

PADRONIZAÇÃO DE PARÂMETROS PARA ESTUDO DA EFICÁCIA *IN VIVO* DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO D- A<sub>36,42,44</sub>R<sub>37,38</sub>Y<sub>32-46</sub> VuDef BIOINSPIRADO NO  $\gamma$ -CORE DAS DEFENSINAS DE PLANTAS EM MODELO DE INFECÇÃO *Galleria mellonella*-*Candida* spp

**LORENA MENDES DOS SANTOS**

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



II

PADRONIZAÇÃO DE PARÂMETROS PARA ESTUDO DA EFICÁCIA *IN*  
*VIVO* DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO D- A<sub>36,42,44</sub>R<sub>37,38</sub>Y<sub>32-46</sub> VuDef  
BIOINSPIRADO NO  $\gamma$ -CORE DAS DEFENSINAS DE PLANTAS EM  
MODELO DE INFECÇÃO *Galleria*  
*mellonella-Candida spp*

**LORENA MENDES DOS SANTOS**

Dissertação apresentada ao centro de  
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense, como parte  
das exigências para obtenção do título de  
Mestre em Biotecnologia e Biotecnologia.

Orientador: Professor Dr. André de Oliveira  
Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO/2024

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S237

Santos, Lorena Mendes dos.

"Padronização de parâmetros para estudo da eficácia *in vivo* do peptídeo antimicrobiano D-A36,42,44R37,38γ32-46VuDef bioinspirado no  $\gamma$ -core das defensinas de plantas em modelo de infecção *Galleria mellonella-Candida spp*" / Lorena Mendes dos Santos. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

68 f. : il.

Inclui bibliografia.

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

Orientador: André de Oliveira Carvalho.

1. AMPs. 2. *Galleria mellonella*. 3. fúngico. 4. *Candida tropicalis*. 5. infecção. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

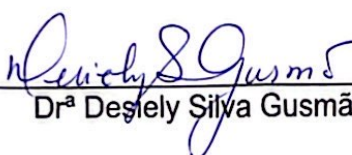
PADRONIZAÇÃO DE PARÂMETROS PARA ESTUDO DA EFICÁCIA *IN VIVO* DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO D- A<sub>36,42,44</sub>R<sub>38,39</sub>Y<sub>32-46</sub>VuDef BIOINSPIRADO NO  $\gamma$ -CORE DAS DEFENSINAS DE PLANTAS EM MODELO DE INFECÇÃO *Galleria mellonella-Candida* spp

**LORENA MENDES DOS SANTOS**

Dissertação apresentada ao centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

APROVADO EM: 26 / 02 / 24

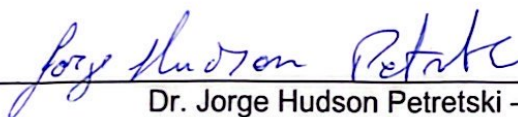
Comissão Examinadora:



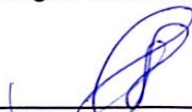
Dr.<sup>a</sup> Desley Silva Gusmão – IFF



Dr. Francisco Jose Alves Lemos – UENF



Dr. Jorge Hudson Petretski – UENF



Dr. André de Oliveira Carvalho (orientador) – UENF

*DEDICO...*

*Aos meus pais Joana e Elias por todo apoio e confiança ao longo dessa caminhada e em cada etapa da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me guiado e amparado nas minhas escolhas. Por me permitir chegar até aqui, me ajudando a enfrentar todas as barreiras e acreditar que eu era capaz de ultrapassá-las.

À meu orientador prof. André de Oliveira Carvalho por todo o suporte, incentivo e ensinamento ao longo do curso.

Aos membros da banca que aceitaram participar da minha defesa. Aos professores e funcionários do PGBB por todo o ensinamento.

À todos os amigos do LFBM, pelas dicas, amizade e por tornarem a minha vida mais leve ao longo do curso.

À minha família por todo o incentivo e força e por estarem sempre presentes apesar da distância.

Ao meu parceiro Manoel pelo apoio e incentivo.

À UENF e ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia pela estrutura e oportunidade de realizar esse curso.

Ao CNPq, Capes e Faperj pelo apoio financeiro.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica e para a realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1. Doenças fúngicas e saúde pública .....	16
1.2. <i>Candida spp.</i> e resistência fúngica .....	18
1.3. Peptídeos antimicrobianos .....	20
1.4. Defensinas de planta .....	20
1.5. Peptídeo sintético D-A <sub>36,42,44</sub> R <sub>37,38</sub> Y <sub>32-46</sub> VuDef .....	23
1.6. <i>Galleria mellonella</i> como um modelo <i>in vivo</i> para a experimentação científica .....	25
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
2.1. Objetivo Geral .....	29
2.2. Objetivos específicos .....	29
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1. Peptídeo sintético .....	30
3.2. Fungo .....	30
3.3. <i>Galleria mellonella</i> .....	30
3.4. Determinação da dose letal de D-RR sobre <i>Candida tropicalis</i> ATCC 750 <i>in vitro</i> .....	31
3.5. Determinação da dose fúngica letal de <i>Candida tropicalis</i> ATCC 750 para larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	32
3.6. Determinação da atividade antimicrobiana de D-RR sobre a dose fúngica letal de <i>Candida tropicalis</i> ATCC 750 para <i>Galleria mellonella in vitro</i> .....	33
3.7. Determinação da carga fúngica da hemolinfa de <i>Galleria mellonella</i> .....	34
3.8. Toxicidade de D-RR <i>in vivo</i> no modelo de <i>Galleria mellonella</i> .....	35
3.9. Teste de determinação da concentração de hemócitos em <i>Galleria mellonella</i> .....	35
3.10. Estudo da eficácia de D-RR <i>in vivo</i> no modelo de infecção fúngica em larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	35



3.11. Microscopia eletrônica de transmissão.....	36
3.12. Análises estatísticas.....	37
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
4.1. Determinação da dose letal de D-RR <i>in vitro</i> sobre <i>Candida tropicalis</i> ATCC 750 .....	38
4.2. Determinação da dose fúngica letal de <i>Candida tropicalis</i> ATCC 750 para larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	39
4.3. Determinação da atividade antimicrobiana de D-RR sobre a dose fúngica letal de <i>Candida tropicalis</i> ATCC 750 para <i>Galleria mellonella in vitro</i> .....	43
4.4. Determinação da carga fúngica na hemolinfa de <i>Galleria mellonella</i> .....	43
4.5. Toxicidade de D-RR <i>in vivo</i> para <i>Galleria mellonella</i> .....	44
4.6. Estudo da eficácia de D-RR <i>in vivo</i> no modelo de infecção fúngica em larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	46
4.7. Microscopia eletrônica de transmissão.....	49
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>

## RESUMO

Patógenos fúngicos emergentes e a resistência fúngica têm aumentado e apresentam um impacto profundo na saúde humana global. Estudos recentes mostram a atividade antimicrobiana de peptídeos isolados de diversas plantas sobre fungos e leveduras, mostrando que estes podem ser alternativas potenciais aos antifúngicos convencionais. O peptídeo sintético D-A<sub>42,44</sub>R<sub>37,38</sub>Y<sub>32-46</sub>VuDef (abreviado D-RR) foi bioinspirado no elemento estrutural  $\gamma$ -core das defensinas de plantas e apresenta forte atividade antimicrobiana sobre leveduras do gênero *Candida*. As larvas da mariposa da cera maior *Galleria mellonella* são um modelo conveniente para a avaliação da eficácia de novos agentes antifúngicos devido às semelhanças estruturais e funcionais da sua resposta imune inata com a de mamíferos. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi padronizar parâmetros para estudar a eficácia do peptídeo antimicrobiano D-RR usando um modelo de infecção fúngica com *Candida tropicalis* ATCC 750 e larvas do inseto *G. mellonella*. Inicialmente, um ensaio antimicrobiano foi feito para determinar a dose letal de D-RR sobre a cepa de *C. tropicalis* ATCC 750 *in vitro*. Em seguida, a dose fúngica letal de *C. tropicalis* ATCC 750 para *G. mellonella* foi determinada através de uma análise da sobrevivência e índice de saúde das larvas avaliando parâmetros visuais como motilidade, formação de casulo e melanização. A carga fúngica na hemolinfa das larvas infectadas também foi determinada como um parâmetro da progressão da infecção. Posteriormente, foi avaliada a atividade antimicrobiana de D-RR sobre essa dose fúngica letal *in vitro*. Com a dose escolhida de D-RR, a toxicidade do peptídeo para as larvas de *G. mellonella* foi avaliada através da sobrevivência, índice de saúde e concentração de hemócitos circulantes na hemolinfa. Com estes parâmetros determinados foi feito um teste de eficácia de D-RR em controlar uma infecção fúngica por um ensaio de sobrevivência larval *in vivo* e microscopia eletrônica de transmissão. A eficácia *in vivo* de D-RR foi confrontada com o fármaco de referência fluconazol. Nossos resultados mostram que a dose letal de D-RR para a cepa de *C. tropicalis* ATCC 750 foi de 32  $\mu$ M. Através da sobrevivência e índice de saúde das larvas, a dose fúngica letal de *C. tropicalis* para *G. mellonella* foi de 10<sup>6</sup> células/larva. Quando testado frente a esta dose fúngica letal de *C. tropicalis* para *G. mellonella*, D-RR apresentou inibição de 62% na menor concentração testada de 32  $\mu$ M. D-RR não foi tóxico para *G. mellonella* e não afetou a concentração de hemócitos totais na hemolinfa das larvas. O teste de eficácia mostrou que D-RR não apresentou

atividade antifúngica significativa na concentração testada, mas podem contribuir para a determinação desta concentração futuramente com o objetivo de empregar este peptídeo sintético como nova alternativa diante aos antifúngicos convencionais.

**Palavras-chave:** Atividade antifúngica. AMPs. *Galleria mellonella*.

## ABSTRACT

Emerging fungal pathogens and fungal resistance have been increasing and have a profound impact on global human health. Recent studies demonstrate the antimicrobial activity of peptides isolated from various plants against fungi and yeasts, showing that these could be potential alternatives to conventional antifungals. The synthetic peptide D-A<sub>42,44</sub>R<sub>37,38</sub>Y<sub>32-46</sub>VuDef (abbreviated as D-RR) was bioinspired by the  $\gamma$ -core structural element of plant defensins and exhibits strong antimicrobial activity against yeasts of the *Candida* genus. Greater wax moth larvae *Galleria mellonella* serve as a convenient model for evaluating the efficacy of new antifungal agents due to the structural and functional similarities of their innate immune response to that of mammals. Therefore, the objective of the study was to standardize parameters to study the efficacy of the antimicrobial peptide D-RR using a fungal infection model with *Candida tropicalis* ATCC 750 and *G. mellonella* insect larvae. Initially, an antimicrobial assay was conducted to determine the lethal dose of D-RR against the *C. tropicalis* ATCC 750 strain *in vitro*. Subsequently, the lethal fungal dose of *C. tropicalis* ATCC 750 for *G. mellonella* was determined through an analysis of larval survival and health index, evaluating visual parameters such as motility, cocoon formation, and melanization. Fungal burden in the hemolymph of infected larvae was also determined as a parameter of infection progression. Later, the antimicrobial activity of D-RR against this lethal fungal dose *in vitro* was evaluated. With the chosen dose of D-RR, the toxicity of the peptide to *G. mellonella* larvae was assessed through survival, health index, and concentration of circulating hemocytes in the hemolymph. With these parameters determined, an efficacy test of D-RR in controlling fungal infection was performed through an *in vivo* larval survival assay and transmission electron microscopy. The *in vivo* efficacy of D-RR was compared with the reference drug fluconazole. Our results show that the lethal dose of D-RR for the *C. tropicalis* ATCC 750 strain was 32  $\mu$ M. Through larval survival and health index, the lethal fungal dose of *C. tropicalis* for *G. mellonella* was  $10^6$  cells/larvae. When tested against this lethal fungal dose of *C. tropicalis* for *G. mellonella*, D-RR showed 62% inhibition at the lowest tested concentration of 32  $\mu$ M. D-RR was not toxic to *G. mellonella* and did not affect the total hemocyte concentration in the larvae hemolymph. The efficacy test showed that D-RR did not exhibit significant antifungal activity at the tested concentration, but it may contribute to determining this concentration in the future with the aim of employing this synthetic

peptide as a new alternative to conventional antifungals.

**Keywords:** Antifungal activity. AMPs. *Galleria mellonella*.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Sistema de pontuação para a determinação do índice de saúde das larvas de *Galleria mellonella*.

**Tabela 2** - Índice médio de saúde de *Galleria mellonella* infectada com diferentes concentrações de *Candida tropicalis* ATCC 750 e inoculada com controle contendo apenas IPS.

**Tabela 3** - Pontuação diária e média do índice de saúde motilidade de *Galleria mellonella*.

**Tabela 4** - Pontuação diária e média do índice de saúde formação de casulo de *Galleria mellonella*.

**Tabela 5** - Pontuação diária e média do índice de saúde melanização de *Galleria mellonella*.

**Tabela 6** - Registro do índice de saúde diário e médio de *Galleria mellonella* durante 6 dias em resposta ao peptídeo sintético D-RR.

**Tabela 7** - Índice de saúde de larvas de *Galleria mellonella* durante os seis dias após a inoculação com a dose fúngica letal de *Candida tropicalis* ATCC 750 e tratadas com D-RR e fluconazol.

**Tabela 8** - Pontuação diária e média do índice de saúde motilidade de *Galleria mellonella* após a inoculação com a dose fúngica letal de *Candida tropicalis* ATCC 750 e tratamento com 32  $\mu$ M de D-RR e fluconazol.

**Tabela 9** - Pontuação diária e média do índice de saúde formação de casulo de *Galleria mellonella* após a inoculação com a dose fúngica letal de *Candida tropicalis* ATCC 750 e tratamento com 32  $\mu$ M de D-RR e fluconazol.

**Tabela 10** - Pontuação diária e média do índice de saúde melanização de *Galleria mellonella* após a inoculação com a dose fúngica letal de *Candida tropicalis* ATCC 750 e tratamento com 32  $\mu$ M de D-RR e fluconazol.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Representação esquemática de uma defensina de planta (NaD1 de *Nicotiana alata*).

**Figura 2** – Representação estrutural das *cis*-defensinas e *trans* defensinas.

**Figura 3** - Representação esquemática da estrutura tridimensional da defensina *Vu-Def1* indicando as alterações feitas em resíduos de aminoácidos para a criação dos peptídeos sintéticos nomeados DD, RR e D-RR.

**Figura 4** – Crescimento de diferentes espécies de leveduras na ausência (controle) e presença de D-RR na concentração de 18,5 µM.

**Figura 5** – Ilustração do ciclo de vida de *Galleria mellonella*.

**Figura 6** – Imagens de placas de Petri mostrando as unidades formadoras de colônia (UFC) de *Candida tropicalis* ATCC 750 após 24 h de incubação a 30 °C na ausência (controle) e presença de diferentes concentrações de D-RR. **Figura 7** – Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de *Galleria mellonella* infectada com diferentes suspensões da levedura *Candida tropicalis* ATCC 750 durante 6 dias.

**Figura 8** – Atividade antimicrobiana de D-RR sobre a dose fúngica letal de *Candida tropicalis* ATCC 750 para *Galleria mellonella in vitro*.

**Figura 9** – Unidades formadoras de colônia (UFC) da hemolinfa de *Galleria mellonella* infectada com a dose fúngica letal de *Candida tropicalis* ATCC 750 e inoculadas com IPS após 4, 24 e 48 h de inoculação.

**Figura 10** – Concentração de hemócitos da hemolinfa de *Galleria mellonella* após inoculação com D-RR, IPS e dose fúngica letal de *Candida tropicalis* ATCC 750 após 4, 24 e 48 h de inoculação.

**Figura 11** – Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de *Galleria mellonella* infectada com a dose letal *Candida tropicalis* ATCC 750 frente aos tratamentos com D-RR e fluconazol nas concentrações de 32 µM.

**Figura 12** – Imagens microscópicas do corte de *Galleria mellonella* infectada com *Candida tropicalis* ATCC 750 sem tratamento e tratada com 32 µM de D- RR.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AMPs - Peptídeos antimicrobianos (do inglês *antimicrobial peptides*)

ATCC - Do inglês *American Type Culture Collection*

CNA – *Candida não-albicans*

D - Conformação dextrogira (D-enantiômeros)

DD - Peptídeo sintético A<sub>36,42,44</sub>Y<sub>32-46</sub> VuDef

D-RR - Peptídeo sintético D-A<sub>36,42,44</sub>R<sub>37,38</sub>Y<sub>32-46</sub> VuDef

DL100 - Dose letal responsável por causar a perda da viabilidade de todas as células da levedura presentes no ensaio antimicrobiano

EDTA - Ácidoetilenodiamino tetra-acético (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*)

IPS - Solução salina fisiológica para insetos (do inglês *insect physiological saline*)

LFBM - Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos

LTP - Proteínas transportadoras de lipídeos (do Inglês *lipid transfer proteins*)

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Salina tamponada com fosfato (do inglês *phosphate-buffered saline*)

RR - Peptídeo sintético A<sub>36,42,44</sub>R<sub>37,38</sub>Y<sub>32-46</sub> VuDef

SAPS - Aspartil proteinases secretadas (do inglês *secreted aspartic proteinases*)

UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

UFC - Unidades formadora de colônia



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Doenças fúngicas e saúde pública

Os fungos desempenham um papel crucial nos ecossistemas. Além de serem componentes-chave para os ciclos biogeoquímicos, apresentam grande importância nas indústrias alimentícia, de bebidas, farmacêutica e na agricultura devido aos fungos micorrízicos (HAWKINS *et al.*, 2023). Embora grande parte dos fungos não apresente características patogênicas, um número limitado de espécies fúngicas sempre esteve relacionado a problemas para a humanidade. Em plantas, eles são responsáveis por causar graves danos na produção agrícola, seja durante a colheita, manuseio, armazenamento, embalagem ou transporte, ocasionando uma destruição de cerca de 10 a 30% da produção. Em alguns países, essa perda pode chegar a 50%, resultando na perda de cerca de 1 bilhão de toneladas de alimentos e produtos alimentícios a cada ano (BARNEJEE *et al.*, 2021). Outro problema é a produção de micotoxinas, compostos produzidos por fungos capazes de causar doenças em humanos e animais, podendo também contaminar colheitas e prejudicar o consumo e a venda do material vegetal contaminado. Esses problemas podem colocar em risco a segurança alimentar e a economia global (PRIYASHANTHA *et al.*, 2023).

