003), defensina grande do *Tachyplexus tridentatus* (caranguejo-ferradura) (Saito et al., 1995), LL-37 (caticelidina humana de *Homo sapiens*) (Turner et al., 1998) e defensinas (Goldman et al., 1997; Terras et al., 1993; Vylkova et al., 2007; Tetorya et al., 2023). Esse efeito inibitório de cátions na atividade dos AMPs está relacionado às suas características gerais, como cationicidade, ou seja, possuir uma carga líquida positiva em pH fisiológico (Ioannou et al., 2023). Essa carga seria necessária para a atração inicial de AMPs às células de microrganismos, que têm em sua superfície elementos estruturais negativamente carregados, como lipopolissacarídeos em bactérias Gram-negativas, ácidos teicoicos e lipoteicoicos em bactérias Gram-positivas, manoproteínas em fungos e lipofosfoglicanos em tripanossomatídeos (Monk e Harding, 2005). Além disso, a importância da carga para a atividade antimicrobiana dos AMPs é respaldada por várias observações. Por exemplo, vários AMPs são sintetizados na forma de uma pré-proteína cuja porção pró é ácida para neutralizar a carga do AMP durante a síntese, transporte e armazenamento, sendo a porção pró clivada no momento da secreção, tornando o AMP ativo (Schrader e Apel, 1991; Mor et al., 1991; Michaelson et al., 1992; Wilson et al., 1999; Cole et al., 2000; Yang et al., 2004). A exclusão de componentes negativos na membrana ou parede celular do microrganismo atenua a atividade antimicrobiana dos AMPs (Bera et al., 2003). Diversos mecanismos de resistência bacteriana aos AMPs foram demonstrados pela incorporação de moléculas positivamente carregadas neutralizando sua carga negativa, como a adição de aminoarabinose ao lipídeo A por *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* (Gunn et al., 1998), a adição de L-lisina ao fosfatidilglicerol (Peschel et al., 2001) e a incorporação de D-alanina (Peschel et al., 1999) por *Staphylococcus aureus*. Os resultados indicam um mecanismo diferente da perda de interação entre WR e *C. albicans* causada pela neutralização de carga, como explicaremos a seguir. Além disso, essa observação é relevante porque tem implicações diretas para o uso clínico de AMPs em concentrações fisiológicas de sal do

hospedeiro, supostamente consideradas um dos principais obstáculos para a transferência de AMPs de estudos *in vitro* para uso clínico, pois o K^+ está em baixa concentração nos fluidos do hospedeiro, portanto, não protegeria as leveduras da morte ().

Após confirmar que a interação de WR com as células de *C. albicans* ocorre na presença de K^+ , iniciamos análises para compreender seu papel na morte induzida por WR. Para testar nossa hipótese de que o efluxo de K^+ está relacionado à morte das células de levedura induzida por WR, bloqueamos os principais canais de efluxo de K^+ , mas o bloqueio dos canais não protegeu as células de *C. albicans* da morte induzida por WR (Fig. 34). Devido à toxicidade apresentada pelos bloqueadores de canais nas células de controle, afetando sua viabilidade, concluímos que os canais foram bloqueados, apesar da falta de proteção observada (Fig. 34). O efluxo de K^+ e o encolhimento celular concomitante são um dos primeiros eventos evidentes no processo de morte celular programada em metazoários (Remillard e Yuan, 2004; Botner e Cidlowski, 2020). Em *C. albicans*, o efluxo de K^+ é uma etapa crítica para desencadear o processo de morte celular regulado por vários fatores, como silimarina (um extrato multicomponente da semente de *Silybum marianum*) (Lee e Lee, 2017), lactoferrina (AMP de *Homo sapiens*) (Andrés et al., 2008), ácido clorogênico (composto fenólico) (Yun e Lee, 2017), cecropina A (AMP isolada da hemolinfa da mariposa *Hyalophora cecropia*) (Yun e Lee, 2016) e histatina 5 (Baev et al., 2003; Han et al., 2016). O bloqueio dos canais de K^+ por substâncias químicas mitiga ou abole os efeitos tóxicos dessas moléculas e protege as leveduras da morte. Nossos resultados indicam outro mecanismo de ação que não é regulado por canais de íons, e uma possibilidade para essa não proteção observada pode ser o evento de permeabilização da membrana, como será explicado abaixo.

Como nossos resultados indicam que o bloqueio dos canais de efluxo de K^+ não interferiu na morte de *C. albicans* induzida por WR, empregamos outra abordagem, a adição exógena de K^+ , com o objetivo de repor sua provável perda conforme indicado pelo encolhimento celular. A adição exógena de K^+ 15 min antes da adição de WR protegeu as células da morte (Tabela 4). É esta modulação da morte pelo K^+ que caracteriza a morte como regulada (Carmona-Gutierrez et al., 2018). Em seguida, analisamos se a proteção conferida pelo K^+ também diminuía quando era adicionado em diferentes momentos em relação a adição de WR. A proteção conferida não é mais significativa já na coincubação (Fig. 35) e quando adicionado 10 min após WR não há nenhuma proteção (Fig. 35). Considerando os resultados anteriores que demonstram a não proteção do AA, o sinal positivo para necrose após 15 min e, a não proteção na adição de K^+ a partir da coincubação, indica a existência de um “ponto de não retorno”. Nesse ponto crítico, a célula aparentemente perde a capacidade de

reverter o processo de morte celular induzido por WR, sendo os níveis de K^+ e o ambiente iônico cruciais para determinar esse processo de morte. Embora íons como K^+ estejam implicados no processo, eles não atuam como agentes executores da morte ou o sinal direto que leva à morte celular. Isso é evidenciado pelo fato de que, quando adicionados após a adição de WR, a célula não pode mais se recuperar desse processo que leva à morte, como demonstrado na Figura 35.

Anteriormente, relatamos efeitos intracelulares, como estresse oxidativo, redução celular e vacuolização/granularização do citoplasma durante a morte celular de *C. albicans* induzida por WR. Portanto, buscamos verificar a ocorrência desses efeitos em tempos iniciais e na presença de K^+ . Nossos resultados demonstram que, nos tempos iniciais de incubação, em 20 min, os efeitos de redução celular, vacuolização citoplasmática e produção de ROS já estão ocorrendo (Figs. 36 e 37) e que a presença do íon K^+ reverte parcialmente a redução celular e a vacuolização do citoplasma, mas o estresse oxidativo continua ocorrendo (Figs. 36 e 37). Esses dados corroboram que a interação de WR com as células continua ocorrendo mesmo na presença de K^+ . Além disso, como os fenótipos de redução celular e vacuolização foram atenuados, mas não abolidos, e as células ainda estavam sofrendo estresse oxidativo na presença de K^+ , o efeito protetor da morte celular induzida pelo K^+ parece não regular o volume celular, que por si só poderia ser o sinal que levaria as leveduras à morte, e também que a proteção não parece estar relacionada a uma simples reposição do K^+ que as células estariam perdendo, pois o fenótipo de redução celular é atenuado, mas ainda presente.

