

ANÁLISE DA EFICÁCIA *in vivo* DE PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO
BIOINSPIRADO NO γ -CORE DA DEFENSINA DA PLANTA *Vigna*
unguiculata EM MODELO DE INFECÇÃO COM *Candida albicans* NO
INSETO *Galleria mellonella*

ALLAN DA SILVA CONCEIÇÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES –RJ
FEVEREIRO - 2025

ANÁLISE DA EFICÁCIA *in vivo* DE PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO
BIOINSPIRADO NO γ -CORE DA DEFENSINA DA PLANTA *Vigna*
unguiculata EM MODELO DE INFECÇÃO COM *Candida albicans* NO
INSETO *Galleria mellonella*

ALLAN DA SILVA CONCEIÇÃO

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

Orientador: Prof. André de Oliveira Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2025

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

C744

Conceição, Allan da Silva.

ANÁLISE DA EFICÁCIA *in vivo* DE PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO BIOINSPIRADO NO γ -CORE DA DEFENSINA DA PLANTA *Vigna unguiculata* EM MODELO DE INFECÇÃO COM *Candida albicans* NO INSETO *Galleria mellonella*. / Allan da Silva Conceição. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2025.

96 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2025.

Orientador: André de Oliveira Carvalho.

1. Peptídeo antimicrobiano. 2. Fungo oportunista. 3. Antifúngico. 4. Candidíase. 5. Toxicidade. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

ANÁLISE DA EFICÁCIA *in vivo* DE PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO BIOINSPIRADO
NO γ -CORE DA DEFENSINA DA PLANTA *Vigna unguiculata* EM MODELO DE
INFECÇÃO COM *Candida albicans* NO INSETO *Galleria mellonella*

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

Aprovada em 11 de fevereiro de 2025,

Comissão Examinadora:

Ana Eliza Zeraik

Prof^a. Ana Eliza Zeraik (Doutora em Física Aplicada: Biomolecular) - UENF

Antônio Jesus Dorighetto Cogo

Prof. Antônio Jesus Dorighetto Cogo (Doutor em Biociências e Biotecnologia) - UENF

Desiely Silva Gusmão Taouil

Prof^a. Desiely Silva Gusmão Taouil (Doutora em Biociências e Biotecnologia) - IFFluminense

Prof. André de Oliveira Carvalho

Prof. André de Oliveira Carvalho (Doutor em Biociências e Biotecnologia) - UENF
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo apoio financeiro;

A UENF e ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, pela estrutura, pelo apoio e pela oportunidade de realizar este curso;

Aos meus pais Emilce e Edson, e ao meu irmão Edson Roger. Pelo amor incondicional, apoio emocional e por fazerem, eternamente, parte de tudo que sou;

Aos meus amigos de vida, familiares, colegas do laboratório, professores e técnicos, por todo auxílio e boas conversas;

À Deus que sempre guia meus passos;

Por fim, meu agradecimento ao Prof. André, que me recebeu em seu grupo com os braços abertos. Confiando seu tempo, inteligência e dedicação ao meu trabalho, sempre demonstrando carinho e desprendimento. Agradecerei sempre por ser um orientador, no sentido real da palavra, de minha jornada científica.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Doenças fúngicas: <i>Candida albicans</i> e seus impactos na saúde global e nacional	17
1.2. Compostos antimicrobianos e resistência a fármacos	21
1.3. Defensinas de plantas: propriedades e bioinspiração para novos compostos ...	28
1.4. Os peptídeos bioinspirados na defensina de <i>Vigna unguiculata</i>	31
1.5. <i>Galleria mellonella</i> como modelo de infecção	33
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVOS	40
3.1. Objetivo geral.....	40
3.2. Objetivos específicos	40
4. METODOLOGIA	41
4.1. Cultivo e armazenamento do material biológico	41
4.2. Determinação da dose letal fúngica de <i>C. albicans</i> para a progressão da infecção e morte das larvas de <i>G. mellonella</i>	41
4.3. Eficácia de WR sobre concentração de 2000 células/mL de <i>C. albicans</i>	43
4.4. Dose letal de WR e FCZ sobre a concentração de <i>C. albicans</i> SC 5314 para efetivação da infecção e morte das larvas de <i>G. mellonella</i>	44
4.5. Avaliação da progressão da carga fúngica nas larvas infectadas	44
4.6. Determinação da concentração de hemócitos na hemolinfa durante a progressão da infecção	46
4.7. Testes de toxicidade e eficácia do tratamento com WR <i>in vivo</i>	46
4.8. Avaliação de parâmetros bioquímicos da hemolinfa larval	47
4.8.1. Dosagem de carboidratos e proteínas totais na hemolinfa larval	47
4.8.2. Perfil proteico da hemolinfa	47
4.8.3. Zimografia	48
4.9. Avaliação de parâmetros morfofisiológicos da larva	49
4.9.1. Microscopia óptica	49
4.9.2. Dissecção das larvas	49
4.10. Análises estatísticas	49
4.11. Tratamento e descarte de rejeitos	50
5. RESULTADOS	51