As alterações climáticas também estão provocando grandes mudanças na epidemiologia das infecções fúngicas. O organismo humano se defende contra infecções por meio de um sistema imunológico inato e adaptativo, além das chamadas defesas físicas (ROBERT & CASADEVALL, 2009). Embora as defesas físicas mais reconhecidas pela medicina, como a pele, desempenhem um papel crucial na proteção contra infecções, o papel da temperatura nem sempre é igualmente reconhecido. A endotermia presente nos mamíferos mantém uma temperatura corporal elevada ao longo da vida, criando uma zona térmica inibitória. Embora micróbios adquiridos de outros humanos ou mamíferos possuam adaptação térmica e não sejam restringidos por ela, patógenos fúngicos de plantas, insetos e presentes no meio ambiente estão adaptados a temperaturas mais frias, sendo inibidos em cerca de 95% pela endotermia (BLEHERT *et al.*, 2009). O papel das alterações climáticas no surgimento de cepas fúngicas patogênicas torna-se cada vez mais evidente, uma vez que o aumento da temperatura global favorece o surgimento de espécies fúngicas patogênicas até então desconhecidas. À medida

que essas espécies se adaptam a temperaturas elevadas e estabelecem termotolerância, podem superar nossa barreira endotérmica (CASADEVALL, A., 2020).

Além da identificação de espécies fúngicas completamente novas como a *Candida auris*, uma levedura problemática em ambientes de saúde e notavelmente resistente aos antifúngicos disponíveis, as mudanças climáticas podem favorecer o aumento da distribuição geográfica dessas espécies fúngicas. Isso propicia a ocorrência de doenças em áreas onde ainda não havia sido relatadas anteriormente. Um exemplo disso são os surtos causados por um fungo quitrídio ambiental, conhecido como *Batrachochytrium dendrobatidis*, considerado um patógeno emergente de anfíbios que se espalhou por todos os continentes onde anfíbios são encontrados, responsável por uma perda drástica na diversidade, dizimando populações de anfíbios em todo o mundo (NNADI & CARTER, 2021).

Na agricultura, novas linhagens de fungos virulentos com prováveis adaptações em resposta às mudanças climáticas também são encontradas. Exemplos incluem *Puccinia striiformis* e membros da espécie *Fusarium graminearum*, que causam doenças devastadoras nas plantações de trigo, resultando em significativa redução na produção, qualidade e segurança alimentar. Essas espécies, conhecidas por estarem associadas às regiões mais frias, começam a invadir áreas mais quentes em resposta à adaptação ao aumento da temperatura global (DE VALLAVIEILLE *et al.*, 2018; MAGAN, MEDINA & ALDRED, 2011).

Em humanos, as infecções fúngicas matam mais de 3,75 milhões e afetam mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo todos os anos, tornando-as uma das principais causas de morte a nível mundial por doenças infecciosas, à frente da tuberculose e da malária. No entanto, ainda são um tema negligenciado pelas autoridades de saúde pública. As infecções fúngicas invasivas e potencialmente fatais afetam cerca de 6,55 milhões de pessoas anualmente e possuem uma alta taxa de mortalidade, chegando a 50%. Estima-se que mais de um quarto da população mundial sofra de infecções fúngicas de pele, e cerca de 75% das mulheres sofram de candidíase vulvovaginal pelo menos uma vez na vida (BANERJEE, DENNING & CHAKRABARTI, 2021; DAVID *et al.*, 2018; DENNING, D. 2024; FRIEDMAN & SCHWARTZ, 2019).

De acordo com o exposto, doenças fúngicas em plantas, animais e humanos têm causado efeitos de morte e extinção, tornando-se grandes ameaças à vida no

planeta. É reconhecido que patógenos fúngicos clinicamente relevantes, como as espécies de *Candida* (tradicionalmente considerados comensais humanos), podem ser encontrados no ambiente, e as pressões ambientais afetam cada vez mais a evolução de novas características, incluindo virulência e resistência a substâncias antifúngicas (GARCIA-BUSTOS *et al.*, 2023).

## 1.2. *Candida spp.* e resistência fúngica

As leveduras do gênero *Candida* são patógenos oportunistas que habitam a microbiota humana como comensais, tendo sua proliferação controlada pelo sistema imunológico do hospedeiro. Portanto, em condições de supressão imunológica, são capazes de causar uma série de infecções (DAVID *et al.*, 2018). São consideradas as espécies de maior importância clínica, e se destacam por sua capacidade de causar desde infecções superficiais (como a candidíase oral e vaginal) a infecções sistêmicas potencialmente graves, com altas taxas de mortalidade. *Candida albicans* tem sido a espécie mais prevalente associada às infecções invasivas e mucocutâneas, seguida pela *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (BARANTSEVICH & BARANTSEVICH, 2022; D'ENFERT *et al.*, 2021).

Nos casos mais graves, como a candidíase invasiva, o grupo populacional mais vulnerável inclui os pacientes imunossuprimidos, com internação prolongada em unidade de terapia intensiva, com cateter venoso central, pacientes que receberam antibióticos de amplo espectro e recém-nascidos prematuros. Estima-se cerca de 700.000 casos de candidíase invasiva a cada ano (MCCARTY, WHITE & PAPPAS, 2021; NNADI & CARTER, 2021). Indivíduos portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida causada pelo vírus da imunodeficiência humana em estado avançado também contribuem drasticamente para o número excessivo de mortes devido a essas doenças (RODRIGUES & NOSANCHUK, 2020).

Vale ressaltar que as infecções fúngicas humanas apresentam distinções significativas em relação às infecções bacterianas. Uma dessas diferenças decorre das semelhanças dos fungos com as células hospedeiras, ambos organismos eucarióticos. Essa semelhança dificulta a prospecção de novos antifúngicos devido ao alto risco de toxicidade. Segundo dados, aproximadamente nove vezes mais compostos antifúngicos estão disponíveis para controlar doenças nas culturas

vegetais do que para tratar infecções sistêmicas em humanos (FISHER *et al.*, 2018). Além disso, o tropismo fúngico é altamente variável, possibilitando que um único patógeno seja capaz de infectar diferentes tipos celulares e múltiplos tecidos de um mesmo hospedeiro (RODRIGUES & NOSANCHUK, 2020).

Somado a esses fatores, o impacto global causado por esses patógenos fúngicos oportunistas é agravado pela existência de apenas quatro classes de substâncias terapêuticas para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas: os azóis, que têm como alvo a biossíntese do ergosterol; as equinocandinas, que inibem a biossíntese da parede celular dos fungos; os antimetabólicos, que agem inibindo a síntese de RNA; e os polienos, que se ligam ao ergosterol na membrana celular dos fungos, levando à lise (JACOBS, ZAGALIOTIS & WALSH, 2022; WIEDERHOLD, 2021). Apesar da grande necessidade de novas drogas antifúngicas, nenhuma nova classe se tornou disponível nas últimas duas décadas. A flucitosina foi utilizada pela primeira vez na década de 1960, os azóis em 1956, equinocandinas em 1988, e a anfotericina B, considerada droga de referência na prática clínica, foi descoberta em 1958. Mesmo após melhoria em seu perfil de segurança com a anfotericina B lipossomal, ainda possui sérios efeitos colaterais (SILVA, RUIZ- CAMPS & AGUADO, 2021).

Ainda que os antifúngicos sistêmicos e fungicidas sejam frequentemente utilizados como a primeira linha de defesa no controle dessas infecções, sua eficácia é temporária devido ao rápido desenvolvimento de resistência. Em humanos, por exemplo, a administração profilática de tratamentos em pacientes de alto risco pode acelerar significativamente o surgimento de resistência fúngica. Isso ainda é ameaçado pelo desenvolvimento de cepas fúngicas multirresistentes aos tratamentos disponíveis, como *Candida auris*, que se tornou uma ameaça à saúde pública, segundo os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (VILA *et al.*, 2020).

Diante deste cenário, a pesquisa para a identificação de estruturas-alvo para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos é de grande importância, e os peptídeos antimicrobianos vêm ganhando destaque, chamando cada vez mais a atenção dos pesquisadores de todo o mundo por seu grande potencial e atividade inibitória. Eles são potenciais candidatos a fármacos para o tratamento de infecções causadas por microrganismos não tratáveis, incluindo os fungos (BUDA DE CESARE *et al.*, 2020).

### 1.3. Peptídeos antimicrobianos

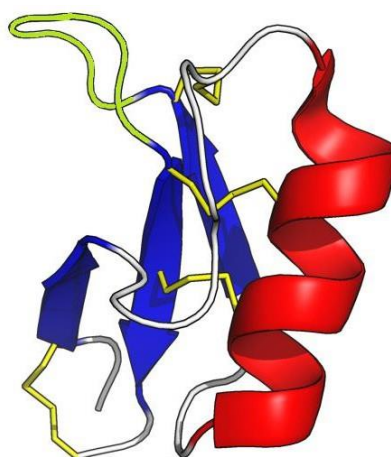
Os peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) constituem uma classe de moléculas amplamente encontradas na natureza e fazem parte do sistema imunológico inato. Eles representam a primeira linha de defesa para a proteção contra microrganismos em metazoários, desempenhando um papel crítico na redução da carga microbiana no início da infecção e conectam a imunidade inata ao sistema imunológico adaptativo. Em procariotos, esses peptídeos são produzidos como uma estratégia de evitar competição (LIMA *et al.*, 2021). Eles podem ser extraídos de bactérias, fungos, insetos, plantas, anfíbios, peixes, pássaros e mamíferos (BOPARAI & SHARMA, 2020). Em sua grande maioria, são moléculas curtas com menos de 100 resíduos de aminoácidos, catiônicas e anfífilas, características que permitem fortes interações com as membranas hidrofóbicas e conferem sua atividade antimicrobiana de amplo espectro. Além disso, apresentam baixa toxicidade para células de mamíferos, forte estabilidade térmica, alta solubilidade e baixa massa molecular (LUO & SONG, 2021). Possuem uma estrutura altamente variável, podendo adotar cinco arquiteturas diferentes, incluindo:  $\alpha$ -hélices, folhas- $\beta$ , gancho ou *loop*  $\beta$ , estrutura linear ou estendida, e configuração cíclica (ciclotídeos). Além disso, alguns AMPs podem apresentar resíduos de cisteínas (4, 6 ou 8) que se conectam em pares formando pontes dissulfeto, responsáveis por conferir alta estabilidade em condições extremas, como relatado acima (LI *et al.*, 2022).

Com base em seu mecanismo de ação, os AMPs podem ser classificados como AMPs de ação de membrana e AMPs sem ação de membrana. Os primeiros abrangem os peptídeos catiônicos capazes de romper a membrana e causar lise, enquanto os que não possuem a ação direta de ruptura são capazes de se translocar através da membrana sem danificá-la e interferem nas atividades celulares essenciais (HAFEEZ *et al.*, 2021). A busca intensiva por moléculas com propriedades terapêuticas têm levado à caracterização de diversos peptídeos provenientes de inúmeras fontes, como fungos, bactérias, répteis, mamíferos e plantas (LI *et al.*, 2022).

### 1.4 Defensinas de planta

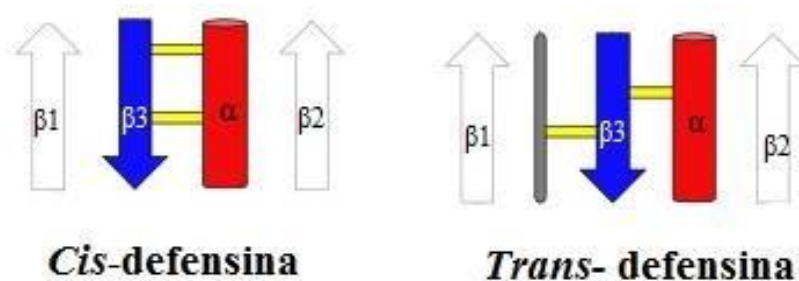
Os AMPs são encontrados em todos os reinos da vida, sendo especialmente abundantes nas plantas. Por serem organismos sésseis, as plantas produzem diversas substâncias para atender funções celulares, sinalizar resposta ao estresse e atuar como um sistema de defesa contra patógenos, insetos e herbívoros (ISAH, 2019). Segundo Kenny & Marmion (2019), os AMPs de plantas podem ser isolados de raízes, caules, flores, folhas e sementes de diversas espécies. Entre as suas principais famílias, destacam-se as  $\alpha/\beta$ -tioninas, heveínas, knotinas, proteínas transportadoras de lipídeos (LTP, do inglês *lipid transfer proteins*), ciclotídeos, snakinas,  $\alpha$ -harpininas e as defensinas (PARISI *et al.*, 2019).

De acordo com Kovaleva *et al.* (2020), as defensinas de plantas receberam este nome devido à semelhança estrutural e funcional às defensinas de insetos e mamíferos. Elas podem ser identificadas em diversos tecidos e órgãos de plantas e possuem uma conformação tridimensional altamente conservada, composta por uma  $\alpha$ -hélice e três fitas  $\beta$  em posição antiparalela estabilizada, em geral, por quatro pontes dissulfeto. Possuem cerca de 45 a 54 resíduos de aminoácidos e uma região denominada  $\gamma$ -core, localizada na região C-terminal das defensinas com uma estrutura em gancho  $\beta$  que detém a atividade biológica da molécula (Fig. 1) (FERNÁNDEZ *et al.*, 2021).



**Figura 1**— Representação esquemática de uma defensina de planta (NaD1 de *Nicotiana glauca*). São mostrados em vermelho a  $\alpha$ -hélice, em azul as três fitas  $\beta$  antiparalelas, estabilizadas pelas pontes dissulfeto mostradas em amarelo. A região do  $\gamma$ -core é indicada pela cor verde (Adaptado de SHAFEE *et al.*, 2017).

Com base na organização das duas pontes dissulfeto localizadas entre a  $\alpha$ -hélice e a fita  $\beta_3$ , as defensinas de plantas são classificadas como pertencentes à família das *cis*-defensinas. Essa família também engloba as defensinas de fungos, bactérias e invertebrados, e é caracterizada pela presença das duas pontes dissulfeto na mesma direção (Fig. 2). Já as *trans*-defensinas apresentam essas pontes localizadas opostamente à fita  $\beta$ , conectando-se a diferentes elementos da estrutura secundária. Essa família inclui as defensinas de vertebrados (Fig. 2). A partir da semelhança entre as famílias de defensinas, acredita-se que as *cis* e *trans* defensinas possam ter originado de um ancestral comum (QI, GAO & ZHU, 2022).



**Figura 2** — Representação estrutural das *cis*-defensinas e *trans*-defensinas indicando que as pontes dissulfeto (amarelo) apontam para o mesmo sentido nas *cis*-defensinas, e sentidos opostos nas *trans*-defensinas. ( $\alpha$ ) -  $\alpha$ -hélice; ( $\beta_1$ ) folha  $\beta_1$ ; ( $\beta_2$ ) folha  $\beta_2$ ; ( $\beta_3$ ) folha  $\beta_1$  (Adaptado de PARISI *et al.*, 2019).

Embora as defensinas de plantas demonstrem um amplo espectro de atividade ao proteger as plantas contra diversos ataques bacterianos e virais, sua função mais predominante é a antifúngica. Essa predominância se deve à frequente exposição das plantas a patógenos fúngicos (SHER KHAN *et al.*, 2019). Um dos mecanismos de ação dessas defensinas sobre os patógenos envolve a ruptura das membranas, sendo este o mecanismo mais extensivamente estudado até o momento. Acredita-se que este processo envolva dois eventos interconectados: a ligação da defensina aos fosfolípidos da membrana, impulsionada por forte atração eletrostática, e a oligomerização subsequente da defensina, resultando na formação de múltiplos poros na membrana celular. Outra hipótese sobre esse mecanismo sugere que as defensinas podem induzir um aumento na permeabilidade iônica,

permitindo maior acesso ao ambiente intracelular. Adicionalmente, podem acelerar a produção de espécies reativas de oxigênio no patógeno, desencadeando assim a ativação da morte celular programada (PARISI *et al.*, 2019).

Devido à sua ampla atividade inibitória sobre microrganismos, as defensinas de plantas apresentam potencial biotecnológico e são cogitadas como uma nova fonte a ser explorada para a descoberta de medicamentos. A combinação química e modificações direcionadas nos resíduos de aminoácidos, considerando as funções e a estrutura dos AMPs de ocorrência natural, podem aumentar sua bioatividade, oferecendo oportunidades promissoras para o desenvolvimento de novos peptídeos sintéticos que podem ser utilizados para o tratamento de infecções (BAKARE *et al.*, 2022).