Com base nos dados acima, formulamos duas possíveis situações hipotéticas. Primeiramente, se o K^+ impede a hiperpolarização da membrana plasmática causada pela acidificação do ambiente externo, como demonstrado pela proteção da morte celular regulada em células de *S. cerevisiae* na fase estacionária quando estimuladas por glicose (Granot et al., 2003; Bidiuk et al., 2022). A desencadeação da morte induzida por glicose está relacionada a uma hiperpolarização da membrana plasmática causada por acidificação do meio extracelular. Esse fenômeno é atenuado pela adição de K^+ exogenamente ao meio de cultura ou quando o pH do meio externo é tamponado em pH 7,0, e a proteção nessas situações está relacionada à despolarização da membrana plasmática de leveduras (Bidiuk et al., 2022). Nesse fenômeno, a célula de levedura morre devido à depleção de ATP, gasto para bombear H^+ para o meio extracelular (Dušková et al., 2021). Como esse fenômeno de proteção da morte pela adição de K^+ se sobrepõe às nossas observações, investigamos a relação entre pH, glicose e K^+ no processo de morte de leveduras induzido por WR. Inicialmente, testamos se há proteção contra a morte em meio com pH próximo à neutralidade. Nossos resultados demonstraram

que, quando incubadas em meio com pH 6,7, tamponado com MES, as células de *C. albicans* não foram protegidas da ação tóxica de WR (Tabela 5). Além disso, quando o mesmo ensaio foi repetido em pH 5,6 e sem a adição de glicose, condição que bloquearia a acidificação do meio, também não houve proteção das células da morte. Portanto, este resultado já indica que a proteção proporcionada por K^+ não poderia ser a dissipação do $\Delta\psi$. Para confirmar se o efeito observado por Bidiuk et al. (2022) era o mesmo que estava acontecendo com WR, analisamos o efeito de WR na acidificação do meio induzida por glicose. Nossos resultados demonstraram que WR inibiu a acidificação do meio induzida por glicose no final do tempo analisado, no entanto, causou uma estimulação rápida da acidificação nos primeiros minutos após a interação (Fig. 38). A presença de K^+ inibiu a acidificação em todos os tratamentos com WR, incluindo essa acidificação rápida observada nos primeiros minutos da interação (Fig. 38). Esses dados indicam que essa acidificação rápida que ocorre dentro de 1 min da interação com WR pode ser o sinal que desencadeia mecanismos de morte celular, considerando que seja inibida por K^+ , condição na qual as células de levedura não morrem na presença de WR. O que nossos dados indicam é que o K^+ adicionado ao meio de cultura bloqueia a acidificação do meio, prevenindo assim a formação do ΔpH . Esses resultados indicam que a proteção conferida pelo íon está relacionada à inibição da acidificação e, por esse motivo, não parece ser o mesmo mecanismo proposto por Bidiuk et al. (2022).

Para verificar as inconsistências entre a não proteção pelos bloqueadores de canais de K^+ , a proteção pela adição de K^+ e a inibição da acidificação do meio, analisamos a integridade das membranas plasmáticas das leveduras. O efeito de permeabilização das membranas fúngicas causado pelas defensinas de plantas *Rs*-AFP₂ e *Dm*-AMP₁ pode estar diretamente envolvido na homeostase iônica, permitindo que íons retornem ao ambiente citosólico a partir da membrana permeabilizada (Thevissen et al., 1996). Nossos resultados mostram que as células de *C. albicans* tratadas com WR apresentam suas membranas permeabilizadas desde o momento inicial da interação (Tabela 6), e por esse motivo a inibição da acidificação, bem como a variação de pH podem ser tentadoramente explicados pelo dano da membrana que permite o retorno de íons ao citosol. Muitas classes de AMPs foram mostradas para permeabilizar membranas microbianas, incluindo defensinas de plantas (Thevissen et al., 1999), proteínas de transferência de lipídios de plantas (Regente et al., 2005) e temporinas (AMPs originalmente descritas na secreção cutânea do sapo *Rana temporaria*) (Mangoni et al., 2005). A defensina de planta *NaD*₁ liga-se às paredes celulares das hifas do fungo *Fusarium oxysporum*, causa permeabilização da membrana plasmática e entrada do peptídeo no citoplasma das células, induzindo extravasamento de conteúdos citoplasmáticos e

levando à morte celular (Van der Weerden et al., 2008). O efeito observado de permeabilização da membrana pode explicar a falta de proteção contra a morte da levedura pelos bloqueadores de canais, pois os íons provavelmente extravasam por danos à membrana, assim como a reversão parcial de efeitos intracelulares, como a redução do tamanho celular, pois o K^+ deve atingir um equilíbrio entre a concentração intra e extracelular, proporcionando proteção parcial à redução do tamanho celular quando adicionado exogenamente. Em estudos anteriores, observamos que dentro de 15 min de incubação com WR, células de *C. albicans*, apresentaram marcação positiva para IP, e quando K^+ foi adicionado ao mesmo tempo que WR já não houve proteção da morte induzida e por esse motivo postulamos que nesse ponto a célula já havia decidido seu caminho para a morte, chamamos esse momento de ponto-de-não-retorno. Um ponto de não retorno seria a partir do momento em que a célula começa a degradar seu DNA, no entanto, essa etapa do processo de morte celular regulada ocorre mais tarde (Madeo et al., 1997; Hughes et al., 199). Em leveduras, um ponto de não retorno sugerido é quando a membrana celular perde sua função de barreira seletiva, permitindo a entrada de IP (Rego et al., 2020).

Considerando nossos resultados, indica-se que a proteção contra a morte conferida pelo K^+ parece estar relacionada ao equilíbrio entre as concentrações intracelular e extracelular de K^+ , o que neutraliza o potencial eletroquímico do íon, impedindo-o de sair da célula através de seu gradiente eletroquímico via canais ou transportadores (Hugh Jr e Cidlowski, 1999). Essa conclusão é respaldada, em primeiro lugar, pela proteção conferida pelo íon quando adicionado exogenamente ao meio de cultura (Tabela 4). A adição exógena simula uma inversão da concentração de K^+ no ambiente externo, que é baixa, para uma condição de alta concentração, e isso teria o efeito de bloquear a saída do íon da célula em favor de seu gradiente eletroquímico (Hugh Jr e Cidlowski, 1999). Esses dados são reforçados quando o teste de viabilidade é repetido em água, uma condição que faria a célula perder K^+ para o ambiente externo para regular seu volume, reduzindo a concentração citoplasmática do íon. Nessa condição, a adição de WR, que causa extravasamento de K^+ por um mecanismo ainda desconhecido, atingiria a concentração crítica do íon mais rápido, o que desencadearia o processo de morte, e, portanto, as células morrem mais rapidamente (Tabela 7). A ativação de uma via de morte celular regulada é evidente nos experimentos de adição, após a interação de WR, de K^+ , que quando incubados ao mesmo tempo já não protegem mais a levedura da morte induzida pelos WR. O K^+ está presente em concentrações mais altas nas espécies de *Candida* (200-300 mmol/L) e desempenha papéis importantes em várias funções celulares, incluindo a regulação do pH e do volume celular, a compensação de cargas negativas, a

ativação de processos metabólicos e fatores críticos que incluem a síntese de proteínas e a estabilização e manutenção do potencial de membrana (Ariño et al., 2010).