5.1. Determinação da dose de <i>C. albicans</i> para a progressão da infecção e morte das larvas de <i>G. mellonella</i>	51
5.2. Eficácia de WR sobre concentração de 2000 células/mL de <i>C. albicans</i> SC 5314	53
5.3. Dose letal de WR e FCZ sobre a concentração de <i>C. albicans</i> SC 5314 para efetivação da infecção e morte das larvas de <i>G. mellonella</i>	54
5.4. Avaliação da progressão da carga fúngica e da densidade de hemócitos	56
5.5. Testes de toxicidade e eficácia do tratamento com WR <i>in vivo</i>	58
5.6. Avaliação de parâmetros bioquímicos da hemolinfa larval	62
5.6.1. Dosagem de carboidratos e proteínas da hemolinfa larval	62
5.6.2. Perfil proteico da hemolinfa larval	63
5.7. Avaliação de parâmetros morfofisiológicos	65
5.7.1. Microscopia óptica	65
5.7.2. Dissecção das larvas	66
6. DISCUSSÃO.....	68
7. CONCLUSÕES	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
9. MATERIAL SUPLEMENTAR	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista dos atuais AMPs fúngicos em testes clínicos listados no DRAMP (do inglês *Data Repository of Antimicrobial Peptides*, repositório de dados de AMPs). A *Database* conta com mais de 3000 AMPs dos quais 1837 são antifúngicos, destes foram selecionados apenas o que tinham nos campos “Atividade”/”Uso médico” o termo antifúngico. Os AMPs com atividade e uso médico desconhecidos não foram considerados por essa seleção. Disponível em: <http://dramp.cpu-bioinfor.org/>. Acesso em 21/12/2024 27

Tabela 2: Comparação entre modelos de infecção alternativos (Adaptado de Champion, Titball & Bates, 2018, Lange *et al.*, 2018 e Serrano *et al.*, 2023). Na tabela estão listados alguns dos modelos *in vivo* mais comuns utilizados em diferentes tipos de pesquisa laboratoriais, incluindo modelos de infecção e teste de fármacos. Foi feita uma interseção das informações de fontes diferentes disponíveis. A indicação “n.d.” significa que o parâmetro não foi determinado pelos estudos utilizados 36

Tabela 3: Critérios, pontuações e parâmetros visuais utilizados na determinação do Índice de Saúde (Champion, Titball & Bates, 2018 - tradução nossa; adaptado) ... 42

Tabela 4: Padrão do resultado da análise qualitativa obtida a partir do cultivo em Ágar Cromogênico *Candida*. Informações cedidas pelo fabricante. Disponível em: <https://www.lojaprlabor.com.br/produtos/agar-cromogenico-candida-frasco-500g-kasvi/>, Acesso em: 24/11/2024 45

Tabela 5: Concentrações de WR e morte celular para *C. albicans* SC 5314/ ATCC MYA-2876. *Os cálculos foram feitos a partir da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). O desvio padrão está representado para cada tratamento que foi feito em triplicata (n=9). (a) Valores que não são significativos entre si (One-way ANOVA Turkey test) ($P < 0,0001$) 53

Tabela S1: Valores médios de IS para a categoria “Resposta ao toque” a cada 24 h para cada uma das concentrações testadas. Significância de: (a) $p < 0,0001$ e (ns) não significativos entre si, Two-way ANOVA teste de Turkey 89

Tabela S2: Valores médios de IS para a categoria “Melanização” a cada 24 h para cada uma das concentrações testadas. Significância de: (a) $p < 0,0001$, (ns) não significativos entre si, Two-way ANOVA teste de Turkey 89

Tabela S3: Valores médios de IS para a categoria “Casulo” a cada 24 h para cada uma das concentrações testadas. Significância de: (a) $p < 0,01$, (b) $p < 0,1$ e (ns) não significativos entre si, Two-way ANOVA teste de Turkey 90

Tabela S4: Valores médios de IS para a categoria “Sobrevivência” a cada 24 h para cada uma das concentrações testadas. Significância de: (a) $p < 0,0001$, (b) $p < 0,01$ (c) $p < 0,1$ e (ns) não significativos entre si, Two-way ANOVA teste de Turkey 90

Tabela S5: Valores médios de IS total a cada 24 h para cada uma das concentrações testadas. Significância de: (a) $p < 0,0001$, (b) $p < 0,01$ (c) $p < 0,1$ e (ns) não significativos entre si, Two-way ANOVA teste de Turkey 90