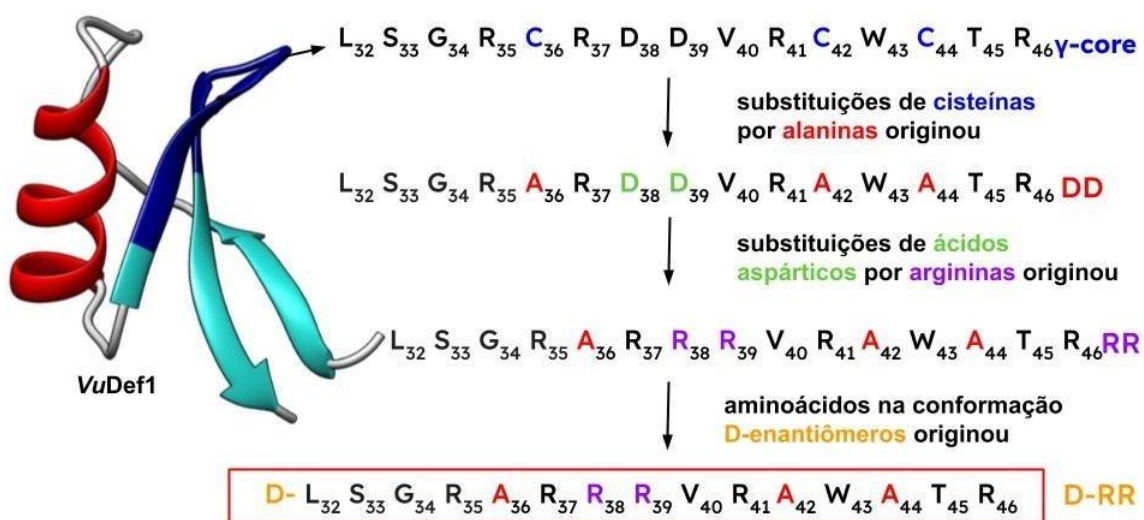
### 1.5 Peptídeo sintético D-A<sub>36,42,44</sub>R<sub>37,38</sub>Y<sub>32-46</sub>VuDef

Nosso grupo estuda AMPs isolados da semente de *Vigna unguiculata* L. Walp. (feijão-de-corda), onde uma defensina e uma proteína transportadora de lipídeos, ambas com atividade biológica *in vitro* contra fungos fitopatogênicos e uma levedura, foram isoladas (CARVALHO *et al.*, 2001). Esta defensina foi então clonada, caracterizada e recebeu o nome de VuDef1 (*Vigna unguiculata defensin one*). A partir desses estudos, o primeiro peptídeo sintético foi desenhado a partir do  $\gamma$ -core da defensina VuDef1, denominado A<sub>36,42,44</sub>Y<sub>32-46</sub>Vu-Def. Neste peptídeo, A<sub>36,42,44</sub> indica os resíduos de cisteína da sequência original nas posições indicadas que foram substituídos por alanina para evitar a formação de pontes dissulfeto, Y<sub>32-46</sub> indica a posição dos aminoácidos que compõem o  $\gamma$ -core da VuDef1, como mostra a figura 3. O peptídeo foi abreviado de DD devido à presença de dois ácidos aspárticos nas posições 38 e 39. Ele apresentou atividade antimicrobiana sobre promastigotas de *Leishmania amazonenses*, um patógeno humano de relevância médica (SOUZA *et al.*, 2019). No entanto, quando testado frente a leveduras de importância clínica, não se mostrou eficaz (TOLEDO *et al.*, 2021).

Perante o exposto, a partir da estrutura primária original de DD, foram feitas substituições direcionadas em resíduos de aminoácidos específicos, baseadas em um estudo que correlacionou o  $\gamma$ -core das defensinas de plantas à atividade inibitória sobre fungos com a carga e hidrofobicidade. Os ácidos aspárticos nas posições 38 e 39 foram trocados por argininas, formando A<sub>36,42,44</sub>R<sub>37,38</sub>Y<sub>32-46</sub>VuDef

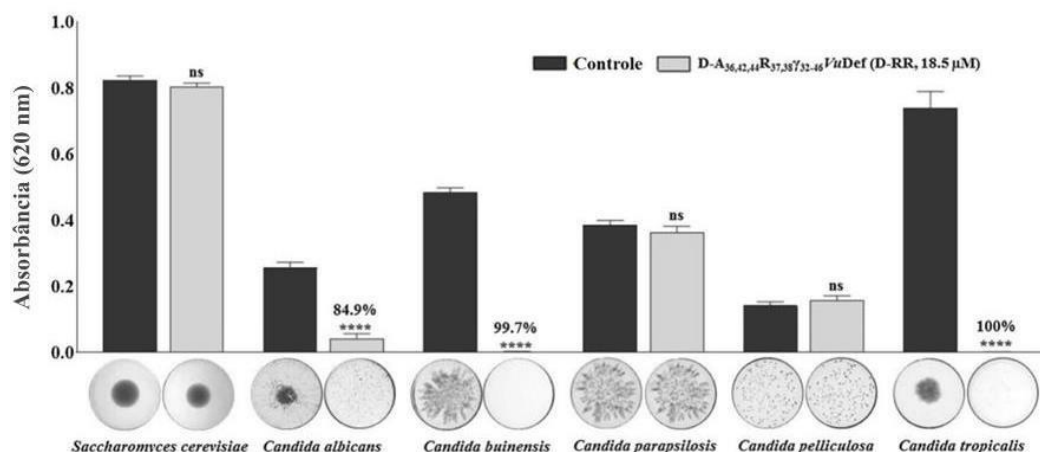


(abreviado de RR), e sua carga passou de +2 para +6, e sua hidrofobicidade foi de +21,98 para +18,32 Kcal/mol. Derivou-se da estrutura primária de RR o peptídeo denominado  $D\text{-}A_{36,42,44}R_{37,38}Y_{32-46}VuDef$  (abreviado de D-RR), no qual todos os aminoácidos usados na síntese química foram os mesmos do RR, porém na sua forma dextrogira (D-enantiômeros) (TOLEDO *et al.*, 2021) (Fig. 3).



**Figura 3** — Representação esquemática da estrutura tridimensional da defensina *VuDef1* com as três fitas  $\beta$  antiparalelas mostradas em verde, a  $\alpha$ -hélice em vermelho, elementos não estruturados em cinza e a região do  $\gamma$ -core em azul. A estrutura primária do  $\gamma$ -core, entre os aminoácidos 32 e 46 é mostrado acima. A partir do  $\gamma$ -core da *Vu-Defr* são mostradas as etapas do desenho dos peptídeos sintéticos. Pelas substituições das cisteínas por alaninas gerou o peptídeo  $A_{36,42,44}Y_{32-46}VuDef$ , abreviado DD devido aos dois ácidos aspárticos na posição 38 e 39. Pela substituição dos dois aspárticos gerou o peptídeo  $A_{36,42,44}R_{37,38}Y_{32-46}VuDef$ , nomeado RR devido à presença de duas argininas na posição 38 e 39. E tendo a mesma composição do RR sendo os aminoácidos na conformação D-enantiômeros gerou o peptídeo  $D\text{-}A_{36,42,44}R_{37,38}Y_{32-46}VuDef$ , abreviado D-RR (Adaptado de SOUZA *et al.*, 2019).

Em um estudo anterior, D-RR apresentou forte atividade antimicrobiana sobre leveduras do gênero *Candida*. Por meio da medição da densidade óptica de culturas celulares, constatou-se que D-RR inibiu 84,9, 99,7 e 100% do crescimento de *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. tropicalis*, respectivamente (Fig. 4).



**Figura 4** — Crescimento de diferentes espécies de leveduras na ausência (controle) e presença de D-RR na concentração de 18,5 µM. ns = Não significativo em relação ao controle. \*\*\*\* = significância estatística em relação ao controle (Adaptado de TOLEDO *et al.*, 2021).

No mesmo estudo, a toxicidade do novo peptídeo D-RR foi testada em duas linhagens de células de mamíferos, demonstrando baixa atividade sobre macrófagos murinos e monócitos humanos (TOLEDO *et al.*, 2021). Adicionalmente, parte do mecanismo de ação de D-RR já foi desvendado, indicando que a exposição de *C. tropicalis* a ele promoveu uma morte celular regulada independente de metacaspase (LUCAS *et al.*, 2023).

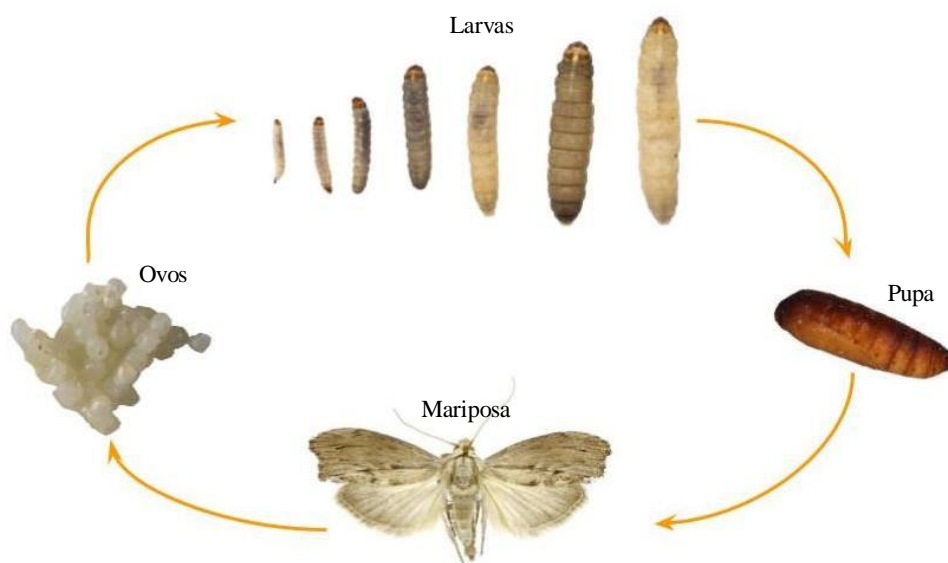
A forte atividade de D-RR sobre leveduras oportunistas de interesse médico e a baixa toxicidade para células de mamíferos indicam que o peptídeo bioinspirado D-RR tem potencial para ser aplicado como uma substância terapêutica. Por este motivo, avançamos com os testes para verificar a eficácia de D-RR em controlar uma infecção fúngica *in vivo*, utilizando o modelo invertebrado de *Galleria mellonella*.

### 1.6. *Galleria mellonella* como um modelo *in vivo* para a experimentação científica

Existem semelhanças estruturais e funcionais entre a resposta imune inata de insetos e mamíferos, conforme especificado abaixo. Devido a isso, muitos insetos vêm sendo utilizados como modelo *in vivo* para o estudo da patogênese/virulência microbiana e avaliação da toxicidade/eficácia de drogas e agentes antimicrobianos novos e convencionais (DURIEUX *et al.*, 2021; JEMEL *et al.*, 2020). As larvas da mariposa da cera *Galleria mellonella* são um modelo conveniente ao modelo murino

para a avaliação da eficácia de novos agentes antifúngicos, devido às muitas vantagens, como baixo custo de manutenção, alta taxa de reprodutividade, fácil manipulação e ausência de restrições éticas (FIRACATIVE *et al.*, 2020).

*G. mellonella* é um inseto holometabólico, ou seja, passa por quatro estágios de desenvolvimento dentro de seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e adulto (Fig. 5). A duração de um ciclo de vida completo varia de seis a oito semanas, e pode ser influenciado por fatores abióticos como dieta, umidade e temperatura. De acordo com seu desenvolvimento, as larvas podem medir de 1 a 23 mm e passam por sete estágios até chegar à fase de pupa. Elas apresentam um corpo dividido em cabeça, tórax segmentado com seis pernas, abdômen com oito pró-patas e duas pró-patas anais. As larvas do último estágio larval produzem seda através de suas glândulas salivares para a formação do casulo; neste momento, param de comer e se tornam menos móveis para entrar na fase de pupa (SERRANO *et al.*, 2023).



**Figura 5** — Ilustração do ciclo de vida de *Galleria mellonella* indicando os quatro estágios de desenvolvimento: ovo, sete estágios de desenvolvimento larval, pupa e mariposa (Criado com Canva).

Seu sistema imune compreende a resposta imune celular e humoral. A falta de imunidade adaptativa é mais uma das vantagens de se trabalhar com o modelo, uma vez que permite o estudo preciso das interações hospedeiro/patógeno sem a interferência das respostas adaptativas. É composto por linfonodos, corpo gorduroso

e hemócitos, que são células de defesa presentes em seu sistema circulatório aberto, denominado hemolinfa, e que ocupam a cavidade geral do corpo, denominada hemocele. Os hemócitos também podem ser encontrados nos órgãos internos e na superfície do coração do inseto. Entre as suas funções estão o armazenamento de substâncias e a defesa do organismo via fagocitose, encapsulamento, melanização, nodulação e coagulação (SERRANO *et al.*, 2023; SINGKUM *et al.*, 2018; TSAI *et al.*, 2016).

Seis classes de hemócitos já foram descritos, incluindo pró-hemócitos, plasmócitos, células granulares, coagulócitos, esferulócitos e enocitóides. Os pró-hemócitos possuem a capacidade de se diferenciar nas outras células, os plasmócitos representam o tipo celular mais comum presente na hemolinfa. As células granulares ou granulócitos possuem grânulos no seu citoplasma, sendo de fácil diferenciação. Os esferulócitos podem apresentar diversas formas, e todos estas células possuem a função de transportar componentes cuticulares. A principal função dos coagulócitos é a coagulação da hemolinfa, enquanto os enocitóides contêm fenoloxidasas e participam da etapa de melanização. Também podem secretar ácidos nucleicos que servem de alarme na defesa dos insetos (SERRANO *et al.*, 2023; TREVIJANO & ZARAGOZA, 2018).

Em relação a sua resposta imune humoral, vários componentes já foram descritos, como a secreção de cerca de vinte AMPs já identificados e liberados na hemolinfa (SERRANO *et al.*, 2023), enzimas líticas (lisozima) e opsoninas responsáveis por danificar células bacterianas e fúngicas e causar hidrólise da parede celular de patógenos através de reconhecimento da parede celular e desencadear apoptose (SOWA-JASILEK *et al.*, 2014) e por fim, a produção de melanina sintetizada após o contato com partículas estranhas, produzindo o acúmulo de nódulos que detêm a replicação de patógenos (TREVIJANO & ZARAGOZA, 2018).

Devido à presença dessas características conservadas, *G. mellonella* vem sendo amplamente utilizada para determinar a toxicidade e a eficácia *in vivo* de novos agentes antifúngicos e resultados mostram forte correlação com resultados obtidos em mamíferos. Além disso, a atividade de agentes antifúngicos pode ser rapidamente estabelecida, ajudando também a determinar dosagens ideais dos mesmos antes do uso em mamíferos. Seu uso também pode ser estendido para estudar o aspecto das infecções e monitorar os efeitos do agente antimicrobiano em

cada etapa da infecção (KAVANAGH & SHEEHAN, 2018).

Neste trabalho, larvas de *G. mellonella* foram utilizadas para estudar a atividade antifúngica *in vivo* do peptídeo sintético D-RR, que em estudos anteriores se mostrou promissor *in vitro* contra espécies de *Candida*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi padronizar parâmetros para estudar a eficácia antifúngica do peptídeo antimicrobiano bioinspirado D-A<sub>36,42,44</sub>R<sub>37,38</sub>Y<sub>32-46</sub>VuDef (abreviado D-RR) sobre *Candida tropicalis* ATCC 750 *in vitro* e *in vivo* usando um modelo de infecção fúngica em larvas do inseto *Galleria mellonella*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar a dose letal de D-RR *in vitro* sobre a nova cepa de *C. tropicalis* ATCC 750;
- Determinar a concentração letal de *C. tropicalis* ATCC 750 para as larvas de *G. mellonella*;
- Determinar a atividade antimicrobiana de D-RR *in vitro* sobre a concentração letal de *C. tropicalis* ATCC 750 para *G. mellonella*;
- Determinar a carga fúngica na hemolinfa de *G. mellonella* infectada com a concentração letal de *C. tropicalis* ATCC 750;
- Testar a toxicidade de D-RR *in vivo* no modelo invertebrado *G. mellonella*;
- Medir a concentração de hemócitos de *G. mellonella* em resposta a inoculação com D-RR;
- Estudar a eficácia *in vivo* de D-RR no modelo de infecção *G. mellonella*-*C. tropicalis* ATCC 750;
- Confrontar os resultados encontrados *in vivo* para o peptídeo com o fármaco utilizado na prática clínica fluconazol;
- Avaliar com mais detalhes, através de microscopia eletrônica de transmissão, a interação de D-RR e *C. tropicalis* ATCC 750 *in vivo* no modelo de *G. mellonella*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Peptídeo sintético

O peptídeo bioinspirado D-A<sub>36,42,44</sub>R<sub>37,38</sub>V<sub>32-46</sub>VuDef (abreviado D-RR) sintetizado pela empresa AminoTech© foi dissolvido em água pura esterilizada a 2 µg/µL (aproximadamente 1 M) e armazenado em alíquotas a — 70 °C. Sua pureza foi assegurada como maior ou igual a 95% através de cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa e análises de espectrometria de massas (TOLEDO *et al.*, 2021).

#### 3.2. Fungo

A levedura *Candida tropicalis* ATCC 750 constitui-se de um isolado clínico de paciente com broncomicose que faz parte da micoteca e foi cedido pelo Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). A levedura foi cultivada em meio *Sabouraud* (10 g/L peptona de carne, 5 g/L peptona de caseína, 20 g/L D(+) glicose e 17 g/L ágar) (Merck Milipore Brasil) a 30 °C por 24 h e, após crescimento, mantida a 4 °C com transferência para um novo meio trimestralmente.

#### 3.3. *Galleria mellonella*

O inseto *Galleria mellonella* foi originalmente obtido da cultura mantida no LFBM. Para seu cultivo, foram utilizados recipientes plásticos com tampas modificadas com pequenos orifícios para permitir a ventilação, e uma ração para fornecer uma dieta artificial composta por 250 g de fubá, 250 g de mel, 210 g de glicerol, 210 g de cera de abelha, 150 g de levedo de cerveja, 100 g de farinha de soja e 100 g de leite em pó desnatado. Após a obtenção dos ovos, eles foram dispostos sob a ração fresca e armazenados a 27 °C na ausência de luz (Incubadora TE-371/240L, Tecnal Equipamentos Científicos Brasil). Foi realizado um acompanhamento semanal para verificar o crescimento das larvas, e quando necessário, uma limpeza retirando a seda, casulos e troca de ração envelhecida, até que as larvas atingissem o estágio final da fase larval, durando em média 34 a

48 dias, onde pesavam aproximadamente 0,250 a 0,320 g e mediam entre 2 e 3 centímetros.

Após esse estágio, 10 pupas foram colocadas em novos potes plásticos em condições semelhantes às já descritas. Para facilitar a postura dos ovos, pequenos pedaços de papel kraft eram colocados nos recipientes e na tampa dos potes, sendo retirados após 1-3 semanas, tempo para as mariposas botarem seus ovos, envelhecerem e morrerem. Os ovos presentes no papel foram adicionados à nova ração para dar início a um novo ciclo.