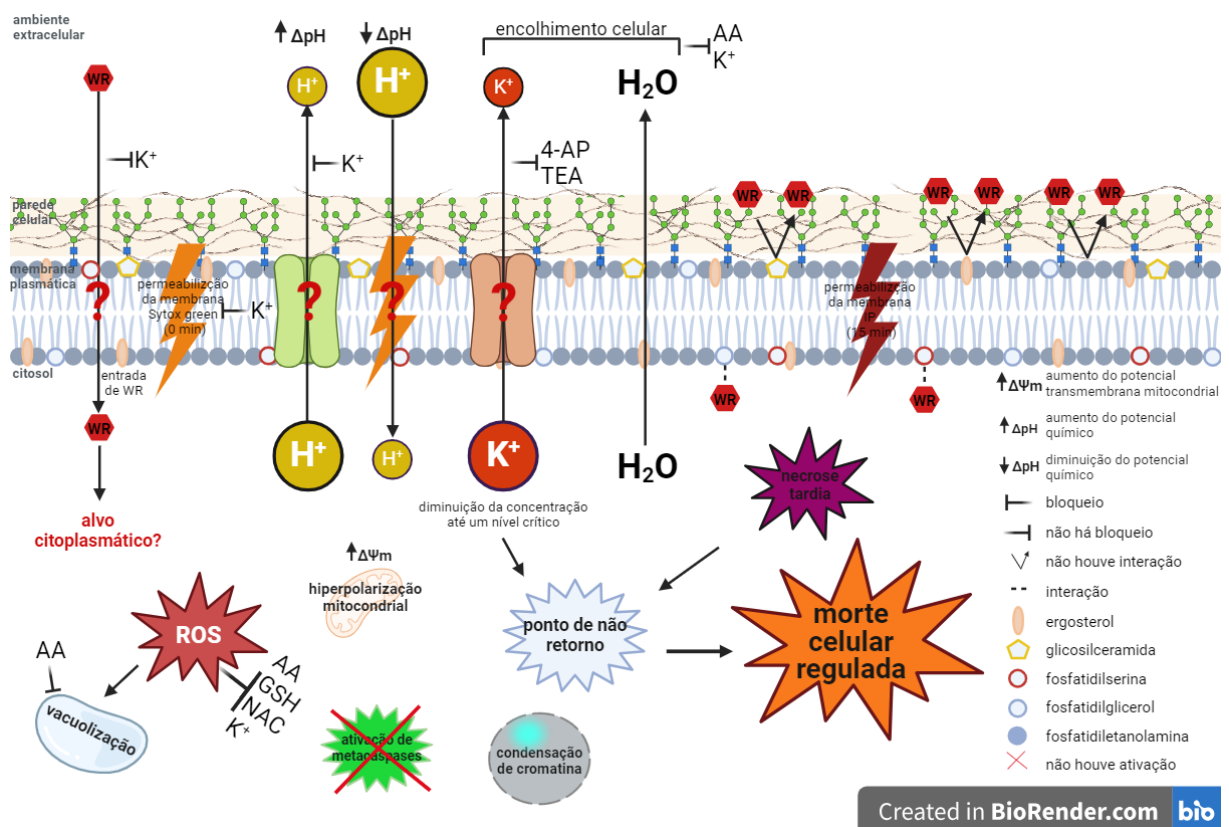
De fato, em células de mamíferos, o K^+ tem sido relatado como desempenhando um papel importante na regulação de enzimas apoptóticas, sendo sua concentração intracelular crítica para a progressão da morte celular programada (Hugues e Clowdisk, 1999). Nossos resultados corroboram a visão de que WR induz, por um mecanismo ainda desconhecido, a extrusão de K^+ , diminuindo sua concentração intracelular abaixo de um nível crítico que possibilita a ativação da cascata de sinalização de morte celular regulada, como já demonstrado para células de mamíferos (Bortner et al., 1997; Hugh e Cidlowski, 1999). Portanto, a proteção contra a morte em células de levedura tratadas com WR e fornecida pelo K^+ adicionado ao meio está relacionada à manutenção da concentração intracelular de K^+ , impedindo que sua concentração interna caia para níveis críticos suficientes para ativar a cascata de sinalização de morte celular regulada, o que, de fato, leva à morte celular. Até onde sabemos, é a primeira vez que esse processo foi descrito para fungos.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho relatamos os efeitos de WR sobre *C. albicans* e propomos um mecanismo de ação em relação ao tipo de morte celular induzida. Nossos resultados foram obtidos com a DL₁₀₀ e dentro do tempo em que WR induz a morte de *C. albicans*. Dentro desse intervalo temporal, nossos resultados permitem obter clareza sobre os eventos desencadeados pela interação peptídeo-célula e sua ordem temporal, proporcionando uma compreensão melhor do processo de morte induzido por WR. A compreensão do processo de morte celular fúngica desencadeado pela interação com AMPs é importante para apoiar o uso clínico de moléculas antifúngicas, uma vez que a falta de compreensão do mecanismo de ação leva ao fracasso em ensaios clínicos mais avançados. Nossos resultados podem ser espelhados por outros AMPs e peptídeos derivados, ajudando a abrir caminho para o uso clínico dessas moléculas.

Neste trabalho relatamos efeitos como estresse oxidativo, condensação de cromatina e sinal positivo para IP, sem o envolvimento de metacaspases, a falta de proteção na presença de antioxidantes indicou que o estresse oxidativo é um sinal intermediário do processo de morte celular, levantando a hipótese de um segundo sinal. Mostramos que WR promoveu uma morte celular regulada (RCD) em *C. albicans*. Avaliamos a interação de WR com lipídeos e membranas e observamos que WR não tem a membrana plasmática como um alvo direto, embora efeitos como a permeabilização da membrana plasmática tenham sido observados. Relatamos efeitos como o encolhimento celular, que em fungos é regulado pelo íon K⁺. Levantamos a hipótese de que a presença de íons, especialmente K⁺, estava envolvida na morte celular WR. Em seguida, buscamos investigar o papel do K⁺ na morte de *C. albicans* induzida por WR. É amplamente relatado na literatura que íons catiônicos neutralizam a atividade de AMPs causando bloqueio de carga (Smith et al., 1996; Goldman, et al., 1997; Ganz e Lehrer, 1999). Usando o peptídeo marcado com fluoróforo 5-FAM, demonstramos que WR é internalizado pelas células e que a presença de K⁺ não bloqueia a entrada, indicando que não há efeito de neutralização nas cargas necessárias para a atração e interação inicial entre WR e as células de *C. albicans*. Nossos dados demonstraram que não há envolvimento direto dos canais de K⁺ e Cl⁻, mas a adição extracelular de K⁺ salvou as células de *C. albicans* da morte induzida por WR. Observamos que, quando adicionado ao mesmo tempo que WR, não há mais proteção contra a morte, indicando que o K⁺ é um sinal intermediário do processo e não o executor da morte celular, esse resultado levantou a possibilidade de que as células *C. albicans* atinjam temporal e fisiologicamente um ponto onde não há mais reversão da morte, chamamos esse momento de ponto de não retorno,

sugerimos que esse ponto aconteça até os 15 min de interação com WR, pois nesse momento já há marcação positiva para IP. Demonstramos também que a presença de K^+ não bloqueou efeitos intracelulares como estresse oxidativo e redução do tamanho celular, contradizendo dados da literatura. Também analisamos os efeitos do pH extracelular, que mostrou não modular a morte celular causada por WR. Além disso, observamos WR causou um estímulo rápido de acidificação do meio no primeiro minuto de interação, que começou a ser revertido já a partir do segundo minuto de monitoramento. Esse estímulo não ocorre na presença de K^+ . Também demonstramos que desde o início de interação com WR, a membrana celular já está permeabilizada. Esses dados podem explicar a falta de proteção dos bloqueadores de canais, a reversão parcial da redução do tamanho celular e a inibição da acidificação. Alguns pontos ainda estão elusivos e serão investigados no futuro, por exemplo, qual o caminho de entrada de WR, por onde o próton e o K^+ saem e como o próton está voltando para o interior da célula.



O conjunto de resultados nos permite concluir que a proteção observada na presença de K^+ está relacionada à manutenção da concentração intracelular de K^+ e não à neutralização das cargas entre WR e *C. albicans*, esse mecanismo impede que a concentração interna atinja níveis críticos que poderiam ativar a cascata de sinalização reguladora da morte celular. Em última análise, essa preservação intracelular de K^+ evita o desencadeamento do processo de morte celular. Até onde sabemos, é a primeira vez que esse processo foi descrito para fungos.