Tabela S6: Valores médios de IS para a categoria “Resposta ao toque” a cada 24 h para cada um dos tratamentos. As letras representam a significância de: (a) não significativo quando comparado ao tratamento com PBS; (b) $p < 0,0001$ em relação ao inoculado com *C. albicans*; (c) não significativo em relação ao inoculado com *C. albicans*; (d) $p < 0,001$ em relação ao tratamento *C. albicans* + WR e (e) $p < 0,01$ em relação ao tratamento *C. albicans* + WR, segundo o Two-way ANOVA teste de Turkey 90

Tabela S7: Valores médios de IS para a categoria “Melanização” a cada 24 h para cada um dos tratamentos. As letras representam a significância de: (a) não significativo quando comparado ao tratamento com PBS; (b) $p < 0,0001$ em relação ao inoculado com *C. albicans*; (c) não significativo em relação ao inoculado com *C. albicans*; (d) $p < 0,001$ em relação ao tratamento *C. albicans* + WR e (e) $p < 0,01$ em relação ao tratamento *C. albicans* + WR, segundo o Two-way ANOVA teste de Turkey 91

Tabela S8: Valores médios de IS para a categoria “Casulo” a cada 24 h para cada um dos tratamentos. As letras representam a significância de: (a) não significativo quando comparado ao tratamento com PBS; (b) $p < 0,0001$ em relação ao inoculado com *C. albicans*; (c) não significativo em relação ao inoculado com *C. albicans*; (d) $p < 0,001$ em relação ao tratamento *C. albicans* + WR e (e) $p < 0,01$ em relação ao tratamento *C. albicans* + WR, segundo o Two-way ANOVA teste de Turkey 91

Tabela S9: Valores médios de IS para a categoria “Sobrevivência” a cada 24 h para cada um dos tratamentos. As letras representam a significância de: (a) não significativo quando comparado ao tratamento com PBS; (b) $p < 0,0001$ em relação ao inoculado com *C. albicans*; (c) não significativo em relação ao inoculado com *C. albicans*; (d) $p < 0,001$ em relação ao tratamento *C. albicans* + WR e (e) $p < 0,01$ em relação ao tratamento *C. albicans* + WR, segundo o Two-way ANOVA teste de Turkey 91

Tabela S10: Valores médios de IS total a cada 24 h para cada um dos tratamentos. As letras representam a significância de: (a) não significativo quando comparado ao tratamento com PBS; (b) $p < 0,0001$ em relação ao inoculado com *C. albicans*; (c) não significativo em relação ao inoculado com *C. albicans* e (d) $p < 0,001$ em relação ao tratamento *C. albicans* + WR, segundo o Two-way ANOVA teste de Turkey 92

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Incidência anual estimada de infecções fúngicas com risco de morte associadas a doenças pulmonares crônicas (adaptado de Denning, 2024). SIDA, Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida 17
- Figura 2:** Mortalidade mundial bruta estimada para doenças fúngicas severas (adaptado de Denning, 2024). SIDA, Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida 18
- Figura 3:** Linha do tempo ilustrativa mostrando alguns dos avanços e desafios no tratamento das infecções fúngicas mais comuns. Do lado esquerdo estão representados diferentes medicamentos: em laranja está a classe de polienos, em azul as pirimidinas, em verde os azóis e em amarelo as equinocandinas, e seu momento de introdução clínica. À direita alguns dos principais eventos associados ao seu desenvolvimento e ao surgimento de resistência (adaptado de Cardoso *et al.*, 2020; Kaur *et al.*, 2023; Miller, 2018) 23
- Figura 4:** Mecanismos de resistência intrínseca e adquirida presentes em *Candida spp.* (Tscherner *et al.*, 2011, adaptado) 25
- Figura 5:** Esquema de interação entre AMPs e membranas celulares, mostrando a possível mudança na estrutura secundária desses peptídeos (Chen *et al.*, 2023, adaptado) 28
- Figura 6:** Representação das estruturas primárias e terciárias de algumas defensinas encontradas em plantas, bem como seus elementos estruturais. (A) Estrutura primária de algumas defensinas: tabaco (*Nicotiana glauca*) NaD1, arroz (*Oryza sativa*) OsAFP1, milho (*Zea mays*) ZmD32, ervilha (*Pisum sativum*) PsD1, dália (*Dahlia pinnatifida*) DmAMP1, rabanete (*Raphanus sativus*) RsAFP2 e *Pisum sativum* Ppdef1. Em preto estão destacados os resíduos de cisteína, os aminoácidos básicos em azul, aminoácidos ácidos em vermelho, as glicinas conservadas em laranja e as caixas vermelhas os Csq β presentes nas estruturas. Os asteriscos representam os aminoácidos que são idênticos (Manzanares *et al.*, 2024). (B) Estrutura terciária da NaD1. As regiões em azul indicam as folhas- β , em vermelho a α -hélice e amarelo as pontes de dissulfeto (Parisi *et al.*, 2019). (C) Estrutura terciária de uma defensina de planta. A região em rosa destaca o γ -core, β 1, 2 e 3 indicam as folhas- β 1, 2 e 3, respectivamente e L1 e 2, as voltas 1 e 2, respectivamente (Lacerda *et al.*, 2014). (D) e (E) Representação da organização estrutural de *cis* e *trans*-defensinas, respectivamente (adaptado de Shafee *et al.*, 2016) 30
- Figura 7:** Estrutura primária e modificações de VuDef₁ para a bioinspiração dos peptídeos DD, RR e WR. (A) Estrutura representativa da defensina da planta *Vigna unguiculata* recombinante (VuDef₁), as regiões em azul claro indicam as folhas- β antiparalelas, em vermelho a α -hélice e em azul escuro a região do γ -core (adaptado de Souza *et al.*, 2019 e Toledo *et al.*, 2021). (B) Tabela demonstrativa das estruturas primárias e propriedades físico-químicas. Em cinza escuro está indicada a metionina inicial, em cinza claro os demais resíduos de aminoácidos, em preto os resíduos de interesse, a caixa vermelha indica a posição do γ -core e as setas vermelhas indicam as modificações estruturais para a bioinspiração de WR (Toledo *et al.*, 2021) 32