#### **3.4. Determinação da dose letal de D-RR sobre *Candida tropicalis* ATCC 750 *in vitro***

Este ensaio foi baseado na dose letal (DL100) de D-RR sobre a cepa de *Candida tropicalis* (CE017) (TOLEDO *et al.*, 2021). A levedura foi cultivada em ágar *Sabouraud* a 30 °C por 24 h. Após o período de crescimento, uma colônia foi ressuspensa em caldo *Sabouraud* (5 g/L de peptona de carne, 5 g/L de peptona de caseína, 20 g/LD(+)glicose) (Merck Milipore Brasil) para a realização da contagem de células em câmara de Neubauer (LaborOptik, United Kingdom) e posterior cálculo da densidade celular em células/mL no microscópio óptico Axio Imager.A2 (Zeiss).

O ensaio foi conduzido em uma placa de poliestireno de 96 poços (Nunc, Thermo Scientific Brasil) com fundo em U, composta por 2.000 células/mL, diferentes concentrações do peptídeo (23, 27,5 e 32 µM) e caldo *Sabouraud* para atingir um volume final de 100 µL. O grupo controle consistiu apenas de 2.000 células/mL e caldo *Sabouraud*, totalizando 100 µL. A placa foi incubada a 30 °C por 3 h (Incubadora TE-371/240L, Tecnal Equipamentos Científicos Brasil). Após esse período, o volume total de todos os poços foi lavado com a adição de 900 µL de caldo *Sabouraud*, centrifugado em microcentrífuga por 1 min, o sobrenadante foi removido e as células foram transferidas para placas de Petri contendo ágar *Sabouraud*, sendo espalhadas com auxílio de alça de Drigalski. A placa foi então incubada a 30 °C por 24 h para determinação das unidades formadoras de colônias (UFC). Imagens em escala de cinza das placas foram capturadas após 24 h (TOLEDO *et al.*, 2021). A DL100 foi definida como a concentração de D-RR em µM que causa a perda da viabilidade de todas as células de levedura no ensaio antimicrobiano. A perda da viabilidade foi determinada pela incapacidade da



levedura em formar colônias em condições apropriadas, livre do agente estressor, após incubação a 30 °C por 48 h.

### **3.5. Determinação da dose fúngica letal de *Candida tropicalis* ATCC 750 para larvas de *Galleria mellonella***

Para este ensaio foram pré-selecionadas larvas no último estágio larval medindo aproximadamente 2-3 centímetros e pesando entre 0,250-0,300 g, saudáveis, sem focos de melanização e movimentando-se ativamente sem a necessidade de estímulo por toque.

Para o preparo do inóculo de *C. tropicalis* ATCC 750, uma cultura fresca com 24 h de crescimento a 30 °C foi suspensa em 1 mL de solução salina fisiológica para insetos (IPS, do inglês *insect physiological saline*: cloreto de sódio 150 mM, cloreto de potássio 5 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM e citrato de sódio 30 mM, pH 6,9) (SCORZONI *et al.*, 2013) para a determinação da densidade celular em células/mL como descrito no item 3.4. A partir deste cálculo, foram preparadas três concentrações de leveduras em IPS contendo  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  células/mL, que foram inoculadas intra-hemocele na região da última pró-pata esquerda das larvas higienizadas com álcool 70% utilizando uma seringa de insulina contendo 10 µL do inóculo (correspondendo a  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células/larva). Em seguida, as larvas foram armazenadas em placas de Petri, incubadas a 37 °C (estufa bacteriológica TE-392/170L — Tecnal equipamentos) e monitoradas a cada 24 h por 6 dias para a verificação dos parâmetros de saúde descritos na **Tabela 1** para o cálculo do índice de saúde. Larvas que receberam apenas 10 µL de IPS foram utilizadas como controle e submetidas às mesmas condições.

Através da descrição de cada categoria (motilidade, formação de casulo, melanização e sobrevivência) todas as larvas ganharam uma pontuação correspondente a seu nível saúde. A categoria “motilidade”, mediu a motilidade das larvas e sua resposta ao toque com uma pinça. A categoria “formação de casulo” mediu a capacidade de formação de casulo das larvas. A categoria “melanização” mediu a produção de melanina através de uma análise visual levando em consideração a porcentagem de melanização da larva como mostrado na **Tabela 1**. Por fim, a categoria “sobrevivência”, mediu a sobrevivência das larvas de acordo com a progressão da infecção fúngica. Todas as categorias foram analisadas a cada

24 h durante os 6 dias após a infecção. Quanto maior a pontuação obtida, melhor o nível de saúde em resposta a infecção. Enquanto isso, as larvas que apresentaram sinais mais severos de doença pontuaram menos. O índice de saúde foi calculado através das médias das pontuações das larvas em cada grupo e auxiliam na determinação da letalidade causada pelas diferentes inoculações da levedura, assim como na eficácia de algum composto antifúngico. A dose fúngica letal foi definida como a concentração que leva a morte gradual de todas as larvas até o sexto dia.

**Tabela 1** — Sistema de pontuação para a determinação do índice de saúde das larvas de *Galleria mellonella*. De acordo com as categorias, todas as larvas recebem uma pontuação de acordo com sua avaliação em cada categoria. Os índices de saúde de cada grupo correspondem a uma média do índice de saúde diário individual de cada larva. A pontuação máxima é 10 e corresponde a larvas sem nenhum sinal de infecção, enquanto a pontuação mínima (0) coincide com a morte (Sugerido por Loh *et al.*, 2013).

Categoria	Descrição	Pontuação	Máximo por categoria
Motilidade	Sem movimento	0	3
	Movimento mínimo com estimulação	1	
	Move quando estimulada	2	
	Move sem estimulação	3	
Formação de casulo	Sem casulo	0	1
	Casulo parcial	0,5	
	Casulo completo	1	
Melanização	Melanização > 40%	0	4
	Melanização entre 20-40%	1	
	Melanização < 20%	2	
	Sem melanização	4	
Sobrevivência	Viva	2	2
	Morta	0	
Pontuação máxima			10

### 3.6. Determinação da atividade antimicrobiana de D-RR sobre a dose fúngica letal de *Candida tropicalis* ATCC 750 para *Galleria mellonella* *in vitro*

Após a determinação da dose fúngica letal de *C. tropicalis* para *G. mellonella*,

procedemos à avaliação da atividade antimicrobiana de D-RR *in vitro* na concentração encontrada. A preparação para a contagem de células e o inóculo de *C. tropicalis* ATCC 750 seguiram as diretrizes do **item 3.5**. O ensaio antimicrobiano seguiu as diretrizes do **item 3.4** com as seguintes modificações. Um branco, contendo apenas caldo *Sabouraud*, foi incluído para correção da absorbância do meio. No controle, foi usada uma concentração de  $10^6$  células/poço diluídas em caldo *Sabouraud* no volume final de 100  $\mu$ L. O tratado foi composto por  $10^6$  células/poço diluídas em caldo *Sabouraud* e diferentes concentrações de D-RR (32, 36,5, 41 e 45,5  $\mu$ M). A placa foi lida em leitor de microplacas (EZ Read 400 - Biochrom) à 620 nm em 0 h (imediatamente após a montagem do ensaio), incubada a 30 °C por 3 h, e novamente lida no leitor de microplacas para a determinação da porcentagem de inibição causada pelos tratamentos. Imagens do fundo dos poços foram obtidas para mostrar o padrão de crescimento da levedura.

### **3.7. Determinação da carga fúngica da hemolinfa de *Galleria mellonella***

Para determinar a unidade formadora de colônia (UFC) na hemolinfa das larvas, uma suspensão contendo a dose fúngica letal de *C. tropicalis* ATCC 750 para *G. mellonella* foi preparada e inoculada de acordo com o **item 3.5**. Uma suspensão contendo apenas IPS foi inoculada no grupo controle. Foram selecionadas larvas (n=5 para cada grupo) em diferentes tempos após a inoculação com as duas suspensões (4, 24 e 48 h). Inserindo suavemente uma agulha de insulina na região da cabeça, 20  $\mu$ L de hemolinfa foram coletadas com o auxílio de uma pipeta e homogeneizadas em uma solução contendo 60  $\mu$ L de IPS e 20  $\mu$ L de tropolona (0,01 g/mL, diluída em água ultrapura, Sigma- Aldrich). Esta mistura foi suspensa em uma nova solução de IPS em diferentes diluições e espalhada em placas de Petri contendo ágar *Sabouraud* nas quais a superfície foi previamente espalhada com 20  $\mu$ L (700  $\mu$ g) de cloranfenicol (estoque de 0,035 g/mL, diluído em etanol e filtrado para esterilização, Sigma- Aldrich) e 10  $\mu$ L (10  $\mu$ g) de ampicilina (estoque de 1000  $\mu$ g/mL preparada em água ultrapura e filtrada para esterilização, Sigma- Aldrich) para evitar o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h para permitir o desenvolvimento de colônias e posterior cálculo da UFC. Foi realizada uma comparação da carga microbiana presente na hemolinfa de larvas infectadas com a dose fúngica letal e larvas inoculadas somente com IPS.

### **3.8. Toxicidade de D-RR *in vivo* no modelo de *Galleria mellonella***

Para o teste de toxicidade, as larvas (n=5) foram selecionadas e inoculadas de acordo com o **item 3.5** com uma suspensão contendo D-RR em uma concentração de 32  $\mu$ M. Para os controles, um grupo de larvas (n=5) receberam apenas 10  $\mu$ L de IPS, e outro grupo (n=5) receberam somente a dose fúngica letal de *C. tropicalis* ATCC 750. As larvas foram incubadas a 37 °C na ausência de luz, com seus índices de saúde registrados a cada 24 h por 6 dias de acordo com a **Tabela 1**. A avaliação da toxicidade de D-RR foi realizada por meio da inspeção visual, acompanhada do registro de sobrevivência e do índice de saúde diário.

### **3.9. Teste de determinação da concentração de hemócitos em *Galleria mellonella***

A densidade de hemócitos foi determinada e utilizada como indicador da resposta imune das larvas durante o experimento. Para isso, foram determinadas as concentrações de hemócitos presentes em larvas inoculadas com uma solução contendo apenas IPS, larvas inoculadas com 32  $\mu$ M de D-RR e larvas infectadas com a dose fúngica letal de *C. tropicalis* ATCC 750 após 4, 24 e 48 h (n=7 para cada grupo). As amostras foram coletadas e preparadas de acordo com o **item 3.7**. Para realizar a contagem de hemócitos totais, uma alíquota de 10  $\mu$ L da amostra foi transferida para uma câmara de Neubauer (LaborOptik, United Kingdom), e a contagem de hemócitos totais foi determinada utilizando o microscópio óptico Axio Imager.A2 (Zeiss). A concentração foi calculada em células/mL e todos os tipos celulares foram contabilizados, sem diferenciação entre eles (SCORZONI *et al.*, 2015).

### **3.10. Estudo da eficácia de D-RR *in vivo* no modelo de infecção fúngica em larvas de *Galleria mellonella***

Para o estudo de eficácia, larvas foram selecionadas e infectadas com a dose fúngica letal de *C. tropicalis* ATCC 750 preparada como descrito no **item 3.5**, e

incubadas à 37 °C. Após uma hora da infecção, as larvas foram novamente inoculadas com 10 µL de uma suspensão contendo 32 µM de D-RR correspondente a 6,12 µg/larva. No controle as larvas foram inoculadas somente com a levedura na concentração fúngica letal. Para experimentos de comparação de tratamentos, após a infecção com a suspensão de levedura, uma solução contendo fluconazol (estoque de 3.265,09 µM, diluído em DMSO, Sigma-Aldrich) na mesma concentração de D-RR (32 µM) foi injetada nas larvas. Suspensões de leveduras foram inoculadas na última pró-pata esquerda, enquanto os tratamentos foram inoculados na penúltima pró-pata direita. Os índices de saúde das larvas em ambos os tratamentos foram medidos de acordo com a **Tabela 1**.

### 3.11. Microscopia eletrônica de transmissão

Foi utilizada uma técnica de microscopia eletrônica de transmissão para a avaliação das larvas e interação entre os microrganismos e D-RR *in vivo* com mais detalhes.

As larvas de *G. mellonella* foram selecionadas e infectadas com a dose fúngica letal de *C. tropicalis* ATCC 750 como descrito no **item 3.5**. Após inoculação, foram incubadas à 37 °C por 1 h, e o grupo teste foi novamente inoculado com o tratamento contendo 32 µM de D-RR como presente no **item**

**3.8**. O grupo tratado e o grupo controle (sem tratamento com D-RR) foram incubados a 37 °C por 24 h para a realização das análises. Após esse período, as lavas foram sacrificadas para o processamento das amostras.

Para a etapa de fixação, 20 mL de uma solução fixadora foi preparada contendo 5 mL de paraformaldeído a 16%, 2 mL de glutaraldeído 100%, 10 mL de tampão cacodilato de sódio a 0,2% e 3 mL de água destilada. Larvas inteiras foram embebidas da solução por 1 h. Após este período, foi realizada uma necropsia da região abdominal das larvas, e estas porções foram novamente embebidas em solução fixadora por mais 1 h. Em seguida, a solução fixadora foi retirada e as amostras foram lavadas 3 vezes com salina tamponada com fosfato (PBS do inglês *phosphate-buffered saline*) para receber o tetróxido de ósmio em uma concentração final de 1%, na ausência de luz, por 50 min. Novamente lavadas com PBS por 3 vezes para seguir para a etapa de desidratação.

Para desidratação, as amostras foram embebidas em soluções de acetona

em concentrações crescentes de 30% à 100%. A infiltração foi realizada em solução (1:1) de resina epoxi (Epon 812) + acetona 100%, até a decantação da amostra (24 h), em temperatura ambiente. Foi realizada outra infiltração com resina epoxi (epoxídica) (Epon 812) pura, durante 2 dias, para a extração completa dos desidratantes e a substituição total pela resina epóxi.

O emblocamento foi realizado com resina epoxi (Epon 812) pura, por meio de formas de silicone, em estufa a 60 °C, durante 48 h, para a confecção dos blocos de resina epoxi. Em ultramicrótomo, foram feitos cortes ultrafinos com 60 a 90 nanômetros, que foram contrastados com acetato de uranila a 7% em metanol durante 20 min, e citrato de chumbo durante 1 min, para a observação em microscópio eletrônico de transmissão.

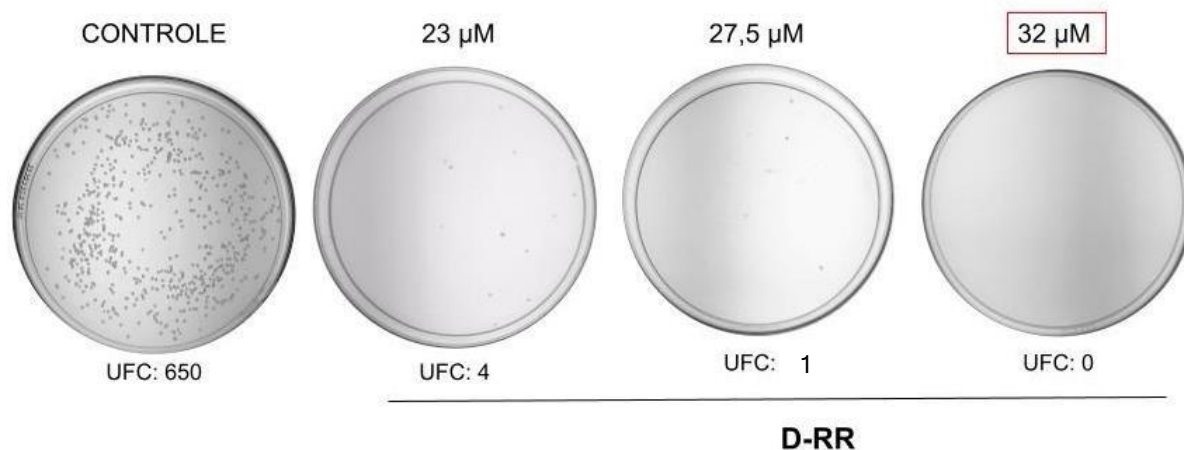
### **3.12. Análises estatísticas**

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. A comparação entre os grupos e comparações múltiplas foram feitas por ANOVA unidirecional.  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo software estatístico GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc., EUA, 500.288). Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Determinação da dose letal de D-RR *in vitro* sobre *Candida tropicalis* ATCC 750

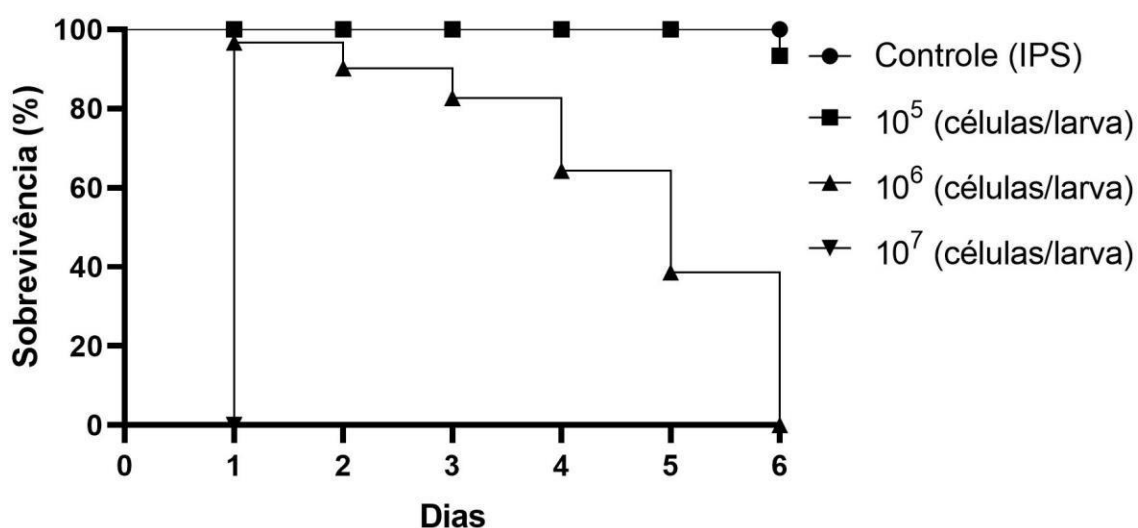
Inicialmente, a atividade antimicrobiana de D-RR já havia sido testada frente a uma cepa não clínica de *C. tropicalis*, causando perda total da viabilidade celular em 23  $\mu\text{M}$  (TOLEDO *et al.*, 2021). O objetivo deste ensaio foi saber se D-RR apresentaria a mesma atividade inibitória para a cepa clínica. Baseado no ensaio anterior, usamos a concentração de 23  $\mu\text{M}$  para testar a atividade de D-RR sobre a nova cepa clínica de *C. tropicalis* ATCC 750. Esta concentração inicial testada não causou a morte de toda a população do ensaio, e a concentração de D-RR foi aumentada em 4,5  $\mu\text{M}$  em relação à concentração anterior até causar a perda total da viabilidade celular. Apenas a concentração mais alta testada, correspondente a 32  $\mu\text{M}$  causou a morte de toda a população de leveduras do ensaio. Sendo assim, consideramos 32  $\mu\text{M}$  a DL100 de D-RR sobre a cepa clínica nas condições em que o ensaio foi realizado (Fig. 6). Este resultado indica que a DL100 de D-RR aumentou para a cepa clínica em relação à cepa testada no estudo anterior.