7. REFERÊNCIAS

- 2017 FAO Sustainable food and agriculture. ([s.d.]).
- Abi-Said, D., Anaissie, E., Uzun, O., Raad, I., Pinzcowski, H., & Vartivarian, S. (1997). The Epidemiology of Hematogenous Candidiasis Caused by Different Candida Species. *Clinical Infectious Diseases*, 24(6), 1122–1128. <https://doi.org/10.1086/513663>
- Aerts, A. M., François, I. E. J. A., Meert, E. M. K., Li, Q. T., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2007). The Antifungal Activity of RsAFP2, a Plant Defensin from *Raphanus sativus*, Involves the Induction of Reactive Oxygen Species in *Candida albicans*. *Microbial Physiology*, 13(4), 243–247. <https://doi.org/10.1159/000104753>
- Amaral, V. S. G., Fernandes, C. M., Felício, M. R., Valle, A. S., Quintana, P. G., Almeida, C. C., Barreto-Bergter, E., Gonçalves, S., Santos, N. C., & Kurtenbach, E. (2019). Psd2 pea defensin shows a preference for mimetic membrane rafts enriched with glucosylceramide and ergosterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1861(4), 713–728. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.12.020>
- Andrés, M. T., Acosta-Zaldívar, M., & Fierro, J. F. (2016). Antifungal Mechanism of Action of Lactoferrin: Identification of H⁺-ATPase (P 3A -Type) as a New Apoptotic-Cell Membrane Receptor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7), 4206–4216. <https://doi.org/10.1128/AAC.03130-15>
- Andrés, M. T., Viejo-Díaz, M., & Fierro, J. F. (2008). Human Lactoferrin Induces Apoptosis-Like Cell Death in *Candida albicans*: Critical Role of K⁺-Channel-Mediated K⁺ Efflux. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(11), 4081–4088. <https://doi.org/10.1128/AAC.01597-07>
- Arrigoni, O., & De Tullio, M. C. (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1569(1–3), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00235-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00235-5)
- Ashraf, N., Kubat, R. C., Poplin, V., Adenis, A. A., Denning, D. W., Wright, L., McCotter, O., Schwartz, I. S., Jackson, B. R., Chiller, T., & Bahr, N. C. (2020). Re-drawing the Maps for Endemic Mycoses. *Mycopathologia*, 185(5), 843–865. <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00431-2>
- Baev, D., Li, X. S., Dong, J., Keng, P., & Edgerton, M. (2002). Human Salivary Histatin 5 Causes Disordered Volume Regulation and Cell Cycle Arrest in *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 70(9), 4777–4784. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.9.4777-4784.2002>
- Baev, D., Rivetta, A., Li, X. S., Vylkova, S., Bashi, E., Slayman, C. L., & Edgerton, M. (2003). Killing of *Candida albicans* by Human Salivary Histatin 5 Is Modulated, but Not Determined, by the Potassium Channel TOK1. *Infection and Immunity*, 71(6), 3251–3260. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3251-3260.2003>
- Banerjee, S., Denning, D., & Chakrabarti, A. (2021). One Health aspects & priority roadmap for fungal diseases : A mini-review. *Indian Journal of Medical Research*, 153(3), 311. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_768_21
- Barreto-Santamaría, A., Patarroyo, M. E., & Curtidor, H. (2019). Designing and optimizing new antimicrobial peptides: all targets are not the same. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 56(6), 351–373. <https://doi.org/10.1080/10408363.2019.1631249>
- Benko-Iseppon, A. M., Lins Galdino, S., Calsa Jr., T., Akio Kido, E., Tossi, A., Carlos Belarmino, L., & Crovella, S. (2010). Overview on Plant Antimicrobial Peptides. *Current Protein & Peptide Science*, 11(3), 181–188. <https://doi.org/10.2174/138920310791112075>
- Bera, A., Singh, S., Nagaraj, R., & Vaidya, T. (2003). Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 127(1), 23–35. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00300-6](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00300-6)
- Bidiuk, V. A., Alexandrov, A. I., & Valiakhmetov, A. Ya. (2022). Extracellular pH and high concentration of potassium regulate the primary necrosis in the yeast *Saccharomyces*

- cerevisiae. *Archives of Microbiology*, 204(1), 35. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02708-6>
- Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R., & Denning, D. (2017). Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *Journal of Fungi*, 3(4), 57. <https://doi.org/10.3390/jof3040057>
- Bortner, C. D., & Cidlowski, J. A. (2007). Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: Role in apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462(2), 176–188. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.01.020>
- Bowdish, D. M. E., Davidson, D. J., Lau, Y. E., Lee, K., Scott, M. G., & Hancock, R. E. W. (2004). Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 77(4), 451–459. <https://doi.org/10.1189/jlb.0704380>
- Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C., Thevissen, K., De Samblanx, G. W., Osborn, R. W., & Nielson, K. (1997). Antimicrobial Peptides from Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16(3), 297–323. <https://doi.org/10.1080/07352689709701952>
- Broekaert, W. F., Terras, F. R. G., Cammue, B. P. A., & Vanderleyden, J. (1990). An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiology Letters*, 69(1–2), 55–59. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04174.x>
- Broekaert, W. F., Terras, FRG., Cammue, BPA., & Osborn, R. W. (1995). Plant Defensins: Novel Antimicrobial Peptides as Components of the Host Defense System. *Plant Physiology*, 108(4), 1353–1358. <https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1353>
- Bullock, C. B., McNabb, D. S., & Pinto, I. (2020). Whole-genome approach to understanding the mechanism of action of a histatin 5-derived peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(3). <https://doi.org/10.1128/AAC.01698-19>
- Carmona-Gutierrez, D., Bauer, M. A., Zimmermann, A., Aguilera, A., Austriaco, N., Ayscough, K., Balzan, R., Bar-Nun, S., Barrientos, A., Belenky, P., Blondel, M., Braun, R. J., Breitenbach, M., Burhans, W. C., Buettner, S., Cavalieri, D., Chang, M., Cooper, K. F., Côte-Real, M., ... Madeo, F. (2018). Guidelines and recommendations on yeast cell death nomenclature. *Microbial Cell*, 5(1), 4–31. <https://doi.org/10.15698/mic2018.01.607>
- Carvalho, A. de O., & Gomes, V. M. (2011). Plant Defensins and Defensin-Like Peptides - Biological Activities and Biotechnological Applications. *Current Pharmaceutical Design*, 17(38), 4270–4293. <https://doi.org/10.2174/138161211798999447>
- Carvalho, A. O., Machado, O. L. T., Da Cunha, M., Santos, I. S., & Gomes, V. M. (2001). Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTPin *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(2), 137–146. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)01230-4](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)01230-4)
- Carvalho, A., S. Filho, G., Ferreira, B., Branco, A., Okorokova-Facanha, A., & Gomes, V. (2006). Cloning and Characterization of a cDNA Encoding a Cowpea Seed Defensin and Analysis of its Expression. *Protein & Peptide Letters*, 13(10), 1029–1036. <https://doi.org/10.2174/092986606778777515>
- Chang, C. K., Kao, M. C., & Lan, C. Y. (2021). Antimicrobial Activity of the Peptide LfcinB15 against *Candida albicans*. *Journal of fungi*, 7(7). <https://doi.org/10.3390/JOF7070519>
- Chaves, S. R., Rego, A., Martins, V. M., Santos-Pereira, C., Sousa, M. J., & Côte-Real, M. (2021). Regulation of Cell Death Induced by Acetic Acid in Yeasts. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.642375>
- Cole, A. M., Darouiche, R. O., Legarda, D., Connell, N., & Diamond, G. (2000). Characterization of a Fish Antimicrobial Peptide: Gene Expression, Subcellular Localization, and Spectrum of Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(8), 2039–2045. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.8.2039-2045.2000>

- Colilla, F. J., Rocher, A., & Mendez, E. (1990). γ -Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Letters*, 270(1–2), 191–194. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81265-P](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81265-P)
- Colón-Gaud, C., Whiles, M. R., Kilham, S. S., Lips, K. R., Pringle, C. M., Connelly, S., & Peterson, S. D. (2009). Assessing ecological responses to catastrophic amphibian declines: Patterns of macroinvertebrate production and food web structure in upland Panamanian streams. *Limnology and Oceanography*, 54(1), 331–343. <https://doi.org/10.4319/LO.2009.54.1.0331>
- Cools, T. L., Vriens, K., Struyfs, C., Verbandt, S., Ramada, M. H. S., Brand, G. D., Bloch, C., Koch, B., Traven, A., Drijfhout, J. W., Demuyser, L., Kucharíková, S., Van Dijck, P., Spasic, D., Lammertyn, J., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2017). The Antifungal Plant Defensin HsAFP1 Is a Phosphatidic Acid-Interacting Peptide Inducing Membrane Permeabilization. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02295>
- Costa-de-Oliveira, S., & Rodrigues, A. G. (2020). *Candida albicans* Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal. *Microorganisms*, 8(2), 154. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020154>
- Crusca, E., Basso, L. G. M., Altei, W. F., & Marchetto, R. (2018). Biophysical characterization and antitumor activity of synthetic Pantinin peptides from scorpion's venom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(11), 2155–2165. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.08.012>
- Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., & Dhama, K. (2018). *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis*, 117, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.028>
- De Francesco, M. A., Piccinelli, G., Gelmi, M., Gargiulo, F., Ravizzola, G., Pinsi, G., Peroni, L., Bonfanti, C., & Caruso, A. (2017). Invasive Candidiasis in Brescia, Italy: Analysis of Species Distribution and Antifungal Susceptibilities During Seven Years. *Mycopathologia*, 182(9–10), 897–905. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0155-3>
- De Samblanx, G. W., Goderis, I. J., Thevissen, K., Raemaekers, R., Fant, F., Borremans, F., Acland, D. P., Osborn, R. W., Patel, S., & Broekaert, W. F. (1997). Mutational Analysis of a Plant Defensin from Radish (*Raphanus sativus* L.) Reveals Two Adjacent Sites Important for Antifungal Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 272(2), 1171–1179. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.2.1171>
- Denning, D. W. (2024). Global incidence and mortality of severe fungal disease. *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00692-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00692-8)
- Denning, D. W., & Hope, W. W. (2010). Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends in Microbiology*, 18(5), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.02.004>
- Diekema, D. J., Messer, S. A., Boyken, L. B., Hollis, R. J., Kroeger, J., Tendolkar, S., & Pfaller, M. A. (2009). In Vitro Activity of Seven Systemically Active Antifungal Agents against a Large Global Collection of Rare *Candida* Species as Determined by CLSI Broth Microdilution Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(10), 3170–3177. <https://doi.org/10.1128/JCM.00942-09>
- Doi, A. M., Pignatari, A. C. C., Edmond, M. B., Marra, A. R., Camargo, L. F. A., Siqueira, R. A., da Mota, V. P., & Colombo, A. L. (2016). Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLOS ONE*, 11(1), e0146909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146909>
- Emma, W. G., Olusola, O. S., & Simeon, O. K. (2003). The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants. *African Journal of Biotechnology*, 2(2), 26–32. <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1005>