Figura 8: Imagem representativa do ciclo de vida de <i>G. mellonella</i> que em geral demora de 15 a 18 semanas (adaptado de Parepely <i>et al.</i> , 2023)	34
Figura 9: Anatomias externa e interna da larva de <i>G. mellonella</i> no sexto estágio. Em (A) parte ventral vista em microscópio estereoscópico. (B) microscopia óptica da anatomia do sistema digestivo da larva corada com azul de metileno. (C) representação gráfica da anatomia do inseto. Os órgãos estão indicados como segue: 1- boca, 2- esôfago, 3- papo, 4- intestino glandular, 5- zona de transição, 6- intestino cuticular, 7- reto, 8- ânus, I- ingesta, PM- matriz peritrófica e SV- válvula estomadeu (adaptado de Sanger <i>et al.</i> , 2022)	35
Figura 10: Imagens do vídeo de lapso de tempo representativo do critério “Resposta ao toque”. Os números próximos às larvas representam as notas que cada larva recebe para essa categoria	43
Figura 11: Curvas Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevivência das larvas de <i>Galleria mellonella</i> à <i>C. albicans</i> SC5314/ATCC MYA-2876 ao longo de 144 h (6 dias). Todas as curvas são significativas entre si pelos testes de Gehan-Breslow-Wilcoxon e Mantel-Cox ($P < 0,0001$, 95% CI), exceto entre as curvas $0,5 \times 10^6$ células/larva e $1,0 \times 10^6$ células/larva no teste de Mantel-Cox, $n=24$, PBS foi usado como controle	51
Figura 12: Índice de saúde das larvas de <i>G. mellonella</i> para infecções em diferentes concentrações de <i>C. albicans</i> SC5314/ATCC MYA-2876 ($n=24$). PBS foi usado como controle. Os ISs totais a cada 24 h são significativos em relação ao controle ($p < 0,0001$), bem como entre $0,5 \times 10^6$ e $2,0 \times 10^6$ células/larva ($p < 0,1$), entretanto $0,5 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^6$ células/larva não são significativamente diferentes, de acordo com o Two-way ANOVA teste de Turkey ($p < 0,0001$)	52
Figura 13: Imagens representativas das larvas em diferentes tratamentos durante as 144 h do experimento. A seta laranja indica o aparecimento de pupas	52
Figura 14: Imagens representativas ($n=9$) das placas de Petri após 24 h de incubação a 30 ou 37 °C na ausência (controle) e presença de diferentes concentrações de WR. As UFC de <i>C. albicans</i> SC 5314/ATCC MYA-28764 das respectivas placas estão mostradas embaixo de cada imagem	54
Figura 15: Análise da atividade inibitória nas LD ₉₉ de WR (55,5 µM e 60,0 µM) e da dose recomendada de FCZ (400 mg/kg) para <i>C. albicans</i> SC 5314/ATCC MYA-2876 sobre a DLF ₁₀₀ de <i>C. albicans</i> para <i>G. mellonella</i> ($0,5 \times 10^6$ células/larva). (A) Ensaio de espectrofotometria a 620 nm. O eixo esquerdo mostra a diferença de absorbância no início e fim do tempo de indução de morte celular para o peptídeo WR, o eixo da direita mostra a porcentagem de inibição calculada a partir das médias dos tratados e do controle. (B) Ensaio de viabilidade celular. Os valores acima das barras representam as respectivas porcentagens de inibição. São mostradas as significâncias em relação ao controle, t test ($P < 0,0001$). ns, não significativo. Tempo de incubação de WR foi de 1 h e FCZ de 6 h.....	55
Figura 16: Parâmetros para a definição do padrão de tratamento de <i>G. mellonella</i> com o peptídeo WR. (A) Carga fúngica de larvas infectadas, onde cada ponto representa a carga individual, os valores de 4, 6, 24 e 48 h não são significativos entre si, mas são significativos em relação à 1 h (Ordinary One-way ANOVA Turkey Test, $P < 0,05$). (B) Densidade de hemócitos nas larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com a LD de <i>C. albicans</i> SC 5314/ATCC MYA-2876 em diferentes tempos. Cada ponto representa a	