**Figura 6** — Viabilidade de *Candida tropicalis* ATCC 750 tratadas com D-RR. Imagens de placas de Petri mostrando as unidades formadoras de colônia (UFC) de *C. tropicalis* após 24 h de incubação a 30 °C na ausência (controle) e presença de diferentes concentrações de D-RR, determinando sua nova DL100, indicada no quadrado vermelho. Ensaio representativo de três.

#### 4.2. Determinação da dose fúngica letal de *Candida tropicalis* ATCC 750 para larvas de *Galleria mellonella*

Para determinar a susceptibilidade de *G. mellonella* à *C. tropicalis* ATCC 750, as larvas foram infectadas com 10  $\mu$ L de três suspensões de levedura em IPS nas concentrações de  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  células/mL (correspondendo a  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células/larva). O grupo controle foi inoculado com uma suspensão contendo apenas IPS. As larvas inoculadas com a menor suspensão ( $10^5$  células/larva) apresentaram uma mortalidade de 7% no sexto dia, enquanto as larvas que foram inoculadas com a maior suspensão ( $10^7$  células/larva) apresentaram mortalidade de 100% após 24 h. Nas concentrações de  $10^6$  células/larva, a mortalidade foi gradual de acordo com o desenvolvimento da infecção, mas sua progressão levou a morte de todas as larvas no sexto dia após a inoculação, sendo esta a dose fúngica letal escolhida para a levedura. No controle, as larvas inoculadas somente com IPS mantiveram 100% de sobrevivência até o sexto dia de experimentos (Fig. 7).



**Figura 7** — Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de *Galleria mellonella* infectada com diferentes suspensões da levedura *Candida tropicalis* ATCC 750 durante 6 dias. O tempo de morte dependeu da suspensão. O inóculo menos concentrado ( $10^5$  células/larva) apresentou mortalidade significativamente menor do que o de  $10^6$  células/larva. Em contrapartida, a suspensão mais concentrada ( $10^7$  células/larva) resultou em alta mortalidade em um curto período de tempo. O controle incluiu larvas inoculadas com IPS, com a sobrevivência máxima mantida durante os 6 dias.



Todos em ensaios foram realizados em triplicatas.

Os índices de saúde diários (Tabela 2) corroboram com os resultados da curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. Enquanto o controle apresentou uma pontuação média de 9,6, a concentração de  $10^5$  células/larva apresentou um índice de saúde alto próximo ao do controle, com pontuação média 8 durante os 6 dias de observação do experimento. A dose letal escolhida ( $10^6$  células/larva) apresentou um declínio do índice de saúde de acordo com os dias, apresentando pontuação média de 1,9. A suspensão mais concentrada ( $10^7$  células/larva) apresentou pontuação 0, indicando os sinais mais severos de infecção que culminaram com a morte de todas as larvas após 24 h.

**Tabela 2** — Índice médio de saúde de *Galleria mellonella* infectada com diferentes concentrações de *C. tropicalis* ATCC 750 e inoculada com controle contendo apenas IPS. A tabela mostra os índices de saúde diários e médios durante os 6 dias de infecção. O aumento da pontuação média é proporcional a saúde das larvas, sendo máximo=10 representado por larvas saudáveis e sem sinais de infecção em todos os parâmetros de saúde (motilidade, casulo, melanização e sobrevivência) e mínimo=0 representado por larvas com os sinais mais severos de infecção coincidindo com a morte. Desta forma, a diminuição do índice de saúde diário representa a progressão da doença. Os asteriscos indicam significância estatística em relação ao controle (\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). Os valores foram expressos como média.

Amostras	Dias após a inoculação						Pontuação média
	1º	2º	3º	4º	5º	6º	
controle (IPS)	9,0	9,8	9,8	9,7	9,9	9,8	9,6
<i>C. tropicalis</i> $10^5$	9,3	8,2	7,7	7,7	7,9	7,7	8,0 *
<i>C. tropicalis</i> $10^6$	3,9	3,2	2,2	1,3	0,7	0,0	1,9 ****
<i>C. tropicalis</i> $10^7$	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ****

Cada categoria mostrada na **Tabela 1** também foi analisada separadamente (motilidade, formação de casulo, melanização e sobrevivência) durante os 6 dias de infecção. Na categoria “motilidade” (Tabela 3) as larvas controle apresentaram pontuação máxima (3), indicando que não foram afetadas pela inoculação de IPS que mimetiza a inoculação com a levedura, e que o fermento provocado pela inoculação não as afetou. De acordo com o aumento da concentração de *C. tropicalis* houve uma perda gradual da motilidade e um declínio na pontuação média,

onde as larvas inoculadas com  $10^5$  células/larva apresentaram pontuação 2,1; o grupo inoculado com  $10^6$  células/larva obteve pontuação 0,7 e o grupo inoculado com  $10^7$  células/larva teve pontuação 0. Isso mostra que a progressão da infecção fúngica deixou as larvas menos móveis coincidindo com a morte.

Na categoria “casulo”, (Tabela 4) as larvas controles também apresentaram pontuação elevada (0,7) e formação de casulo normal, enquanto as larvas inoculadas com as suspensões microbianas tiveram um declínio gradual na pontuação ( $10^5 = 0,4$ ;  $10^6 = 0,02$  e  $10^7 = 0$ ) indicando que de acordo com a concentração de *C. tropicalis* e progressão da infecção, a capacidade de produzir seda para a formação do casulo é perdida.

Na categoria “melanização” a pontuação máxima (4) obtida pelo grupo controle, indica que não há sinais de melanização e que as larvas estão saudáveis e sem focos de infecção. A suspensão de  $10^5$  células/larva também obteve uma pontuação média elevada de 3,6, indicando que as larvas deste grupo apresentaram uma melanização mais branda. De acordo com o aumento da melanização nos demais grupos, a pontuação média declina de acordo com o aumento da melanização, onde o grupo inoculado com  $10^6$  obteve pontuação 0,3 e o grupo inoculado com  $10^7$  células/larva a pontuação foi 0 (Tabela 5).

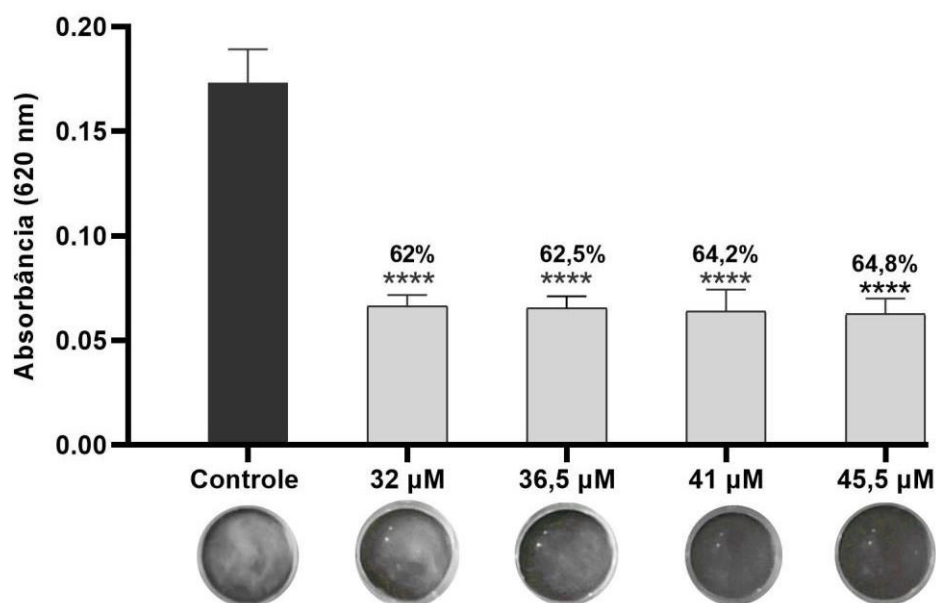
A categoria “sobrevivência” analisa individualmente a sobrevivência de cada grupo através da pontuação, representada pelo controle com pontuação máxima de 2, indicando que não houve morte de nenhuma larva durante os 6 dias, grupo  $10^5$  células/larva com pontuação 1,5; grupo  $10^6$  células/larva apresentou pontuação 0,7 e grupo  $10^7$  células/larva a pontuação foi 0, mostrando que as demais suspensões levaram a morte de acordo com a concentração inoculada (Tabela 6).

**Tabela 3** — Pontuação diária e média do índice de saúde motilidade, que mede a motilidade das larvas e sua resposta ao toque de acordo com a progressão da infecção fúngica causada por *Candida tropicalis* ATCC 750. O aumento da pontuação é proporcional a saúde das larvas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (n=15). Os asteriscos indicam significância estatística em relação ao controle (\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0007$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). Os valores foram expressos como média.



### 4.3. Determinação da atividade antimicrobiana de D-RR sobre a dose fúngica letal de *Candida tropicalis* ATCC 750 para *Galleria mellonella* *in vitro*

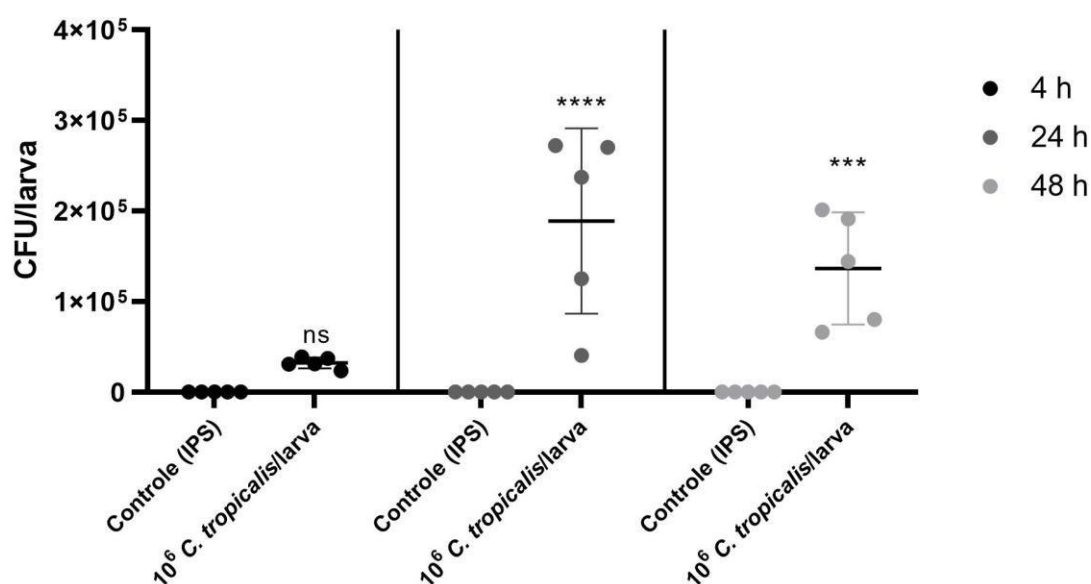
A inibição de D-RR sobre a dose microbiana letal de *G. mellonella* ( $10^6$  células/larva) foi determinada a partir do aumento gradual em  $4,5 \mu\text{M}$  a partir da concentração inicial de  $32 \mu\text{M}$ . A leitura de absorvância mostrou que D-RR apresentou inibição de 62% na concentração de  $32 \mu\text{M}$ , seguindo uma inibição de 62,5, 64 e 64,8 nas concentrações de 36,5, 41 e  $45,5 \mu\text{M}$  respectivamente, como mostrado na figura 8. Nas imagens de fundos dos poços da placa de 96 poços mostra que a inibição foi proporcional à diminuição da massa de células. Diante dos resultados obtidos, escolhemos a menor concentração testada para dar continuidade ao estudo de eficácia *in vivo*.



**Figura 8** — Atividade antimicrobiana de D-RR sobre a dose fúngica letal de *Candida tropicalis* ATCC 750 para *Galleria mellonella*. Crescimento das leveduras na ausência (controle) e presença em diferentes concentrações do peptídeo D-RR. A porcentagem de inibição das leveduras é mostrada acima das barras, seguido pelas imagens dos fundos dos poços com o padrão de crescimento. Os asteriscos indicam significância estatística em relação ao controle (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). Os valores foram expressos como média e desvio padrão.

### 4.4. Determinação da carga fúngica na hemolinfa de *Galleria mellonella*

Para entender com mais detalhes a resposta imune de *G. mellonella* à infecção com a dose fúngica letal, as unidades formadoras de colônia (UFC) presentes na hemolinfa após 4, 24 e 48 h de infecção foram quantificadas e são mostradas na figura 9. Um grupo inoculado somente com IPS foi usado como controle e não apresentou formação de UFC na hemolinfa. Os resultados mostram que a UFC aumentam de acordo com o tempo nas larvas infectadas de 4 para 24 h, indicando a progressão da infecção fúngica. De 24 para 48 h é observada uma pequena queda na UFC.



**Figura 9** — Determinação das unidades formadoras de colônia (UFC) da hemolinfa de *G. mellonella* infectada com a dose fúngica letal de *C. tropicalis* ATCC 750 e inoculadas com IPS após 4, 24 e 48 h de inoculação. Os asteriscos indicam significância estatística em relação ao controle (\*\*\*)  $p < 0,001$  \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) e ns não significativo em relação ao controle. Os valores foram expressos como média e desvio padrão.

#### 4.5. Toxicidade de D-RR *in vivo* para *Galleria mellonella*

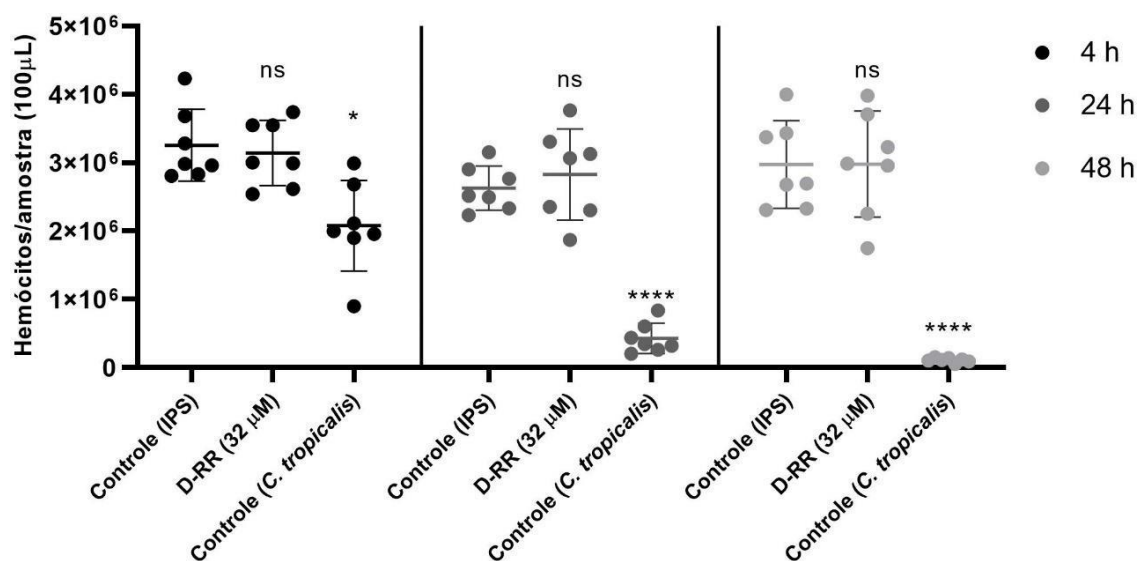
Uma suspensão contendo D-RR foi administrada com a menor dose testada nos experimentos anteriores (32  $\mu$ M), e não resultou em morte ou lesão significativas para *G. mellonella* indicado pelo índice geral de saúde de 9,3, que não foi significativamente diferente do controle, com índice 9,6 (Tabela 6).

Estes dados indicam que o peptídeo não é tóxico para as larvas na concentração testada.

**Tabela 6** — Registro do índice de saúde diário e médio de *Galleria mellonella* durante 6 dias em resposta ao peptídeo sintético D-RR. Larvas inoculadas apenas com o IPS e apenas com a suspensão de leveduras contendo  $10^6$  células/larva foram utilizadas como controle. Os asteriscos indicam significância estatística em relação ao controle (\*\*\*) e ns não significativo em relação ao controle. Os valores foram expressos como média.