- Fisher, M. C., & Garner, T. W. J. (2020). Chytrid fungi and global amphibian declines. *Nature Reviews Microbiology*, 18(6), 332–343. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0335-x>
- Fisher, M. C., Hawkins, N. J., Sanglard, D., & Gurr, S. J. (2018). Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, 360(6390), 739–742. <https://doi.org/10.1126/science.aap7999>
- Fisher, M. C., Henk, Daniel. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., & Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484(7393), 186–194. <https://doi.org/10.1038/nature10947>
- Forsberg, K., Woodworth, K., Walters, M., Berkow, E. L., Jackson, B., Chiller, T., & Vallabhaneni, S. (2019). *Candida auris*: The recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. *Medical Mycology*, 57(1), 1–12. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy054>
- Fu, J., Ding, Y., Wei, B., Wang, L., Xu, S., Qin, P., Wei, L., & Jiang, L. (2017). Epidemiology of *Candida albicans* and non-*C.albicans* of neonatal candidemia at a tertiary care hospital in western China. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 329. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2423-8>
- Gachomo, E. W., Jimenez-Lopez, J. C., Kayodé, A. P. P., Baba-Moussa, L., & Kotchoni, S. O. (2012). Structural characterization of plant defensin protein superfamily. *Molecular Biology Reports*, 39(4), 4461–4469. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1235-y>
- Gachomo, E. W., Seufferheld, M. J., & Kotchoni, S. O. (2010). Melanization of appressoria is critical for the pathogenicity of *Diplocarpon rosae*. *Molecular Biology Reports*, 37(7), 3583–3591. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0007-4>
- Ganz, T., & Lehrer, R. I. (1999). Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Molecular Medicine Today*, 5(7), 292–297. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(99\)01490-2](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(99)01490-2)
- Garcia-Rubio, R., Cuenca-Estrella, M., & Mellado, E. (2017). Triazole Resistance in *Aspergillus* Species: An Emerging Problem. *Drugs*, 77(6), 599–613. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0714-4>
- Giuliani, A., Pirri, G., & Nicoletto, S. (2007). Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sciences*, 2(1), 1–33. <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0010-5>
- Goel, R. R., Apostolidis, S. A., Painter, M. M., Mathew, D., Pattekar, A., Kuthuru, O., Gouma, S., Hicks, P., Meng, W., Rosenfeld, A. M., Dysinger, S., Lundgreen, K. A., Kuri-Cervantes, L., Adamski, S., Hicks, A., Korte, S., Oldridge, D. A., Baxter, A. E., Giles, J. R., ... Wherry, E. J. (2021). Distinct antibody and memory B cell responses in SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals following mRNA vaccination. *Science Immunology*, 6(58), 1–19. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abi6950>
- Goffeau, A., & Slayman, C. W. (1981). The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*, 639(3–4), 197–223. [https://doi.org/10.1016/0304-4173\(81\)90010-0](https://doi.org/10.1016/0304-4173(81)90010-0)
- Goldman, M. J., Anderson, G. M., Stolzenberg, E. D., Kari, U. P., Zasloff, M., & Wilson, J. M. (1997). Human β -Defensin-1 Is a Salt-Sensitive Antibiotic in Lung That Is Inactivated in Cystic Fibrosis. *Cell*, 88(4), 553–560. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81895-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81895-4)
- GRANOT, D., LEVINE, A., & DORHEFETZ, E. (2003). Sugar-induced apoptosis in yeast cells. *FEMS Yeast Research*, 4(1), 7–13. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00154-5](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00154-5)
- Guaragnella, N., Passarella, S., Marra, E., & Giannattasio, S. (2010). Knock-out of metacaspase and/or cytochrome c results in the activation of a ROS-independent acetic acid-induced programmed cell death pathway in yeast. *FEBS Letters*, 584(16), 3655–3660. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2010.07.044>
- Gunn, J. S., Lim, K. B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L., Hackett, M., & Miller, S. I. (1998). PmrA–PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and

- polymyxin resistance. *Molecular Microbiology*, 27(6), 1171–1182. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00757.x>
- Gürsoy, U. K., Salli, K., Söderling, E., Gürsoy, M., Hirvonen, J., & Ouwehand, A. C. (2021). Regulation of hBD-2, hBD-3, hCAP18/LL37, and Proinflammatory Cytokine Secretion by Human Milk Oligosaccharides in an Organotypic Oral Mucosal Model. *Pathogens*, 10(6), 739. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060739>
- Han, J., Jyoti, Md. A., Song, H.-Y., & Jang, W. S. (2016). Antifungal Activity and Action Mechanism of Histatin 5-Halocidin Hybrid Peptides against *Candida* ssp. *PLOS ONE*, 11(2), e0150196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150196>
- Hayes, B., Bleackley, M., Anderson, M., & Van der Weerden, N. (2018). The Plant Defensin Nad1 Enters the Cytoplasm of *Candida albicans* via Endocytosis. *Journal of Fungi*, 4(1), 20. <https://doi.org/10.3390/jof4010020>
- Hayes, B. M. E., Bleackley, M. R., Wiltshire, J. L., Anderson, M. A., Traven, A., & Weerden, N. L. Van Der. (2013). Identification and mechanism of action of the plant defensin nad1 as a new member of the antifungal drug arsenal against *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), 3667–3675. <https://doi.org/10.1128/AAC.00365-13>
- Hegedüs, N., & Marx, F. (2013). Antifungal proteins: More than antimicrobials? *Fungal Biology Reviews*, 26(4), 132–145. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.002>
- Henzler-Wildman, K. A., Martinez, G. V., Brown, M. F., & Ramamoorthy, A. (2004). Perturbation of the Hydrophobic Core of Lipid Bilayers by the Human Antimicrobial Peptide LL-37. *Biochemistry*, 43(26), 8459–8469. <https://doi.org/10.1021/bi036284s>
- Hoque, M. N., Akter, S., Mishu, I. D., Islam, M. R., Rahman, M. S., Akhter, M., Islam, I., Hasan, M. M., Rahaman, M. M., Sultana, M., Islam, T., & Hossain, M. A. (2021). Microbial co-infections in COVID-19: Associated microbiota and underlying mechanisms of pathogenesis. *Microbial Pathogenesis*, 156, 104941. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2021.104941>
- Hoskin, D. W., & Ramamoorthy, A. (2008). Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(2), 357–375. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.11.008>
- Ioannou, P., Baliou, S., & Kofteridis, D. P. (2023). Antimicrobial Peptides in Infectious Diseases and Beyond—A Narrative Review. *Life*, 13(8), 1651. <https://doi.org/10.3390/life13081651>
- Ishaq, N., Bilal, M., & Iqbal, H. (2019). Medicinal Potentialities of Plant Defensins: A Review with Applied Perspectives. *Medicines*, 6(1), 29. <https://doi.org/10.3390/medicines6010029>
- Izadpanah, A., & Gallo, R. L. (2005). Antimicrobial peptides. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52(3), 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.08.026>
- Janssen, B. J. C., Schirra, H. J., Lay, F. T., Anderson, M. A., & Craik, D. J. (2003). Structure of *Petunia hybrida* Defensin 1, a Novel Plant Defensin with Five Disulfide Bonds. *Biochemistry*, 42(27), 8214–8222. <https://doi.org/10.1021/bi034379o>
- Knight, G. M., Glover, R. E., McQuaid, C. F., Olaru, I. D., Gallandat, K., Leclerc, Q. J., Fuller, N. M., Willcocks, S. J., Hasan, R., van Kleef, E., & Chandler, C. I. (2021). Antimicrobial resistance and COVID-19: Intersections and implications. *eLife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.64139>
- Kumar, C., Igarria, A., D’Autreaux, B., Planson, A.-G., Junot, C., Godat, E., Bachhawat, A. K., Delaunay-Moisan, A., & Toledano, M. B. (2011). Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *The EMBO Journal*, 30(10), 2044–2056. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.105>
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J., & Straus, S. (2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>