densidade individual (n=5, para cada tempo) e estão representadas as médias e o SEM. Os desvios-padrão são estatisticamente diferentes (Bartlett test, $P<0,0001$; Brown-Forsythe test, $P=0,0004$). A densidade média no tempo 24 h é estatisticamente significativa em relação a todas as outras (Ordinary One-way ANOVA Turkey Test, $P<0,0001$) 56

Figura 17: Placas representativas dos ensaios de carga fúngica. Placas de Petri da hemolinfa de *G. mellonella* utilizadas para contagem de UFC no ensaio de carga fúngica, plaqueadas em ágar Sabouraud suplementado com ampicilina (50 mg/mL) e cloranfenicol (34 mg/mL). Abaixo as placas de Petri das colônias de *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876 (controle positivo: C+), *C. tropicalis* ATCC 750 (controle negativo: C-) e colônias aleatórias (n=14 para cada tempo de infecção) plaqueadas em ágar cromogênico. Por fim, placa de Petri plaqueada com hemolinfa de *G. mellonella* saudável (n=5), onde é possível distinguir visualmente, pelas características da cultura, três tipos de colônias diferentes..... 57

Figura 18: Curvas Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* em diferentes tratamentos ao longo de 144 h (6 dias). Em (A) ensaio de toxicidade e em (B) o ensaio de eficácia. As curvas para os ensaios com PBS, FCZ, WR e *C. albicans* + WR não são diferentes estatisticamente entre si, mas são em relação às curvas *C. albicans* e *C. albicans* + FCZ. As curvas *C. albicans* e *C. albicans* + FCZ não são diferentes estatisticamente entre si. Por fim, a curva *C. albicans* + WR é estatisticamente significativa tanto em relação à *C. albicans* quanto à *C. albicans* + FCZ ($P<0,001$, testes Gehan-Breslow-Wilcoxon e Mantel-Cox). As setas representam o momento da injeção de PBS, WR ou FCZ, os horários estão indicados em números menores 58

Figura 19: Índice de saúde das larvas de *G. mellonella* para o ensaio de toxicidade. O PBS foi usado como controle. Os ISs totais do fármaco FCZ e do peptídeo WR não são significativos em relação ao controle durante todo o experimento. Entre os resultados de FCZ e WR também não há diferença estatística significativa, de acordo com o Two-way ANOVA teste de Turkey 59

Figura 20: Índice de saúde das larvas de *G. mellonella* para o ensaio de eficácia. O PBS foi usado como controle. Os ISs totais do peptídeo WR são significativos em relação ao controle durante todo o experimento ($p<0,0001$). Já para o fármaco FCZ não há diferença estatística significativa. Entre os resultados de FCZ e WR também há diferença estatística significativa ($p<0,001$), de acordo com o Two-way ANOVA teste Turkey 60

Figura 21: Parâmetros de progressão da infecção fúngica em *G. mellonella* e tratada com o peptídeo WR. (A) Placas de petri representativas para a contagem de UFC e confirmação da presença de *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876 em ágar cromogênico: *C. albicans* SC 5314/ ATCC MYA-2876 (controle positivo: C+), *C. tropicalis* ATCC 750 (controle negativo: C-); (B) Carga fúngica de larvas infectadas os valores não são significativos (ns) entre si (Ordinary One-way ANOVA Turkey Test); (B) Densidade de hemócitos nas larvas de *G. mellonella* infectadas com a DLF₁₀₀ de *C. albicans* com e sem tratamento com WR, os resultados tanto para 24 h são estatisticamente significativos em entre as tratadas com WR e as não tratadas, mas não significativos (ns) em 48 h (Ordinary One-way ANOVA Turkey Test, $P<0,0001$). Foi considerado cada ponto individualmente e os gráficos representam as médias e desvios-padrão (n=5, para cada tempo). O controle é composto por larvas intocadas 61

Figura 22: Avaliação pós-tratamento com WR. (A) Imagens do desenvolvimento larval quatro semanas após o término do ensaio de eficácia do peptídeo WR. (B) Tabela com os parâmetros morfológicos externos das larvas quatro semanas após o término do ensaio de eficácia do peptídeo WR. (*) Semanas após o término do experimento de 144 h. (**) Observações analisadas quatro semanas após o término do ensaio de eficácia do peptídeo WR (n=7) 62