Amostras	Dias após a inoculação						Pontuação média
	1 <sup>o</sup>	2 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>	6 <sup>o</sup>	
controle (IPS)	9,0	9,8	9,8	9,7	9,9	9,8	9,6
controle ( <i>C. tropicalis</i> )	3,9	3,2	2,2	1,3	0,7	0,0	1,9 ***
D-RR (32 µM)	9,5	9,4	9,1	9,4	9,4	9,3	9,3 (ns)

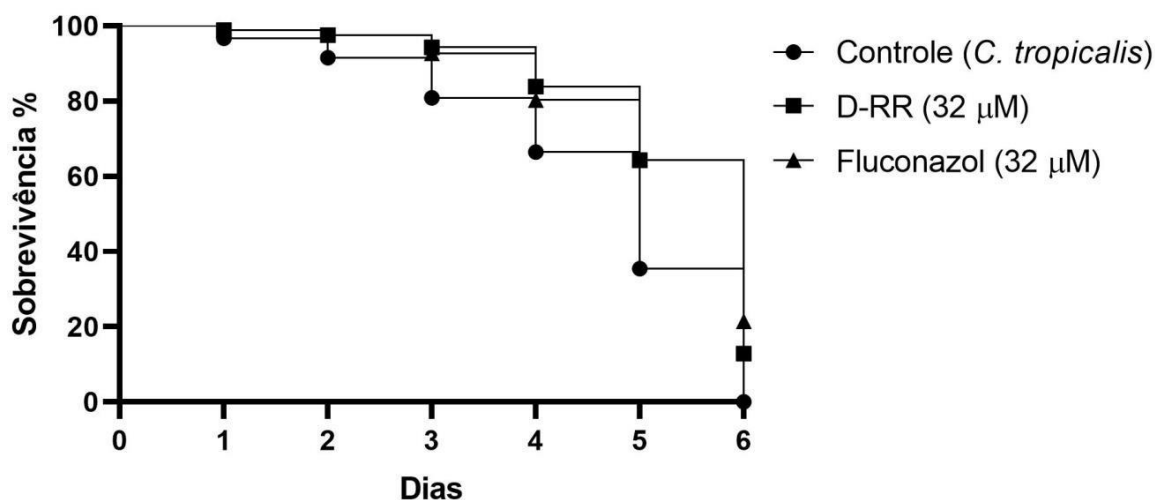
A concentração de hemócitos de *G. mellonella* na hemolinfa foi determinada em três períodos após a inoculação dos controles e D-RR (4, 24 e 48 h). O grupo controle inoculado com IPS mantém o número médio de hemócitos de  $3 \times 10^6$  em 4 h,  $2 \times 10^6$  após 24 h, e  $2,4 \times 10^6$  células/100µL após 48 h. A pouca variação na densidade de hemócitos é um indicativo de que a resposta imune celular do inseto não é afetada com a inoculação de IPS. O mesmo acontece com o grupo tratado com D-RR, que apresenta uma concentração de hemócitos de  $3 \times 10^6$  em 4 h,  $2,8 \times 10^6$  em 24 h,  $2,9 \times 10^6$  células/100µL em 48 h, próxima do grupo controle inoculado com IPS. No grupo inoculado com a dose fúngica letal de *C. tropicalis* ( $10^6$  células/larva), há um declínio gradual no número de hemócitos de acordo com a progressão da infecção, de  $2 \times 10^6$  para 4 h, de  $4,2 \times 10^5$  para 24 h e de  $1 \times 10^5$  células/100µL para 48 h. Após 24 h é possível observar a presença de inúmeras pseudo-hifas (dados não mostrados) e raros hemócitos na hemolinfa do inseto, demonstrado que a evolução da infecção está diretamente ligada com a resposta imune celular (Fig. 10). As concentrações de hemócitos foram expressas em hemócitos/100 µL da amostra final.



**Figura 10** — Concentração de hemócitos em 100 µL de amostra presentes na hemolinfa de *G. mellonella* inoculada com 32 µM de D-RR, IPS e *C. tropicalis* na concentração de  $10^6$  células/larva nos períodos de 4, 24 e 48 h após a inoculação. Os asteriscos indicam significância estatística em relação ao controle (IPS) (\*  $p < 0,03$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) e ns não significativo em relação ao controle. Os valores foram expressos como média e desvio padrão.

#### 4.6. Estudo da eficácia de D-RR *in vivo* no modelo de infecção fúngica em larvas de *Galleria mellonella*

Com os parâmetros determinados acima, foi feito um teste inicial da atividade antimicrobiana de D-RR *in vivo*. Foi testada a menor concentração responsável por inibir *C. tropicalis* (32 µM, correspondente a 6,12 µg/larva). A curva de sobrevivência das larvas inoculadas com o tratamento de 32 µM e somente a suspensão de leveduras (controle) encontra-se na figura 11 abaixo. Os resultados foram comparados com o fármaco de referência fluconazol na mesma concentração de D-RR. De acordo com o gráfico, D-RR se apresentou pouco efetivo frente a *C. tropicalis in vivo*, indicando uma taxa de sobrevivência de 12,8% no sexto dia. No grupo de 15 larvas tratadas, apenas 3 sobreviveram a dose letal. Fluconazol apresentou uma atividade superior na mesma concentração, responsável por uma taxa de sobrevivência de 21%, correspondendo a sobrevivência de 5 larvas no sexto dia de tratamento.



**Figura 11** — Sobrevivência de *Galleria mellonella* infectada com a dose letal *Candida tropicalis* frente aos tratamentos com D-RR e fluconazol nas concentrações de 32 µM. O controle indica 0% de sobrevivência sexto dia, enquanto o tratado na concentração de 32 µM de D-RR e fluconazol indicam 12,8% e 21,4% respectivamente.

O índice de saúde geral das larvas durante os 6 dias também foi analisado. Apesar do tratamento com fluconazol se apresentar mais efetivo, a concentração administrada não garantiu a sobrevivência das larvas da morte causada por *C. tropicalis*. Ambos os tratamentos não aumentaram significativamente os índices médios de saúde (Tabela 7).

**Tabela 7**— Índice de saúde de larvas de *Galleria mellonella* durante os seis dias após a inoculação com a dose fúngica letal de *Candida tropicalis* ATTC 750 e tratadas com D-RR e fluconazol nas doses indicadas. O controle foi inoculado com IPS. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (n=15). ns indica não significativo em relação ao controle. Os valores foram expressos como média.

Amostras	Dias após a inoculação						Pontuação média
	1º	2º	3º	4º	5º	6º	
controle (IPS)	9,0	9,8	9,8	9,7	9,9	9,8	9,6
controle ( <i>C. tropicalis</i> )	3,9	3,2	2,2	1,4	0,7	0	1,9
D-RR (32 µM)	5,6	3,6	3,6	2,5	2,1	0,6	3,0 (ns)
fluconazol (32 µM)	6,1	4,4	4,3	2,5	2,2	1,1	3,5 (ns)



Cada categoria mostrada na **Tabela 1** também foi analisada separadamente (motilidade, formação de casulo, melanização e sobrevivência) durante os 6 dias para ambos os tratamentos. O controle recebeu apenas a suspensão de células ( $10^6$  células/larva) e foi correspondente a larvas com sinais de infecção acentuado progredindo até o sexto dia. Apesar de o tratamento com D-RR e fluconazol aumentarem ligeiramente os índices de saúde, não houve uma melhora significativa na saúde das larvas (Tabelas 8,9 e 10).

**Tabela 8** — Pontuação diária e média do índice de saúde “motilidade”, que mede a motilidade das larvas e sua resposta ao toque de acordo com a progressão da infecção fúngica causada por *Candida tropicalis* ATCC 750. O aumento da pontuação é proporcional a saúde das larvas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (n=15). ns indica não significativo em relação ao controle. Os valores foram expressos como média.

Amostras	Dias após a inoculação						Pontuação média
	1 <sup>o</sup>	2 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>	6 <sup>o</sup>	
controle ( <i>C. tropicalis</i> )	1,6	1,2	0,7	0,6	0,2	0,0	0,7
<i>C. tropicalis</i> + D-RR (32 $\mu$ M)	2,5	1,3	1,7	1,0	0,7	0,2	1,2 (ns)
<i>C. tropicalis</i> + fluconazol (32 $\mu$ M)	2,5	1,7	1,9	1,2	1,1	0,4	1,5 (ns)

**Tabela 9** — Pontuação diária e média do índice de saúde “Casulo”, que mede formação de casulo das larvas de acordo com a progressão da infecção fúngica causada por *Candida tropicalis* ATCC 750. O aumento da pontuação é proporcional a saúde das larvas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (n=15). ns indica não significativo em relação ao controle. Os valores foram expressos como média.

Amostras	Dias após a inoculação						Pontuação média
	1 <sup>o</sup>	2 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>	6 <sup>o</sup>	
controle ( <i>C. tropicalis</i> )	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,03
<i>C. tropicalis</i> + D-RR (32 $\mu$ M)	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,03 (ns)
<i>C. tropicalis</i> + fluconazol (32 $\mu$ M)	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,06 (ns)

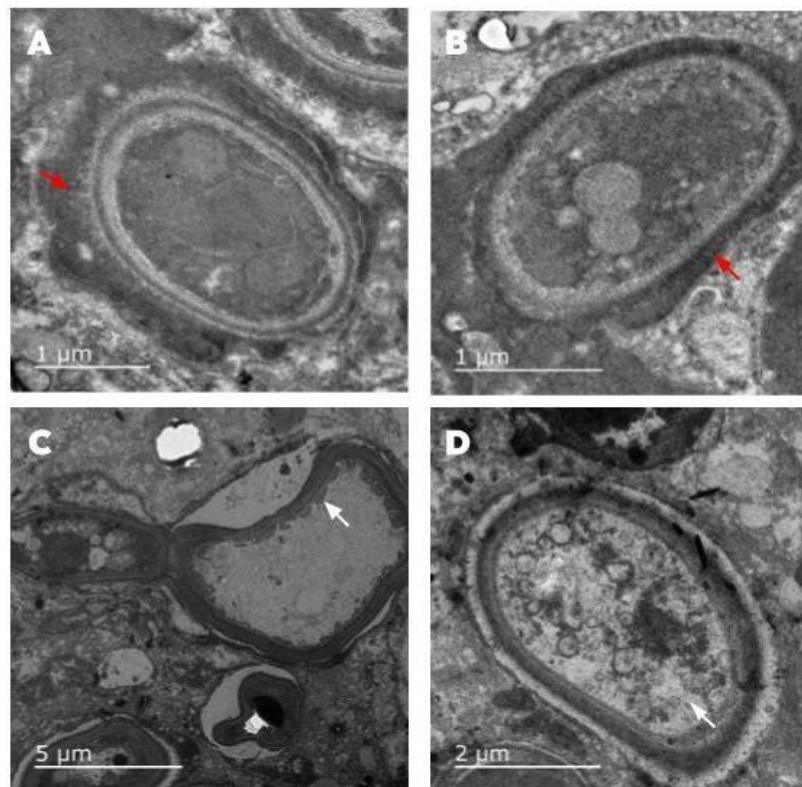
**Tabela 10**– Pontuação diária e média do índice de saúde “Melanização”, que mede a produção de melanina através de uma análise visual de acordo com a progressão da infecção fúngica causada por *Candida tropicalis* ATCC 750. O aumento da pontuação é proporcional a saúde das larvas e inversamente proporcional a concentração de melanina. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (n=15). ns indica não significativo em relação ao controle. Os valores foram expressos como média.

Amostras	Dias após a inoculação						Pontuação média
	1 <sup>o</sup>	2 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>	6 <sup>o</sup>	
controle ( <i>C. tropicalis</i> )	0,7	0,7	0,5	0,2	0,2	0,0	0,4
<i>tropicalis</i> + D-RR (32 µM)	1,1	0,7	0,1	0,2	0,3	0,0	0,4 (ns)
<i>C. tropicalis</i> + fluconazol (32 µM)	1,6	0,7	0,6	0,1	0,0	0,0	0,5 (ns)

Nenhum tratamento melhorou significativamente as categorias de saúde.

#### 4.7. Microscopia eletrônica de transmissão

De acordo com as imagens de microscopia eletrônica de transmissão, é possível observar diferenças nas células de *C. tropicalis* das larvas tratadas e não tratadas com D-RR. No controle as células estão integras, com citoplasma estruturado e há uma substância eletrondensa envolvendo as células. No tratamento, as células das leveduras estão vacuolizadas, e algumas deformadas e sem o material escuro em torno das células (Figura 12. C e D). Estas diferenças indicam que o tratamento com o D-RR causou alterações morfológicas nas células das leveduras indicando que este foi ativo em condições *in vivo*. Estas alterações serão estudas com mais detalhes futuramente.



**Figura 12**– Imagens microscópicas do corte de *Galleria mellonella* infectada com *Candida tropicalis* ATCC 750 sem tratamento e tratada com 32  $\mu$ M de D-RR. (A e B) Células controle de *C. tropicalis* com parede celular intacta e citoplasma estruturado. Nota-se o material escuro em torno da célula (seta vermelha). (C e D) Célula de *C. tropicalis* com o citoplasma vacuolizado e com parede deformada (setas brancas). Note a ausência do material escuro em torno das células.

## 5. DISCUSSÃO

Ainda que as infecções causadas por bactérias, vírus e protozoários ganhem mais destaque pelas autoridades de saúde pública, infecções causadas por fungos patogênicos têm se tornado uma grande ameaça para a saúde humana. Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou dados com um ranking de fungos que ameaçam a saúde humana como um esforço para alertar para uma diversidade de patógenos negligenciados, apesar de sua presença crescente e resistência a diversos tratamentos disponíveis. Segundo dados, o grupo crítico inclui *Cryptococcus neoformans*, *Candida auris*, *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*. O grupo de alto risco é composto por *Candida glabrata*, *Histoplasma spp.*, *Fusarium spp.*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. Finalmente, os patógenos do grupo de médio risco são *Scedosporium spp.*, *Lomentospora prolificans*, *Coccidioides spp.*, *Candida krusei*, *Cryptococcus gattii*, *Talaromyces marneffeii*, *Pneumocystis jirovecii* e *Paracoccidioides spp* (WHO, 2020).

Dos 17 nomes mencionados anteriormente, destaca-se que seis pertencem às leveduras do gênero *Candida*, enfatizando sua relevância clínica. Dentro desse gênero, *C. albicans* é notavelmente associada a quadros infecciosos. No entanto, observa-se um aumento expressivo nas infecções causadas por espécies de *Candida não-albicans* (CNA), acompanhado do crescimento na frequência de resistência aos medicamentos antifúngicos em diversas espécies de CNA. Entre essas, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são as mais frequentemente associadas à candidíase (GÓMEZ- GAVIRIA, RAMÍREZ & MORA, 2022; SADEGHI *et al.*, 2018). Esse cenário impõe uma pressão crescente e urgente na busca por novos compostos com propriedades antifúngicas, com potencial para servirem como substâncias terapêuticas para o tratamento da candidíase.

AMPs isolados de plantas vêm se tornando muito promissoras no combate a fungos clinicamente relevantes, incluindo as espécies abordadas pela OMS anteriormente (DA SILVA *et al.*, 2018; GAMES *et al.*, 2008; GUEVARA-LORA *et al.*, 2020; PATRIOTA *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.* 2007; TAVEIRA *et al.* 2016; TOLEDO *et al.*, 2021). O peptídeo sintético D-RR utilizado nesse estudo, apresenta atividade antifúngica sobre espécie de *C. albicans* e não-

*albicans in vitro*, e dados de um estudo anterior apresentados por Toledo & colaboradores (2021) mostram sua efetividade em inibir em 100% o crescimento de *C. tropicalis* e 84,9% o crescimento de *C. albicans* em uma baixa concentração de 18,5  $\mu\text{M}$  (Fig. 4). Devido a estes dados, D-RR foi testado *in vitro* contra uma cepa clínica de *C. tropicalis* ATCC 750. Os resultados de dose letal de D-RR *in vitro* evidenciaram uma menor atividade antifúngica sobre a cepa clínica, que foi inibida na concentração de 32  $\mu\text{M}$ . Podemos sugerir que essa diminuição na atividade está ligada a fatores de virulência da nova cepa, entre eles, a secreção de proteases que já foram evidenciadas em alguns estudos (NEGRI *et al.*, 2011; TOGNI *et al.*, 1996). Já é reconhecido que enzimas hidrolíticas, como as aspartil proteinases secretadas (Saps), desempenham um papel crucial na facilitação da invasão e colonização de tecidos. Elas atuam rompendo as membranas mucosas do hospedeiro e degradando proteínas essenciais para a defesa imunológica e estrutural, como os AMPs (NEGRI *et al.*, 2011; ZAUGG *et al.*, 2001;). Em diferentes cepas de *C. tropicalis*, já foram identificados pelo menos quatro genes que codificam Saps, sendo eles designados como SAPT1, SAPT2, SAPT3 e SAPT4 (NEGRI *et al.*, 2011). De forma curiosa, existem dados experimentais que descrevem mecanismos pelos quais alguns patógenos bacterianos desenvolvem resistência aos AMPs, e entre os variados mecanismos, estão a degradação do AMP por proteases que já foram descritos para uma cepa de *Salmonella enterica* por Guina & colaboradores (2000), e em *Escherichia coli* por Stumpe & colaboradores (1998). Até o momento, não existem dados sobre os mecanismos de resistência de patógenos fúngicos aos AMPs.

Embora a concentração de D-RR tenha aumentado em relação à cepa clínica, os resultados encontrados demonstram sua promissora atividade antifúngica *in vitro* em baixas concentrações, indicando seu potencial para ser aplicado como uma possível substância terapêutica. Nesse sentido, os ensaios iniciais em modelos *in vivo* são de grande importância, representando um passo crucial para sua implementação em testes clínicos (SERRANO *et al.*, 2023).

Muitos AMPs com atividade antimicrobiana promissora e não tóxicos *in vitro* acabam não sendo bem-sucedidos nos testes clínicos, sendo um dos principais desafios e causa desta baixa atividade *in vivo* relacionado à estabilização desses peptídeos. Eles são mais susceptíveis à degradação proteolítica, resultando em meias-vidas curtas e dificuldade em manter concentrações plasmáticas

necessárias para alcançar a concentração inibitória mínima (TANNER *et al.*, 2021). Atualmente, esse desafio pode ser superado por meio de tecnologias que melhoram a disponibilidade, como sistemas poliméricos de liberação controlada (PIOTROWSKA *et al.*, 2018), nanopartículas (IZQUIERDO-BARBA *et al.*, 2009), entrega lipossomal (VAN GENT *et al.*, 2021) e PEGilação de peptídeos (GONG *et al.*, 2017). Além disso, a produção em larga escala de AMPs com um bom custo-benefício tornou-se um obstáculo menor com o avanço das tecnologias de fase sólida nos últimos anos (DUCAN & O'NEIL, 2013), uma tendência que só deve melhorar com a pressão do mercado, à medida que mais terapêuticos baseados em AMPs avançam.