- Kusch, H., Engelmann, S., Albrecht, D., Morschhäuser, J., & Hecker, M. (2007). Proteomic analysis of the oxidative stress response in *Candida albicans*. *PROTEOMICS*, 7(5), 686–697. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600575>
- Kwon, Y.-Y., Choi, K.-M., Cho, C., & Lee, C.-K. (2015). Mitochondrial Efficiency-Dependent Viability of *Saccharomyces cerevisiae* Mutants Carrying Individual Electron Transport Chain Component Deletions. *Molecules and Cells*, 38(12), 1054–1063. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0153>
- Lacerda, A. F., Vasconcelos, A. A. R., Pelegrini, P. B., & Grossi de Sa, M. F. (2014). Antifungal defensins and their role in plant defense. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00116>
- Lauff, D. B., & Santa-María, G. E. (2010). Potassium deprivation is sufficient to induce a cell death program in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00628.x>
- Lee, W., & Lee, D. G. (2018). Reactive oxygen species modulate itraconazole-induced apoptosis via mitochondrial disruption in *Candida albicans*. *Free Radical Research*, 52(1), 39–50. <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1407412>
- Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., & Coy, D. H. (2019). The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*, 7, 3919–3931.
- Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10(S12), S122–S129. <https://doi.org/10.1038/nm1145>
- Li, Y., Sun, L., Lu, C., Gong, Y., Li, M., & Sun, S. (2018). Promising Antifungal Targets Against *Candida albicans* Based on Ion Homeostasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00286>
- Lockhart, S. R., Etienne, K. A., Vallabhaneni, S., Farooqi, J., Chowdhary, A., Govender, N. P., Colombo, A. L., Calvo, B., Cuomo, C. A., Desjardins, C. A., Berkow, E. L., Castanheira, M., Magobo, R. E., Jabeen, K., Asghar, R. J., Meis, J. F., Jackson, B., Chiller, T., & Litvintseva, A. P. (2017). Editor's choice: Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 64(2), 134. <https://doi.org/10.1093/CID/CIW691>
- Lockhart, S. R., Iqbal, N., Cleveland, A. A., Farley, M. M., Harrison, L. H., Bolden, C. B., Baughman, W., Stein, B., Hollick, R., Park, B. J., & Chiller, T. (2012). Species Identification and Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Bloodstream Isolates from Population-Based Surveillance Studies in Two U.S. Cities from 2008 to 2011. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(11), 3435–3442. <https://doi.org/10.1128/JCM.01283-12>
- López-Abarrategui, C., Alba, A., Silva, O. N., Reyes-Acosta, O., Vasconcelos, I. M., Oliveira, J. T. A., Migliolo, L., Costa, M. P., Costa, C. R., Silva, M. R. R., Garay, H. E., Dias, S. C., Franco, O. L., & Otero-González, A. J. (2012). Functional characterization of a synthetic hydrophilic antifungal peptide derived from the marine snail *Cenchritis muricatus*. *Biochimie*, 94(4), 968–974. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.12.016>
- Lorch, J. M., Meteyer, C. U., Behr, M. J., Boyles, J. G., Cryan, P. M., Hicks, A. C., Ballmann, A. E., Coleman, J. T. H., Redell, D. N., Reeder, D. M., & Blehert, D. S. (2011). Experimental infection of bats with *Geomyces destructans* causes white-nose syndrome. *Nature*, 480(7377), 376–378. <https://doi.org/10.1038/nature10590>
- Lucas, D. R., Damica, F. Z., Toledo, E. B., Cogo, A. J. D., Okorokova-Façanha, A. L., Gomes, V. M., & de Oliveira Carvalho, A. (2023). Bioinspired peptides induce different cell death mechanisms against opportunistic yeasts. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10064-8>

- Luo, Y., & Song, Y. (2021). Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11401. <https://doi.org/10.3390/ijms222111401>
- Machida, K., & Tanaka, T. (1999). Farnesol-induced generation of reactive oxygen species dependent on mitochondrial transmembrane potential hyperpolarization mediated by F₀F₁-ATPase in yeast. *FEBS Letters*, 462(1–2), 108–112. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01506-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01506-9)
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H., & Fröhlich, K.-U. (1999). Oxygen Stress: A Regulator of Apoptosis in Yeast. *The Journal of Cell Biology*, 145(4), 757–767. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.4.757>
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S. J., Wesselborg, S., & Fröhlich, K.-U. (2002). A Caspase-Related Protease Regulates Apoptosis in Yeast. *Molecular Cell*, 9(4), 911–917. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00501-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00501-4)
- Mangoni, M. L., Saugar, J. M., Dellisanti, M., Barra, D., Simmaco, M., & Rivas, L. (2005). Temporins, Small Antimicrobial Peptides with Leishmanicidal Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(2), 984–990. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410795200>
- Maróti, G., Kereszt, A., Kondorosi, É., & Mergaert, P. (2011). Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Research in Microbiology*, 162(4), 363–374. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.02.005>
- Martins, A. C., Psaltikidis, E. M., de Lima, T. C., Fagnani, R., Schreiber, A. Z., de Oliveira Conterno, L., Kamei, K., Watanabe, A., Trabasso, P., Resende, M. R., & Moretti, M. L. (2021). COVID-19 and invasive fungal coinfections: A case series at a Brazilian referral hospital. *Journal de mycologie medicale*, 31(4). <https://doi.org/10.1016/J.MYCMED.2021.101175>
- Masso-Silva, J., & Diamond, G. (2014). Antimicrobial Peptides from Fish. *Pharmaceuticals*, 7(3), 265–310. <https://doi.org/10.3390/ph7030265>
- Mello, É. de O., Taveira, G. B., de Oliveira Carvalho, A., & Gomes, V. M. (2019). Improved smallest peptides based on positive charge increase of the γ -core motif from P ν D1 and their mechanism of action against *Candida* species. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 14, 407–420. <https://doi.org/10.2147/IJN.S187957>
- Michaelson, D., Rayner, J., Couto, M., & Ganz, T. (1992). Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? *Journal of Leukocyte Biology*, 51(6), 634–639. <https://doi.org/10.1002/jlb.51.6.634>
- Mirski, T., Niemcewicz, M., Bartoszcze, M., Gryko, R., & Michalski, A. (2017). Utilisation of peptides against microbial infections – a review. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 25(2), 205–210. <https://doi.org/10.26444/aaem/74471>
- Mishra, N., Prasad, T., Sharma, N., Prasad, R., & Gupta, D. (2007). Membrane fluidity and lipid composition in clinical isolates of *Candida albicans* isolated from AIDS/HIV patients. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 54(4), 367–377. <https://doi.org/10.1556/amicr.54.2007.4.4>
- Mochon, A. B., & Liu, H. (2008). The Antimicrobial Peptide Histatin-5 Causes a Spatially Restricted Disruption on the *Candida albicans* Surface, Allowing Rapid Entry of the Peptide into the Cytoplasm. *PLoS Pathogens*, 4(10), e1000190. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000190>
- Monk, B. C., Niimi, K., Lin, S., Knight, A., Kardos, T. B., Cannon, R. D., Parshot, R., King, A., Lun, D., & Harding, D. R. K. (2005). Surface-Active Fungicidal α -Peptide Inhibitors of the Plasma Membrane Proton Pump That Block Azole Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), 57–70. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.57-70.2005>