Figura 23: Dosagem de proteínas e carboidratos em larvas após 120 h do início de diferentes tratamentos. (A) Dosagem de proteínas pelo método BCA. Os valores foram calculados a partir de fórmula de regressão linear da curva-padrão com Ovoalbumina ($R^2 \approx 0,99$). (B) Dosagem de glicose na hemolinfa das larvas por reação com DNS. Os valores foram calculados a partir de fórmula de regressão linear da curva-padrão com glicose ($R^2 \approx 0,99$). (*) Valores com significância entre si e (ns) sem significância estatística entre si (One-Way ANOVA teste de Turkey, $p < 0,001$) 63

Figura 24: Análise do perfil proteico por eletroforese em diferentes tratamentos. É possível notar a diferença nos perfis entre os diferentes tratamentos, com algumas proteínas apresentando aumento em relação ao controle intocado (Unt). A banda característica de WR não aparece em nenhum dos tratamentos. (M) Marcador de baixa massa molecular; (Unt.): Hemolinfa de larvas intocadas; (PBS): Hemolinfa de larvas que receberam quatro injeções de PBS em diferentes tempos; (Ca): Hemolinfa de larvas infectadas com *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876 e injetadas com três doses de PBS; (Ca+WR): Hemolinfa de larvas infectadas com *C. albicans* e injetadas com três doses de WR e (WR): apenas o peptídeo WR. Asteriscos verdes indicam as bandas proteicas que tiveram aumento em relação ao controle Unt. e asteriscos vermelhos indicam as bandas proteicas que tiveram diminuição em relação ao controle Unt 64

Figura 25: Zimografia da hemolinfa de *G. mellonella* em diferentes tratamentos. É possível ver a presença de diferentes proteínas com atividade proteolítica em especial uma banda que não está presente nos controles Unt. e aparece no infectado com *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876 (asterisco vermelho) e outra banda que está presente no controle Unt. e não aparece no infectado com *C. albicans* (asterisco verde). (Unt.): Hemolinfa de larvas intocadas e (Ca): Hemolinfa de larvas infectadas com *C. albicans* e injetadas com três doses de PBS. Asteriscos vermelhos indicam as proteases, cuja atividade diminuiu em relação ao controle Unt. e asteriscos verdes indicam as proteases que tiveram atividade aumentaram em relação ao controle Unt 65

Figura 26: Imagens de microscopias da hemolinfa de larvas infectadas com *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876 e infectadas com *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876 e tratadas com a primeira dose de WR (40 mg/kg) após 8 h da infecção. Painéis A-D mostram as visualizações em DIC dos nódulos presentes na hemolinfa bem como hemócitos variados isolados. Já os painéis E-H mostram os mesmos campos no contraste de fluorescência com Calcofluor White, à 495 nm. Setas pretas e brancas indicam os mesmos locais nos diferentes contrastes 66

Figura 27: Dissecção das larvas em diferentes tratamentos. A formação de nódulos é presente em todas as larvas que foram infectadas por *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876, progredindo gradualmente com o passar do tempo. As larvas que recebem o tratamento com WR tiveram diminuição no comprometimento de órgãos internos, quando comparadas aos controles infectados. WR e FCZ não se mostraram tóxicos, se assemelhando visualmente às intocadas e às injetadas com PBS. FCZ não se

mostrou eficaz no controle da infecção. A melanização decorrente da injúria das injeções, indicadas pelas setas, não foram consideradas para fins comparativos 67

Figura S1: Barras de erros das curvas de sobrevivência das concentrações $0,5 \times 10^6$ células/larva $1,0 \times 10^6$ células/larva 89

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMP: Peptídeo antimicrobiano (do inglês *antimicrobial peptides*)
- CDR1: Gene da proteína relacionada à degeneração cerebelar 1 (do inglês *cerebellar degeneration related protein 1*)
- CDR2: Gene da proteína relacionada à degeneração cerebelar 2 (do inglês *cerebellar degeneration related protein 2*)
- CRP: Peptídeos ricos em cisteínas (do inglês *cysteine-rich peptides*)
- Csαβ: elemento estrutural αβ estabilizado por cisteínas (do inglês *cysteine-stabilized α-helix β-sheet motif*)
- DD: Peptídeo A_{36,42,44}V₃₂₋₄₆ V_u-Def
- DIC: Contraste de interferência diferencial (do inglês *differential interference contrast*)
- DLF: Dose letal fúngica
- DmAMP1: Defensina de dália (*Dahlia merckii antifungal peptide one*)
- DRAMP: Repositório de dados de peptídeos antimicrobianos (do inglês *Data Repository of Antimicrobial Peptides*)
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ERG11: Gene da proteína lanosterol 14-α-demetilase 11
- ERG11p: Proteína lanosterol 14-α-demetilase 11
- ERG3: Gene da proteína lanosterol 14-α-demetilase 3
- FCZ: Fluconazol
- FKS1: Subunidade catalítica da 1,3-beta-D-glucan sintase 1
- FKS2: Subunidade catalítica da 1,3-beta-D-glucan sintase 2
- HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*)
- IPS: Salina fisiológica de inseto (do inglês *Insect Physiological Saline*)
- IS: Índice de Saúde
- L-AMB: Anfotericina B lipossomal (do inglês *liposomal Amphotericin B*)
- LD: Dose Letal
- LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos
- MDR1: Proteína de resistência multidrogas (do inglês *Multidrug Resistance Protein1*)
- MS: Ministério da Saúde, brasileiro
- NaD1: Defensina de tabaco (*Nicotiana glauca*)
- OMS: Organização Mundial da Saúde
- OsAFP1: Defensina de arroz (*Oriza sativa antifungal peptide one*)