Diante do exposto, optamos por avançar com D-RR para os ensaios *in vivo*, empregando o modelo alternativo com *Galleria mellonella* para os testes iniciais a fim de avaliar sua atividade em um modelo de infecção sistêmica por *C. tropicalis*. A efetividade e o crescente interesse pelas larvas de *G. mellonella* como um modelo alternativo de infecção é evidenciado pelo número de artigos relatando seu uso nos últimos anos. Elas já foram relatadas como um modelo adequado de infecção bacteriana e no estudo da patogênese bacteriana (ADMELLA & TORRENTS, 2023; ASAI *et al.*, 2023; MÉNARD *et al.*, 2021); no estudo de nematoides (GAFFKE *et al.*, 2022; NOOSIDUM *et al.*, 2010; ONO *et al.*, 2010) no estudo da terapia fágica (EL HADDAD *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2023; MANOHAR *et al.*, 2018) e principalmente, no estudo da virulência de patógenos fúngicos (FIRACATIVE *et al.*, 2020; TREVIJANO-CONTADOR & ZARAGOZA, 2018) assim como as interações fungo-hospedeiro (CURTIS *et al.*, 2022; PIATEK *et al.*, 2021). As larvas também vem sendo utilizadas para determinar a toxicidade *in vivo* de diversos compostos (ARSENE *et al.*, 2021; KASKATEPE *et al.*, 2022; PIATEK *et al.*, 2021) e a eficácia de agentes antimicrobianos novos e convencionais frente a diferentes patógenos (KAVANAGH & SHEEHAN, 2018; PIATEK *et al.*, 2020), incluindo AMPs (SINGULANI *et al.*, 2019).

Para o estudo da eficácia de um agente antimicrobiano novo ou convencional, é necessário experimentos preliminares para estabelecer uma concentração letal do microrganismo em estudo. Há uma variedade de parâmetros para estabelecer o nível de saúde das larvas que facilitam a rápida avaliação da infecção e auxiliam para o estabelecimento preciso da concentração letal, assim como nos testes de toxicidade e eficácia, indicando se o composto utilizado para o tratamento causa uma melhora nesses parâmetros, como apresentado na Tabela 1.

A melanina é um composto tóxico para o patógeno mas também para o hospedeiro, por tanto a sua produção é regulada (JEMEL *et al.*, 2020). Em *G. mellonella*, a melanização ocorre após entrada microbiana e consequente ativação da cascata de profenoloxidase, desta forma, é um indicador de saúde. A motilidade é outro parâmetro indicador da viabilidade larval, uma vez que a capacidade de se mover sem o estímulo por toque são indicadores de saúde. Desta forma, as alterações na motilidade das larvas pode ser utilizada para rastrear mudanças no comportamento após a exposição a algum microrganismo ou toxina e compostos (MAGUIRE *et al.*, 2017). A produção de casulos é um indicador de aptidão larval, ou seja, larvas com sinais de doença perdem gradualmente essa capacidade. Um estudo conduzido por Romera & colaboradores (2020) mostrou que larvas de *G. mellonella* infectadas com uma suspensão de *C. auris* apresentam formação reduzida de casulos, que está ligado com a virulência da cepa. Por fim, a sobrevivência é medida de acordo com o estabelecimento da infecção, podendo ser resgata com a administração de tratamentos.

A partir dos nossos ensaios *in vivo*, estabelecemos através de ensaio de sobrevivência e da avaliação dos parâmetros de saúde, uma concentração fúngica responsável por causar a morte gradual de todas as larvas até o último dia de avaliação, ou seja, a DL100. Alguns autores relatam doses sub-letais para os testes de eficácia, ou seja, a dose que causa 90% de mortalidade nas larvas (DL90) (JEMEL *et al.*, 2020). Outros autores, utilizam a dose responsável por 100% da mortalidade no último dia de avaliação do ensaio (DL100) (BERGIN *et al.*, 2006; ROWAN *et al.*, 2009). A dose estabelecida para nossos ensaios correspondeu a  $10^6$  células/larva, e nossos resultados diferem dos resultados encontrados por Mesa-arango & colaboradores (2013), onde a inoculação nas concentrações de  $10^6$  células/larva da mesma cepa de *C. tropicalis* só levou a morte de todas as larvas no nono dia de experimentos. O trabalho de Silva & colaboradores comparou a virulência de diversas cepas de CNA, onde *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. lusitaniae* exibiram maior virulência, entretanto, a concentração de  $10^6$  células/larva de *C. tropicalis* ATCC 750 apresentou baixa mortalidade, resultando em um percentual de sobrevivência das larvas de 80% no último dia de avaliação do experimento.

Para investigar a virulência da cepa e a resposta imune de *Galleria mellonella* durante a infecção com a concentração letal, analisamos a carga fúngica na

hemolinfa após 4, 24 e 48 h após a inoculação. Nossos resultados indicam que o período de 24 h exibiu o maior número de unidades formadoras de colônias (UFC) em comparação com os outros períodos. Esse achado está em concordância com Mesa-arango e colaboradores (2013), que observaram um pico de UFC no primeiro dia ao avaliar a concentração na hemolinfa de *G. mellonella* infectada por *C. tropicalis*.

Além disso, nossos ensaios destacaram a formação significativa de pseudo-hifas após a inoculação com a dose fúngica letal, especialmente no período de 24 h (dados não mostrados). Essas observações coincidem com os resultados do estudo anterior para a mesma cepa. A presença dessas transições morfológicas em *C. tropicalis* ATCC 750 sugere uma possível relação com sua virulência, contribuindo para a aderência a superfícies, aumento na disseminação e proporcionando uma vantagem na evasão dos hemócitos de *G. mellonella*.

Um grande número de AMPs apresenta baixa toxicidade para células de mamíferos, além disso, o desenvolvimento de peptídeos sintéticos podem melhorar sua atividade, biocompatibilidade e toxicidade (KUMAR *et al.*, 2018). Devido a este fato, estudamos a toxicidade de D-RR *in vivo* no modelo de *G. mellonella*, e através dos ensaios, pudemos determinar que não houve toxicidade na concentração testada. Os índices de saúde das larvas inoculadas com D-RR se assemelharam ao grupo controle com as larvas inoculadas com IPS, não havendo alteração significativa nos parâmetros de saúde das larvas em relação ao controle, mostrado na Tabela 6. Essa toxicidade foi avaliada com mais detalhes através da determinação de hemócitos totais presente na hemolinfa das larvas, onde D-RR não foi capaz de alterar a densidade hemocitária assim como o controle (Fig.10). Este resultado apoia um trabalho anterior, onde foi demonstrado que D-RR apresenta baixa toxicidade para macrófagos murinos e monócitos humanos (TOLEDO *et al.*, 2021). Para a comparação de resultados, também foi determinado a concentração de hemócitos presentes na hemolinfa das larvas inoculadas com a concentração letal de *C. tropicalis*, que apresentaram estatisticamente, diferenças significativas na densidade hemocitária comparado as larvas controle inoculadas com IPS e no grupo tratado com D-RR. Essa diminuição na densidade de hemócitos já foi relatada anteriormente em outros estudos (BERGIN *et al.*, 2003), assim como em trabalhos envolvendo a mesma cepa com resultados semelhantes (MESA-ARANGO *et al.*, 2013). Essa diminuição na densidade dos hemócitos pode ser



explicada por alguns mecanismos, como por exemplo, a formação de pseudo-hifas relatada anteriormente, que após a fagocitose, podem contribuir para a lise dos hemócitos totais, resultando na diminuição no número dessas células (KAVANAGH & REEVES, 2004).

Por fim, estudamos a atividade antifúngica de D-RR *in vivo* num modelo de infecção sistêmica com *G. mellonella* infectada com a concentração letal de *C. tropicalis* ATCC 750. Decidimos utilizar a menor concentração utilizada nos ensaios anteriores (32 µM) correspondente a 6,12 µg/larva. Foi demonstrado através da curva de sobrevivência que essa concentração testada evitou a morte de apenas 12,8% das larvas, e não foi capaz de alterar significativamente os índices médios de saúde, nem seus parâmetros de saúde. Entretanto, parece haver uma proteção no primeiro dia de infecção, onde o controle pontua 3,9, e as larvas tratadas com D-RR pontuam 5,6. Além disso, as larvas que permaneceram vivas no primeiro dia apresentaram uma motilidade maior em relação ao controle. Esses índices de saúde declinam de acordo com os dias, entretanto, esses resultados não descartam o potencial terapêutico de D-RR *in vivo*, uma vez que o fluconazol, medicamento de referência na prática clínica e sensível para a cepa de *C. tropicalis* também não apresentou eficácia significativa, evitando a morte de apenas 21% das larvas durante o tratamento. Podemos sugerir que essa eficácia reduzida está relacionada com a virulência da própria cepa, e do inóculo de *C. tropicalis* com concentração elevada que causa a morte de todas as larvas (DL100), que supostamente necessitaria de uma concentração mais alta de D-RR ou um número maior de aplicações para contornar a mortalidade causada pela infecção.

Nossos resultados de microscopia eletrônica de transmissão mostram que o tratamento com D-RR causou alterações morfológicas nas células das leveduras nos tecidos de *G. mellonella*, causando vacuolização e deformação nas células. Esses resultados apoiam um trabalho anterior, que mostrou que quando tratada com D-RR, *C. tropicalis* apresentava aspecto granular e/ou vacuolizado, enquanto esta alteração morfológica não foi detectada nas células controle (LUCAS *et al.*, 2023).

Finalmente, os resultados deste estudo mostram que *G. mellonella* é um modelo efetivo para o estudo da virulência fúngica, teste de toxicidade e do estudo da eficácia de compostos com propriedades antimicrobianas. A concentração de D-RR empregada no estudo de eficácia não mostrou efetividade para contornar uma infecção fúngica sistema no modelo *G. mellonella-Candida* spp, mas os resultados

podem contribuir para a determinação desta concentração futuramente com o objetivo de empregar este peptídeo sintético como nova alternativa diante aos antifúngicos convencionais.

## 6. CONCLUSÕES

As análises realizadas ao longo do desenvolvimento deste trabalho nos permite concluir que:

- O peptídeo sintético D-RR apresentou atividade antimicrobiana reduzida frente a uma cepa clínica de *Candida tropicalis* ATCC 750;
- A dose fúngica letal da cepa de *Candida tropicalis* ATCC 750 foi de  $10^6$  células/mL e levou a morte de todas as larvas no sexto dia após a inoculação;
- D-RR apresentou boa atividade em inibir a dose fúngica letal *in vitro* em baixas concentrações;
- A inoculação com a dose fúngica letal leva a formação de pseu-hifas e pico na concentração de unidades formadora de colônia (UFC) na hemolinfa de *G. mellonella* após 24 h;
- A inoculação com a dose fúngica letal inviabiliza o sistema imune de *G. mellonella* levando a uma diminuição significativa no número de hemócitos;
- D-RR não se mostrou tóxico no modelo *in vivo*, mantendo o índice de saúde a concentração de hemócitos das larvas semelhante ao encontrado no controle inoculado com IPS;
- D-RR causou alterações morfológicas como a vacuolização de *C. tropicalis* no tecido de *G. mellonella*;
- A concentração de D-RR utilizada para o estudo de sua atividade *in vivo*, correspondendo a 32  $\mu$ M, não resgatou *G. mellonella* da morte causada pela dose fúngica letal, nem melhorou significativamente seu índice de saúde;
- A comparação de tratamentos utilizando o fluconazol nas concentrações de 32  $\mu$ M não resgatou *G. mellonella* da morte causada pela dose fúngica letal, nem melhorou significativamente seu índice de saúde.

## 7. REFERÊNCIAS

- ADMELLA, J., TORRENTS, E. Investigating bacterial infections in *Galleria mellonella* larvae: Insights into pathogen dissemination and behavior. **J Invertebr Pathol.**, v. 200, 2023. Doi: 10.1016/j.jip.2023.107975.
- ALLEGRA, E., TITBALL, R. W., CARTER, J., CHAMPION, O. L. *Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals. **Chemosphere**, v. 198, p. 469-472, 2018. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.01.175.
- ALMEIDA, J. N. *et al.* Emergence of *Candida auris* in Brazil in a COVID-19 **Intensive Care Unit. J Fungi (Basel)**, v. 17, n. 7, p. 203-220, 2021. Doi: 10.3390/jof7030220.
- ARSENE, M., VIKTOROVNA, P., DAVARES, A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) as an eco-friendly in vivo approach for the assessment of the acute toxicity of medicinal plants: Application to some plants from Cameroon. **Open Vet J.**, v. 11, n. 6, 2021. Doi: 10.5455/OVJ.2021.v11.i4.15.
- ASAI, M. *et al.* *Galleria mellonella*-intracellular bacteria pathogen infection models: the ins and outs. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 47, n. 2, 2023. Doi: 10.1093/femsre/fuad011.
- BAKARE, O. *et al.* Plant antimicrobial peptides (PAMPs): features, applications, production, expression, and challenges. **Molecules**, vol. 27, n. 12, p. 3703, Jun 2022. Doi: 10.3390/molecules27123703.
- BANERJEE, S., DENNING, D. W., CHAKRABARTI, A. One health aspects & priority roadmap for fungal diseases: A mini-review. **Indian J Med Res.**, v. 153, n. 3, p. 311-319, 2021. Doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_768\_21.
- BARANTSEVICH, N., BARANTSEVICH, E. Diagnosis and treatment of invasive candidiasis. **Antibiotics (Basel)**, v. 11, n. 6, p. 718, 2022. Doi: 10.3390/antibiotics11060718.
- BERGIN, D, BRENNAN, M, KAVANAGH, K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*, **Microbes Infect**, v. 5, p. 1389-1395, 2003
- BERGIN *et al.* Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 8, p. 2105-2112, 2006.
- BLEHERT, D. S., *et al.* Bat white-nose syndrome: an emerging fungal pathogen? **Science**,

- v. 329, p. 5911-6227, 2009. doi: 10.1126/science.1163874.
- BOPARAI, J. K., SHARMA, P. K. Mini review on antimicrobial peptides, sources, mechanism and recent applications. **Protein Pept Lett.**, vol. 27, n. 1, p. 4- 16, 2020. Doi: 10.2174/0929866526666190822165812.
- BUDA DE CESARE, G., CRISTY, S. A., GARSIN, D. A., LORENZ, M. C. Antimicrobial peptides: a new frontier in antifungal therapy. **mBio.**, vol. 11, n. 6, Nov 2020. Doi: 10.1128/mBio.02123-20.
- CARVALHO, A. *et al.* Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 137-46, 2001.
- CASADEVALL, A. Climate change brings the specter of new infectious diseases. **J Clin Invest.**, v. 130, n. 2, p. 553-555, 2020. doi: 10.1172/JCI135003.
- CZAJKA, K. M. *et al.* Molecular mechanisms associated with antifungal resistance in pathogenic *Candida* species. **Cells**, v. 12, n. 22, p. 2655, 2023. Doi: 10.3390/cells12222655.
- CURTIS, A., BINDER, U, KAVANAGH, K. *Galleria mellonella* larvae as a model for investigating fungal-host interactions. **Front Fungal Biol.**, v, 26, n. 3, 2022. doi: 10.3389/ffunb.2022.893494. PMID: 37746216; PMCID: PMC10512315.
- DA SILVA, P. M. *et al.* PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Int. J. Biol. Macromol**, v. 108, p. 391-400, 2018. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.039.
- DAVID, W., MATTHEW, K., JACK, D., RIINA, R. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. **Infectious Diseases**, vol. 18, n. 11, p. 339-347, Nov 2018. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30103-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30103-8)
- DEL RIO, G., TREJO, M. A., BRIZUELA, C. A. Antimicrobial peptides with cell- penetrating activity as prophylactic and treatment drugs. **Biosci Rep.**, vol. 42, n. 9, Sep 2022. Doi: 10.1042/BSR20221789.
- D'ENFERT, C. *et al.* The impact of the fungus-host-microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. **FEMS Microbiol Rev**, vol. 45, n. 3, May 2021. Doi: 10.1093/femsre/fuaa060.
- DE VALLAVIEILLE *et al.* Thermal generalist behaviour of invasive *Puccinia striiformis f. sp. tritici* strains under current and future climate conditions. **Plan Pathol.**, v. 67, n. 6, p. 1307-1320, 2018.
- DUCAN, V. M. S., O'NEIL, D. A. Commercialization of antifungal peptides. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 156-165, 2013.