- Mor, A., Nguyen Van Huong, Delfour, A., Migliore-Samour, D., & Nicolas, P. (1991). Isolation, amino acid sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry*, 30(36), 8824–8830. <https://doi.org/10.1021/bi00100a014>
- Moretta, A., Scieuzo, C., Petrone, A. M., Salvia, R., Manniello, M. D., Franco, A., Lucchetti, D., Vassallo, A., Vogel, H., Sgambato, A., & Falabella, P. (2021). Antimicrobial Peptides: A New Hope in Biomedical and Pharmaceutical Fields. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.668632>
- Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W., & Goździcka-Józefiak, A. (2014). Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiologica*, 59(3), 181–196. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0280-4>
- Oren, Z., & Shai, Y. (1997). Selective Lysis of Bacteria but Not Mammalian Cells by Diastereomers of Melittin: Structure–Function Study. *Biochemistry*, 36(7), 1826–1835. <https://doi.org/10.1021/bi9625071>
- Parisi, K., Shafee, T. M. A., Quimbar, P., van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. A. (2019). The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 88, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.004>
- Park, C. B., Kim, H. S., & Kim, S. C. (1998). Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II Kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244(1), 253–257. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8159>
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W., Kalbacher, H., Jung, G., & Götz, F. (1999). Inactivation of the *dlt* Operon in *Staphylococcus aureus* Confers Sensitivity to Defensins, Protegrins, and Other Antimicrobial Peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 274(13), 8405–8410. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8405>
- Pinheiro da Silva, F., & Machado, M. C. C. (2012). Antimicrobial peptides: Clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides*, 36(2), 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.05.014>
- Pristov, K. E., & Ghannoum, M. A. (2019). Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(7), 792–798. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.028>
- Pushpanathan, M., Gunasekaran, P., & Rajendhran, J. (2013). Antimicrobial Peptides: Versatile Biological Properties. *International Journal of Peptides*, 2013, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2013/675391>
- Ramesh, S., Govender, T., Kruger, H. G., de la Torre, B. G., & Albericio, F. (2016). Short AntiMicrobial Peptides (SAMPs) as a class of extraordinary promising therapeutic agents. *Journal of Peptide Science*, 22(7), 438–451. <https://doi.org/10.1002/psc.2894>
- Regente, M. C., Giudici, A. M., Villalain, J., & Canal, L. (2005). The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Letters in Applied Microbiology*, 40(3), 183–189. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01647.x>
- Remillard, C. V., & Yuan, J. X.-J. (2004). Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286(1), L49–L67. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00041.2003>
- Rezasoltani, S., Yadegar, A., Hatami, B., Asadzadeh Aghdaei, H., & Zali, M. R. (2020). Antimicrobial Resistance as a Hidden Menace Lurking Behind the COVID-19 Outbreak: The Global Impacts of Too Much Hygiene on AMR. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.590683>
- Ribeiro, C. C., Monteiro, R. M., Freitas, F. P., Retamal, C., Teixeira, L. R. S., Palma, L. M., Silva, F. E., Façanha, A. R., Okorokova-Façanha, A. L., & Okorokov, L. A. (2012). Extracellular Glucose Increases the Coupling Capacity of the Yeast V_H⁺-ATPase and the

- Resistance of Its H⁺ Transport Activity to Nitrate Inhibition. *PLoS ONE*, 7(11), e49580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049580>
- Robbins, N., Caplan, T., & Cowen, L. E. (2017). Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. *Annual Review of Microbiology*, 71(1), 753–775. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-030117-020345>
- Rodrigues, M. L., & Nosanchuk, J. D. (2020). Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(2), e0007964. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007964>
- Roscia, G., Falciani, C., Bracci, L., & Pini, A. (2013). The Development of Antimicrobial Peptides as New Antibacterial Drugs. *Current Protein & Peptide Science*, 14(8), 641–649. <https://doi.org/10.2174/138920371408131227155308>
- Rusic, D., Vilovic, M., Bukic, J., Leskur, D., Seselja Perisin, A., Kumric, M., Martinovic, D., Petric, A., Modun, D., & Bozic, J. (2021). Implications of COVID-19 Pandemic on the Emergence of Antimicrobial Resistance: Adjusting the Response to Future Outbreaks. *Life*, 11(3), 220. <https://doi.org/10.3390/life11030220>
- Salas, C. E., Badillo-Corona, J. A., Ramírez-Sotelo, G., & Oliver-Salvador, C. (2015). Biologically Active and Antimicrobial Peptides from Plants. *BioMed Research International*, 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/102129>
- Sambrook, J. F., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual: Vol. 3 volumes (1a edição)*.
- Sanglard, D. (2016). Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. *Frontiers in Medicine*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmed.2016.00011>
- Schaaper, W. M. M., Posthuma, G. A., Meloen, R. H., Plasman, H. H., Sijtsma, L., Van Amerongen, A., Fant, F., Borremans, F. A. M., Thevissen, K., & Broekaert, W. F. (2001). Synthetic peptides derived from the β 2– β 3 loop of *Raphanus sativus* antifungal protein 2 that mimic the active site. *The Journal of Peptide Research*, 57(5), 409–418. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2001.00842.x>
- Schmitt, P., Rosa, R. D., & Destoumieux-Garzón, D. (2016). An intimate link between antimicrobial peptide sequence diversity and binding to essential components of bacterial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(5), 958–970. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.011>
- SCHRADER, G., & APEL, K. (1991). Isolation and characterization of cDNAs encoding viscotoxins of mistletoe (*Viscum album*). *European Journal of Biochemistry*, 198(3), 549–553. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16049.x>
- Seagle, E. E., Williams, S. L., & Chiller, T. M. (2021). Recent Trends in the Epidemiology of Fungal Infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, 35(2), 237–260. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.03.001>
- Shabir, U., Ali, S., Magray, A. R., Ganai, B. A., Firdous, P., Hassan, T., & Nazir, R. (2018). Fish antimicrobial peptides (AMP's) as essential and promising molecular therapeutic agents: A review. *Microbial Pathogenesis*, 114, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.039>
- Shafee, T. M. A., Lay, F. T., Phan, T. K., Anderson, M. A., & Hulett, M. D. (2017). Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(4), 663–682. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2344-5>
- Sierra, J. M., Fusté, E., Rabanal, F., Vinuesa, T., & Viñas, M. (2017). An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 17(6), 663–676. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1315402>
- Silva, O. N., Mulder, K. C. L., Barbosa, A. E. A. D., Otero-Gonzalez, A. J., Lopez-Abarrategui, C., Rezende, T. M., Dias, S. C., & Franco, O. L. (2011). Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00232>