PBS: Solução Salina Tampão-Fosfato
pH: Potencial hidrogeniônico
Ppdef1: Defensina de *Picramnia pentandra*
PPO: Pró-fenoloxidase (do inglês *Prophenoloxidase*)
PsD1: Defensina de ervilha (*Pisum sativum*)
ROS: Espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*)
RR: Peptídeo A_{36,42,44}R_{37,38}Y₃₂₋₄₆VuDef
RsAFP2: Defensina de rabanete (*Raphanus sativus antifungal peptide two*)
SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SUS: Sistema Único de Saúde, brasileiro
TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano
UENF: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
UFC: Unidade formadora de colônia
UTIs: Unidades de Terapia Intensiva
Vu-Def: Defensina da planta *Vigna unguiculata*.
WR: Peptídeo A_{36,42,44}R_{37,38}W_{36,40}Y₃₂₋₄₆VuDef
ZmD32: Defensina de milho (*Zea mays*)

RESUMO

Infecções fúngicas invasivas, especialmente por *Candida albicans*, representam ameaça crescente à saúde global, particularmente em pacientes imunocomprometidos. Este patógeno foi classificado pela Organização Mundial da Saúde como de alta prioridade devido à sua resistência antifúngica. Portanto, há necessidade urgente do desenvolvimento de novos antifúngicos, dado o aumento da resistência aos antifúngicos clínicos e o número escasso de classes disponíveis. Peptídeos antimicrobianos (AMPs) surgem como alternativa promissora devido à sua ampla atividade, estabilidade, baixas toxicidade e tendência ao desenvolvimento de resistência. O AMP A_{42,44}R_{37,38}W_{36,39}Y₃₂₋₄₆VuDef (WR) foi bioinspirado no γ -core da defensina de *Vigna unguiculata* (L.) Walp., com modificações que aumentaram sua carga positiva e hidrofobicidade, melhorando sua atividade antifúngica. Estudos *in vitro* demonstraram sua eficácia contra *C. albicans* e baixa toxicidade para células mamíferas. O modelo *in vivo* do inseto *Galleria mellonella* apresenta vantagens como baixo custo de manutenção e similaridade da imunidade inata de vertebrados. Este estudo investigou a toxicidade e eficácia do WR no tratamento de infecção no modelo *in vivo* de *C. albicans* em *G. mellonella*. Assim, o estudo padronizou o modelo, a partir de ensaio de infecção, determinando a dose letal de *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876 como 0,5x10⁶ células/larva, permitindo progressão da doença sem mortalidade imediata. A reavaliação da dose letal de WR foi necessária utilizando a cepa clínica SC 5314/ATCC MYA-2876, sendo determinada uma concentração superior (55,5 μ M) à empregada para cepa não-clínica anteriormente (27,5 μ M), diferença que pode ser atribuída aos fatores de virulência da cepa clínica. O tratamento com WR foi testado *in vivo* num esquema de três aplicações de 40 mg/kg ao longo de 72 h, determinadas a partir dos ensaios de sobrevivência, determinação da carga fúngica e número de hemócitos na hemolinfa. WR demonstrou ser seguro, sem toxicidade para as larvas, promovendo um aumento significativo na sobrevivência das larvas infectadas. Ademais, WR melhorou significativamente o Índice de Saúde (IS), reduzindo a melanização – marcador imunológico de infecção – e mantendo IS elevado, mesmo após término do tratamento. Em comparação, o fluconazol, embora não tóxico, apresentou desempenho inferior ao WR, com declínio acentuado do IS após término do tratamento, indicando menor controle da infecção. Resultados corroborados tanto pela microscopia óptica e de fluorescência e dissecação das larvas infectadas na

presença ou ausência do tratamento com WR, indicaram sinais do controle da progressão da infecção. Ainda ressalta-se que, com o acompanhamento de larvas tratadas à longo prazo, o tratamento com WR permite que prossigam no seu ciclo de vida normalmente. Por fim, a quantificação de proteínas e análise por técnicas de eletroforese, revelaram alterações proteicas da hemolinfa das larvas em resposta à infecção e ao tratamento com WR. A presença de proteases, tanto do hospedeiro quanto do patógeno, levantou questões sobre a degradação do WR. Os resultados confirmam a eficácia e segurança do WR como uma potencial terapia antifúngica contra *C. albicans*. No entanto, são necessários estudos para otimizar sua administração e compreender os mecanismos de ação *in vivo* e efeitos das proteases na estabilidade do peptídeo.