- DURIEUX, M. F. *et al.* *Galleria mellonella* as a screening tool to study virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. **Virulence**, vol. 12, n. 1, p. 818-34, Dec 2021. Doi: 10.1080/21505594.2021.1893945.
- EL HADDAD, L. *et al.* Genomic and Functional Characterization of Vancomycin- Resistant Enterococci-Specific Bacteriophages in the *Galleria mellonella* Wax Moth Larvae Model. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 8, 2022. Doi: 10.3390/pharmaceutics14081591.
- FERNÁNDEZ, A. *et al.* Peptides derived from the  $\alpha$ -core and  $\gamma$ -core regions of a putative *Silybum marianum* flower defensin show antifungal activity against *Fusarium graminearum*. **Front Microbiol**, v. 17, n. 12, 2021. Doi: 10.3389/fmicb.2021.632008.
- FIRACATIVE, C. *et al.* Rearing and maintenance of *Galleria mellonella* and its application to study fungal virulence. **Journal of Fungi**, vol. 6, n. 3, p. 130, 2020. Doi: 10.3390/jof6030130
- FISHER, M. C. *et al.* Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 18, p. 739-742, 2018. Doi: 10.1126/science.aap7999..
- FRIEDMAN, D., SCHWARTZ, I. S. Emerging fungal infections: new patients, new patterns, and new pathogens. **J Fungi (Basel)**, vol. 5, n. 3, p. 67, Jul 2019. Doi: 10.3390/jof5030067.
- GAFFKE, A. M, SHAPIRO-ILAN, D., ALBORN, H. T. Deadly scents: Exposure to plant volatiles increases mortality of entomopathogenic nematodes during infection. **Front Physiol.**, v. 14, n. 13, 2022. Doi: 10.3389/fphys.2022.978359.
- GAMES, P. D. *et al.* Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Peptides**, v. 29, p. 2090-2100, 2008. doi: 10.1016/j.peptides.2008.08.008.
- GARCIA-BUSTOS, V. *et al.* Climate change, animals, and *Candida auris*: insights into the ecological niche of a new species from a One Health approach. **Clin Microbiol Infect.**, v. 29, n. 7, p. 858-862, 2023. Doi: 10.1016/j.cmi.2023.03.016.
- GÓMEZ-GAVIRIA, M, RAMÍREZ, S. U., MORA, M. H. M. Non-albicans *Candida* species: Immune response, evasion mechanisms, and new plant-derived alternative therapies. **J Fungi (Basel)**, v. 9, n. 1, p. 11, 2022. Doi: 10.3390/jof9010011.
- GONG, Y. *et al.* Releasable and traceless PEGylation of arginine-rich antimicrobial peptides. **Chem Sci.**, v. 8, n. 5, p. 4082-4086, 2017. Doi: 10.1039/c7sc00770a
- GUEVARA-LORA, I. *et al.* Plant-derived substances in the fight against infections caused by *Candida* species. **Int. J. Mol. Sci**, v. 21, p. 6131, 2020. doi:

10.3390/ijms21176131.

- GUINA, T. *et al.* A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 4077-4086, 2000.
- HAFEEZ, A., JIANG, X., BERGEN, P. J., ZHU, Y. Antimicrobial peptides: an update on classifications and databases. **Int J Mol Sci.**, vol. 22, n. 21, p. 11691, Oct 2021. Doi: 10.3390/ijms222111691.
- HAWKINS, H. J. *et al.* Mycorrhizal mycelium as a global carbon pool. **Curr Biol.**, v. 33, n. 11, p. 560-573, 2023. doi: 10.1016/j.cub.2023.02.027.
- ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biol Res.**, vol. 52, n. 1, p. 39, 2019. Doi: 10.1186/s40659-019-0246-3.
- ISHAQ, N., BILAL, M., IQBAL, H. Medicinal potentialities of plant defensins: A review with applied perspectives. **Medicines (Basel)**, vol. 6, n. 1, p. 29, Feb 2019. Doi: 10.3390/medicines6010029.
- IZQUIERDO-BARBA, *et al.* Incorporation of antimicrobial compounds in mesoporous silica film monolith. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5729-5736, 2009.
- JACOBS, S. E., ZAGALLOTIS, P., WALSH, T. J. Novel antifungal agents in clinical trials. **F1000 Res.**, vol. 10, n. 2, p. 507, Jan 2022. Doi: 10.12688/f1000research.28327.2.
- JEMEL, S. *et al.* *Galleria mellonella* for the evaluation of antifungal efficacy against medically important fungi, a narrative review. **Microorganisms**, vol. 8, n. 3, p. 390, Mar 2020. Doi: 10.3390/microorganisms8030390.
- KASKATEPE, B. *et al.* Antifungal and anti-virulent activity of *Origanum majorana* L. essential oil on *Candida albicans* and in vivo toxicity in the *Galleria mellonella* larval model. **Molecules**, v. 27, n. 3, 2022. Doi: 10.3390/molecules27030663.
- KAVANAGH, K., REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for in vivopathogenicity testing of microbial pathogens, **FEMS Microbiol Rev**, v. 28, p. 101-112, 2004.
- KAVANAGH, K., SHEEHAN, G. The use of *Galleria mellonella* larvae to identify novel antimicrobial agents against fungal species of medical interest. **J Fungi (Basel)**, vol. 4, n 3, p.113, Sep 2018. Doi: 10.3390/jof4030113.
- KENNY, R. G., MARMION, C. J. Toward multi-targeted platinum and ruthenium drugs-A new paradigm in Cancer drug treatment regimens? **Chem Rev.**, vol. 119, n. 2, p. 1058-1137, Jan 2019. Doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00271.
- KOVALEVA, V., BUKHTEEVA, I., KIT, O. Y., NESMELOVA, I. V. Plant defensins from a structural perspective. **Int J Mol Sci.**, vol. 21, n. 15, p. 5307, Jul 2020. Doi:

10.3390/ijms21155307.

- KUMAR, P., KIZHAKKEDATHU, J. N., STRAUS, S. K. Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*. **Biomolecules**, v. 8, n. 1, 2018. Doi: 10.3390/biom8010004.
- LOH, J. M., ADENWALLA, N., WILES, S., PROFT, T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. **Virulence**, v. 4, p. 419- 428, 2013.
- LI, X. *et al.* Antimicrobial mechanisms and clinical application prospects of antimicrobial peptides. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 2675, 2022. Doi: 10.3390/molecules27092675.
- LI, Y. *et al.* Efficacy in *Galleria mellonella* larvae and application potential assessment of a new bacteriophage BUCT700 extensively lyse *Stenotrophomonas maltophilia*. **Microbiol Spectr.**, v. 11, n. 1, 2023. Doi: 10.1128/spectrum.04030-22.
- LIMA, P. G. *et al.* Synthetic antimicrobial peptides: Characteristics, design, and potential as alternative molecules to overcome microbial resistance. **Life Sci.**, v. 1, n. 278, p. 119-647, 2021. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119647.
- LUCAS, D. R. *et al.* Bioinspired peptides induce different cell death mechanisms against opportunistic yeasts. **Probiotics Antimicrob Proteins**, v. 20, p. 1-24, 2023. Doi: 10.1007/s12602-023-10064-8.
- LUO, Y., SONG, Y. Mechanism of antimicrobial peptides: Antimicrobial, anti- inflammatory and antibiofilm activities. **Int J Mol Sci.**, vol. 22, n. 21, p. 311-401, 2021. Doi: 10.3390/ijms222111401.
- MAGAN, N., MEDINA, A., ALDRED, D. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre-and postharvest. **Plant Pathol.**, v. 60, n. 1, p. 150-163, 2011.
- MAGANA, M. *et al.* The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. **Lancet Infect. Dis.**, v. 20, n. 9, p. 216–230, 2020. DOI: 10.1016/S1473- 3099(20)30327-3
- MAGUIRE, R., KUNC, M., HYRSL, P., KAVANAGH, K. Caffeine administration alters the behaviour and development of *Galleria mellonella* larvae. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 64, 37–44, 2017. Doi: 10.1016/j.ntt.2017.10.002
- MAHLAPUU, M. *et al.* Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 27, n. 6, p. 194, 2016. Doi: 10.3389/fcimb.2016.00194
- MALINOVSKÁ, Z., ČONKOVÁ, E., VÁCZI, P. Biofilm formation in medically important *Candida* species. **J Fungi (Basel)**, v. 9, n. 10, p. 955, 2023. Doi: 10.3390/jof9100955.
- MANOHAR, P., NACHIMUTHU, R., LOPES, B. S. The therapeutic potential of



- bacteriophages targeting gram-negative bacteria using *Galleria mellonella* infection model. **BMC Microbiol.**, v. 18, n. 1, 2018. Doi: 10.1186/s12866-018-1234-4.
- MCCARTY, T. P., WHITE, C. M., PAPPAS, P. G. Candidemia and invasive candidiasis. **Infect Dis Clin North Am.**, v. 35, n. 2, p. 389-413, 2021. Doi: 10.1016/j.idc.2021.03.007.
- MÉNARD, G. *et al.* *Galleria mellonella* as a suitable Model of bacterial infection: Past, present and future. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 22, n. 11, p. 733- 782, 2021. Doi: 10.3389/fcimb.2021.782733.
- MESA-ARANGO, A. C. *et al.* The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. **Med Mycol.**, v. 5, p. 461-72, 213. Doi: 10.3109/13693786.2012.737031.
- MORAVEJ, H. *et al.* Antimicrobial Peptides: Features, action, and their resistance mechanisms in bacteria. **Microb Drug Resist.**, vol. 24, n. 6, p. 747-746, 2018. Doi: 10.1089/mdr.2017.0392.
- NEGRI, M. *et al.* An in vitro evaluation of *Candida tropicalis* infectivity using human cell monolayers. **Journal of medical microbiology**, v. 60, n. 9, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.031195-0>.
- NNADI, N. E., CARTER, D. A. Climate change and the emergence of fungal pathogens. **PLoS Pathog.**, v. 17, n. 4, Apr 2021. Doi: 10.1371/journal.ppat.1009503.
- NOOSIDUM, A. *et al.* Characterization of new entomopathogenic nematodes from Thailand: Foraging behavior and virulence to the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). **J Nematol.**, v. 42, n. 4, p. 281-291, 2010. PMID: 22736860; PMCID: PMC3380524.
- OH, M., HEYL, J., BABU, B. A. *Candida auris* in the age of resistance. **Cureus.**, v. 9, n. 12, Sep 2020. Doi: 10.7759/cureus.10334.
- O'KANE, C. J., WEILD, R., HYLAND E. Chromatin structure and drug resistance in *Candida* spp. **J Fungi (Basel)**, vol. 6, n. 3, p. 121, Jul 2020. Doi: 10.3390/jof6030121.
- ONO, M., HAYAKAWA, Y., YOSHIGA, T. Bacterial feeding nematodes ingest haemocytes in the haemocoel of the insect *Galleria mellonella*. **Parasitology**, v. 147, n. 3, p. 279-286, 2020. Doi: 10.1017/S0031182019001550.
- PARISI, K. *et al.* Screening the *Saccharomyces cerevisiae* nonessential gene deletion library reveals diverse mechanisms of action for antifungal plant defensins.

- Antimicrob Agents Chemother.**, v. 63, n. 11, p. 1097-2019, 2019. Doi: 10.1128/AAC.01097-19
- PARISI, K. *et al.* The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 88, p. 107– 118, 2019.
- PARTHASARATHY, A. *et al.* Amino acid-derived defense metabolites from plants: A potential source to facilitate novel antimicrobial development. **J Biol Chem.**, vol. 296, Jan-Jun 2021. Doi: 10.1016/j.jbc.2021.100438.
- PATRIOTA, L. *et al.* A trypsin inhibitor from *Tecoma stans* leaves inhibits growth and promotes ATP depletion and lipid peroxidation in *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Front. Microbiol.**, v. 7, p. 611, 2016. Doi: 10.3389/fmicb.2016.00611.
- PIATEK, M., SHEEHAN, G., KAVANAGH, K. Utilising *Galleria mellonella* larvae for studying in vivo activity of conventional and novel antimicrobial agents. **Pathog Dis.**, v. 78, n. 8, 2020. Doi: 10.1093/femspd/ftaa059. PMID: 33016311.
- PIATEK, M., SHEEHAN, G., KAVANAGH, K. *Galleria mellonella*: The versatile host for drug discovery, *in vivo* toxicity Testing and characterising host- pathogen interactions. **Antibiotics (Basel)**, v. 10, n. 12, 2021. Doi: 10.3390/antibiotics10121545.
- PIOTROWSKA, U. *et al.* A novel delivery system for the controlled release of antimicrobial peptides: Citropin 1.1 and temporin A. **Polymers (Basel)**, v. 10, n. 5, p. 489, 2018. Doi: 10.3390/polym10050489.
- PRIYASHANTHA, A. *et al.* Plant-fungi interactions: Where it goes? **Biology (Basel)**, v. 12, n 6, p. 809, Jun 2023. Doi: 10.3390/biology12060809. PMID: 37372094; PMCID: PMC10295453.
- QI, S., GAO, B., ZHU, S. A fungal defensin inhibiting bacterial cell-wall biosynthesis with non-hemolysis and serum stability. **J Fungi (Basel)**, v. 8, n. 2, p 174, 2022. Doi: 10.3390/jof8020174.
- REVIE, N. M.; IYER, K. R.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal drug resistance: Evolution, mechanisms and impact. **Curr Opin Microbiol**, vol. 45, p. 70-76, 2018. Doi:10.1016/j.mib.2018.02.005
- RIBEIRO, S. F. *et al.* Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: Antimicrobial activities against pathogenic yeasts. **Toxicon**, v. 50, p. 600-611, 2007. Doi: 10.1016/j.toxicon.2007.05.005.

- ROBERT, V. A., CASADEVALL, A. Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. **J Infect Dis.**, v. 20, n. 10, p. 1623–1626, 2009. doi: 10.1086/644642.
- RODRIGUES, M. L., NOSANCHUK, J. D. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 14, n. 2, Feb 2020. Doi: 10.1371/journal.pntd.0007964.
- ROMERA, D. *et al.* The *Galleria mellonella* infection model as a system to investigate the virulence of *Candida auris* strains. **Pathog Dis.**, v. 78, n. 9, 2020. Doi: 10.1093/femspd/ftaa067. PMID: 33098293.
- ROWAN, R., MORAN, C., MCCANN, M., KAVANAGH K. Use of *Galleria mellonella* larvae to evaluate the in vivo anti-fungal activity of [Ag<sub>2</sub>(mal)(phen)<sub>3</sub>] **BioMetals**, v. 22, p. 461–467, 2009. Doi: 10.1007/s10534-008-9182-3..
- SADEGHI, G. *et al.* Emergence of non-*Candida albicans* species: Epidemiology, phylogeny and fluconazole susceptibility profile. **J Mycol Med.**, v. 28, n. 1, p. 51-58, 2018. doi: 10.1016/j.mycmed.2017.12.008.
- SEAGLE, E. E., WILLIAMS, S. L, CHILLER, T. M. Recent trends in the epidemiology of fungal infections. **Infect Dis Clin North Am.**, v. 35, n. 2, p. 237-260, Jun 2021. doi: 10.1016/j.idc.2021.03.001.
- SERRANO, I. *et al.* The virtuous *Galleria mellonella* model for scientific experimentation. **Antibiotics (Basel)**, v. 12, n. 3, p. 505, 2023. Doi: 10.3390/antibiotics12030505.
- SHAFEE T. M. *et al.* Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 1, p. 663-682, 2017.
- SHER KHAN, R. *et al.* Plant defensins: types, mechanism of action and prospects of genetic engineering for enhanced disease resistance in plants. **3 Biotech.**, v. 9, n. 5, p. 192, 2019. doi: 10.1007/s13205-019-1725-5.
- SHUPING, D. S., ELOFF, J. N. The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: A review. **Afr J Tradit Complement Altern Med.**, v. 14, n. 4, p. 120-127, Jun 2017. Doi: 10.21010/ajtcam.v14i4.14.
- SINGKUM, P. *et al.* A powerful *in vivo* alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, p. 1217-8950, 2018. Doi: 10.1556/030.66.2019.001.
- SINGULANI, J. L. *et al.* Antifungal activity, toxicity, and membranolytic action of a mastoparan analog peptide. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 6, n. 9, 2019. Doi: 10.3389/fcimb.2019.00419.
- SILVA, J. T., RUIZ-CAMPS, I., AGUADO, J. M. Evolución de la infección fúngica invasora

- en los últimos 30 años [Invasive fungal infection over the last 30 years]. **Rev Iberoam Micol.**, v. 38, n. 2, p. 47-51, Jun 2021. Doi: 10.1016/j.riam.2021.03.003.
- SILVA, L. *et al.* Virulence of *Candida haemulonii* complex in *Galleria mellonella* and efficacy of classical antifungal drugs: a comparative study with other clinically relevant non-albicans *Candida* species. **FEMS Yeast Research**, v. 18, n. 7, 2018.
- SOUZA, G. S. *et al.* 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**, vol. 51, p. 1633–1648, 2019.
- SPALLONE, A., SCHWARTZ, I. S. Emerging fungal infections. **Infect Dis Clin North Am.**, v. 35, n. 2, p. 261-277, Jun 2021. Doi: 10.1016/j.idc.2021.03.014.
- STUMPE, R. *et al.* Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli* **J. Bacteriol.**, v.180, p. 4002, 1998.
- TANNER, L. *et al.*, Citrullination of extracellular histone H3.1 reduces antibacterial activity and exacerbates its proteolytic degradation. **J Cyst Fibros.**, v. 20, n. 2, p. 346-355, 2021. Doi: 10.1016/j.jcf.2020.07.010.
- TAVEIRA G. B. *et al.* Thionin-like peptides from *Capsicum annuum* fruits with high activity against human pathogenic bacteria and yeasts. **Biopolymers**, v. 102, p. 30-39, 2016. doi: 10.1002/bip.22351.
- TOGNI, G. *et al.* Acid proteinase secreted by *Candida tropicalis*: functional analysis of preproregion cleavages in *C. tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology (Reading)**, v. 3, p. 493-503, 1996. doi: 10.1099/13500872-142-3-493.
- TOLEDO, E. B. *et al.* 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  $\gamma$ -cores. **Amino Acids**, vol. 53, n. 2, p. 219-237, 2021. Doi: 10.1007/s00726-020-02929-x.
- TREVIJANO-CONTADOR, N., ZARAGOZA, O. Immune response of *Galleria mellonella* against human fungal pathogens. **J Fungi (Basel)**, v. 5, n. 1, 2018. Doi: 10.3390/jof5010003.
- TSAI, C. J., LOH, J. M., PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v.7, n. 3, p. 214-229, 2016. Doi: 10.1080/21505594.2015.1135289.
- VAN GENT, M. *et al.* Current advances in lipid and polymeric antimicrobial peptide

delivery systems and coatings for the prevention and treatment of bacterial infections.

**Pharmaceutics**, n. 13, v. 11, 2021. Doi: 10.3390/pharmaceutics13111840.

VILA, T., SULTAN, A. S., MONTELONGO, J. D., JABRA-RIZK, M. A. *Candida auris*: a fungus with identity crisis. **Pathog Dis.**, vol. 78, n. 4, Jun 2020. Doi: 10.1093/femspd/ftaa034.

WIEDERHOLD, N. P. Emerging fungal infections: New species, new names, and antifungal resistance. **Clin Chem.**, v. 68, n. 1, p. 83-90, 2021.

**WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

ZAUGG, C. *et al.* Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. **Infect Immun**, v. 69, p. 405–412, 2001.