- Smith, J. J., Travis, S. M., Greenberg, E. P., & Welsh, M. J. (1996). Cystic Fibrosis Airway Epithelia Fail to Kill Bacteria Because of Abnormal Airway Surface Fluid. *Cell*, 85(2), 229–236. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81099-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81099-5)
- Soares, J. R., José Tenório de Melo, E., da Cunha, M., Fernandes, K. V. S., Taveira, G. B., da Silva Pereira, L., Pimenta, S., Trindade, F. G., Regente, M., Pinedo, M., de la Canal, L., Gomes, V. M., & de Oliveira Carvalho, A. (2017). Interaction between the plant ApDef1 defensin and *Saccharomyces cerevisiae* results in yeast death through a cell cycle- and caspase-dependent process occurring via uncontrolled oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861(1), 3429–3443. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.09.005>
- Souza, G. S., de Carvalho, L. P., de Melo, E. J. T., da Silva, F. C. V., Machado, O. L. T., Gomes, V. M., & de Oliveira Carvalho, A. (2019). A synthetic peptide derived of the $\beta 2$ – $\beta 3$ loop of the plant defensin from *Vigna unguiculata* seeds induces *Leishmania amazonensis* apoptosis-like cell death. *Amino Acids*, 51(10–12), 1633–1648. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02800-8>
- Spallone, A., & Schwartz, I. S. (2021). Emerging Fungal Infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, 35(2), 261–277. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.03.014>
- Srivastava, S., Dashora, K., Ameta, K. L., Singh, N. P., El-Enshasy, H. A., Pagano, M. C., Hesham, A. E., Sharma, G. D., Sharma, M., & Bhargava, A. (2021). Cysteine-rich antimicrobial peptides from plants: The future of antimicrobial therapy. *Phytotherapy Research*, 35(1), 256–277. <https://doi.org/10.1002/ptr.6823>
- Strange, R. N., & Scott, P. R. (2005). Plant Disease: A Threat to Global Food Security. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 83–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839>
- Tam, J., Wang, S., Wong, K., & Tan, W. (2015). Antimicrobial Peptides from Plants. *Pharmaceuticals*, 8(4), 711–757. <https://doi.org/10.3390/ph8040711>
- Tanida, T., Okamoto, T., Ueta, E., Yamamoto, T., & Osaki, T. (2006). Antimicrobial peptides enhance the candidacidal activity of antifungal drugs by promoting the efflux of ATP from *Candida* cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(1), 94–103. <https://doi.org/10.1093/jac/dki402>
- Tavares, P. M., Thevissen, K., Cammue, B. P. A., François, I. E. J. A., Barreto-Bergter, E., Taborda, C. P., Marques, A. F., Rodrigues, M. L., & Nimrichter, L. (2008). In Vitro Activity of the Antifungal Plant Defensin RsAFP2 against *Candida* Isolates and Its In Vivo Efficacy in Prophylactic Murine Models of Candidiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(12), 4522–4525. <https://doi.org/10.1128/AAC.00448-08>
- 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. (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *The Plant Cell*, 7(5), 573–588. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.5.573>
- Terras, F. R. G., Torrekens, S., Van Leuven, F., Osborn, R. W., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A., & Broekaert, W. F. (1993). A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Letters*, 316(3), 233–240. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81299-F](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81299-F)
- Tetorya, M., Li, H., Djami-Tchatchou, A. T., Buchko, G. W., Czymbek, K. J., & Shah, D. M. (2023). Plant defensin M t De f 4 -derived antifungal peptide with multiple modes of action and potential as a bio-inspired fungicide. *Molecular Plant Pathology*, 24(8), 896–913. <https://doi.org/10.1111/mpp.13336>
- Thevissen, K., Ghazi, A., De Samblanx, G. W., Brownlee, C., Osborn, R. W., & Broekaert, W. F. (1996). Fungal Membrane Responses Induced by Plant Defensins and Thionins. *Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 15018–15025. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.25.15018>

- Thevissen, K., Osborn, R. W., Acland, D. P., & Broekaert, W. F. (2000). Specific Binding Sites for an Antifungal Plant Defensin from Dahlia (*Dahlia merckii*) on Fungal Cells Are Required for Antifungal Activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(1), 54–61. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.1.54>
- Thevissen, K., Terras, F. R. G., & Broekaert, W. F. (1999). Permeabilization of Fungal Membranes by Plant Defensins Inhibits Fungal Growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5451–5458. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.12.5451-5458.1999>
- Thevissen, K., Warnecke, D. C., François, I. E. J. A., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., Zähringer, U., Thomma, B. P. H. J., Ferket, K. K. A., & Cammue, B. P. A. (2004). Defensins from Insects and Plants Interact with Fungal Glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 3900–3905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311165200>
- Thomma, B., Cammue, B., & Thevissen, K. (2002). Plant defensins. *Planta*, 216(2), 193–202. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0902-6>
- Toledo, E. B., Lucas, D. R., Simão, T. L. B. V., Calixto, S. D., Lassounskaia, E., Muzitano, M. F., Damica, F. Z., Gomes, V. M., & de Oliveira Carvalho, A. (2021). Design of improved synthetic antifungal peptides with targeted variations in charge, hydrophobicity and chirality based on a correlation study between biological activity and primary structure of plant defensin γ -cores. *Amino Acids*, 53(2), 219–237. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02929-x>
- Torres, M. D. T., Sothiselvam, S., Lu, T. K., & de la Fuente-Nunez, C. (2019). Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3547–3567. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.015>
- Tsui, C., Kong, E. F., & Jabra-Rizk, M. A. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease*, 74(4), ftw018. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018>
- Tsukatani, T., Oba, T., Ukeda, H., & Matsumoto, K. (2003). Spectrophotometric Assay of Yeast Vitality Using 2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-benzoquinone and Tetrazolium Salts. *Analytical Sciences* 2000 19:5, 19(5), 659–664. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.19.659>
- Tukenmez Tigen, E., Bilgin, H., Perk Gurun, H., Dogru, A., Ozben, B., Cerikcioglu, N., & Korten, V. (2017). Risk factors, characteristics, and outcomes of candidemia in an adult intensive care unit in Turkey. *American Journal of Infection Control*, 45(6), e61–e63. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.02.022>
- Turner, J., Cho, Y., Dinh, N.-N., Waring, A. J., & Lehrer, R. I. (1998). Activities of LL-37, a Cathelin-Associated Antimicrobial Peptide of Human Neutrophils. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(9), 2206–2214. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.9.2206>
- Ulaszewski, S., Balzi, E., & Goffeau, A. (1987). Genetic and molecular mapping of the *pma1* mutation conferring vanadate resistance to the plasma membrane ATPase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics MGG*, 207(1), 38–46. <https://doi.org/10.1007/BF00331488>
- Van der Weerden, N. L., & Anderson, M. A. (2013). Plant defensins: Common fold, multiple functions. *Fungal Biology Reviews*, 26(4), 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.08.004>
- van der Weerden, N. L., Lay, F. T., & Anderson, M. A. (2008). The Plant Defensin, NaD1, Enters the Cytoplasm of *Fusarium Oxysporum* Hyphae. *Journal of Biological Chemistry*, 283(21), 14445–14452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709867200>
- Vriens, K., Cammue, B., & Thevissen, K. (2014). Antifungal Plant Defensins: Mechanisms of Action and Production. *Molecules*, 19(8), 12280–12303. <https://doi.org/10.3390/molecules190812280>
- Vylkova, S., Nayyar, N., Li, W., & Edgerton, M. (2007). Human β -Defensins Kill *Candida albicans* in an Energy-Dependent and Salt-Sensitive Manner without Causing Membrane Disruption. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1), 154–161. <https://doi.org/10.1128/AAC.00478-06>

- Wilmes, M., Cammue, B. P. A., Sahl, H.-G., & Thevissen, K. (2011). Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation. *Natural Product Reports*, 28(8), 1350. <https://doi.org/10.1039/c1np00022e>
- Wilson, C. L., Ouellette, A. J., Satchell, D. P., Ayabe, T., López-Boado, Y. S., Stratman, J. L., Hultgren, S. J., Matrisian, L. M., & Parks, W. C. (1999). Regulation of Intestinal α -Defensin Activation by the Metalloproteinase Matrilysin in Innate Host Defense. *Science*, 286(5437), 113–117. <https://doi.org/10.1126/science.286.5437.113>
- World Health Organization. (2022). WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action.
- Yount, N. Y., & Yeaman, M. R. (2004). Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(19), 7363–7368. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401567101>
- Yun, J., & Lee, D. G. (2016). Cecropin A-induced apoptosis is regulated by ion balance and glutathione antioxidant system in *Candida albicans*. *IUBMB Life*, 68(8), 652–662. <https://doi.org/10.1002/iub.1527>
- Yun, J., & Lee, D. G. (2017). Role of potassium channels in chlorogenic acid-induced apoptotic volume decrease and cell cycle arrest in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861(3), 585–592. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.12.026>
- Zhang, Z., & Zhu, S. (2009). Drosomycin, an essential component of antifungal defence in *Drosophila*. *Insect Molecular Biology*, 18(5), 549–556. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00907.x>
- Zhao, R., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>