ABSTRACT

Invasive fungal infections, particularly those caused by *Candida albicans*, pose an increasing global health threat, especially to immunocompromised patients. The World Health Organization has classified this pathogen as a high-priority microorganism due to its antifungal resistance. Consequently, there is an urgent need for the development of novel antifungal agents, given the rising resistance to clinical antifungals and the limited number of available drug classes. Antimicrobial peptides (AMPs) have emerged as a promising alternative due to their broad-spectrum activity, stability, low toxicity, and reduced tendency to induce resistance. The AMP A_{42,44}R_{37,38}W_{36,39}Y₃₂₋₄₆VuDef (WR) was bioinspired by the γ -core of the *Vigna unguiculata* (L.) Walp. defensin, incorporating modifications that enhanced its positive charge and hydrophobicity, thereby improving its antifungal activity. In vitro studies demonstrated its efficacy against *C. albicans* and low toxicity to mammalian cells. The *Galleria mellonella* insect model offers advantages such as low maintenance cost and innate immunity similarities with vertebrates. This study investigated the toxicity and efficacy of WR in the treatment of *C. albicans* infection in the *G. mellonella* in vivo model. The study established a standardized infection model by determining the lethal dose of *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876 as 0.5×10^6 cells/larva, allowing disease progression without immediate mortality. Reevaluation of WR's lethal dose using the clinical strain SC 5314/ATCC MYA-2876 determined a higher concentration (55.5 μ M) compared to that previously used for a non-clinical strain (27.5 μ M), a difference potentially attributed to the virulence factors of the clinical strain. WR treatment was tested in vivo through a regimen of three applications of 40 mg/kg over 72 hours, based on survival assays, fungal load determination, and hemocyte counts in the hemolymph. WR proved to be safe, exhibiting no toxicity to larvae while significantly increasing the survival rate of infected larvae. Furthermore, WR significantly improved the Health Index (HI), reducing melanization (an immunological infection marker) and maintaining a high HI even after treatment cessation. In comparison, fluconazole, although non-toxic, exhibited inferior performance to WR, with a sharp decline in HI after treatment cessation, indicating poorer infection control. These results are supported by optical and fluorescence microscopy, as well as dissection of infected larvae in the presence or absence of WR treatment, indicated effective infection progression control. Additionally, long-term monitoring of treated larvae showed that WR-treated individuals

continued their life cycle normally. Finally, protein quantification and electrophoresis analysis revealed proteomic alterations in larval hemolymph in response to infection and WR treatment. The presence of proteases from both the host and the pathogen raised questions regarding WR degradation. The findings confirm WR's efficacy and safety as a potential antifungal therapy against *C. albicans*. However, further studies are needed to optimize its administration and elucidate its *in vivo* mechanisms of action, as well as the effects of proteases on peptide stability.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças fúngicas: *Candida albicans* e seus impactos na saúde global e nacional

Estimativas recentes indicam um aumento de doenças fúngicas. Estas matam mais de 3,75 milhões de pessoas e podem afetar mais de 6,5 milhões de pessoas mundialmente (**Figuras 1 e 2**), sendo assim uma preocupação de saúde global emergente. A severidade dessas doenças pode variar de simples infecções mucocutâneas a infecções que oferecem maior risco de morte. Este aumento está associado, entre outros fatores, ao aumento da população suscetível, considerando pacientes imunocomprometidos, como: aqueles com doenças pulmonares crônicas (e.g. asma), COVID-19, influenza, tuberculose, Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida, câncer, diabetes mellitus, pacientes críticos internados em unidades de terapia intensiva (UTIs), aqueles que estão passando por procedimentos médicos invasivos ou recebendo antimicrobianos de amplo espectro e, ainda, aqueles que estão passando por tratamentos com imunossupressores (e.g. transplantados de órgãos sólidos e em corticoterapia). Os idosos também estão incluídos na população suscetível (Denning, 2024; Raut & Huy, 2021). Estima-se que a mortalidade associada a infecções fúngicas é similar à causada por tuberculose e três vezes maior do que a causada por malária (Bongomin *et al.*, 2017; WHO, 2022). Outros fatores como sócio-econômicos e geo-ecológicos (e.g. aquecimento global) também são preponderantes para o aumento da população em risco de contrair essas infecções fúngicas (Nnadi & Carter, 2021).

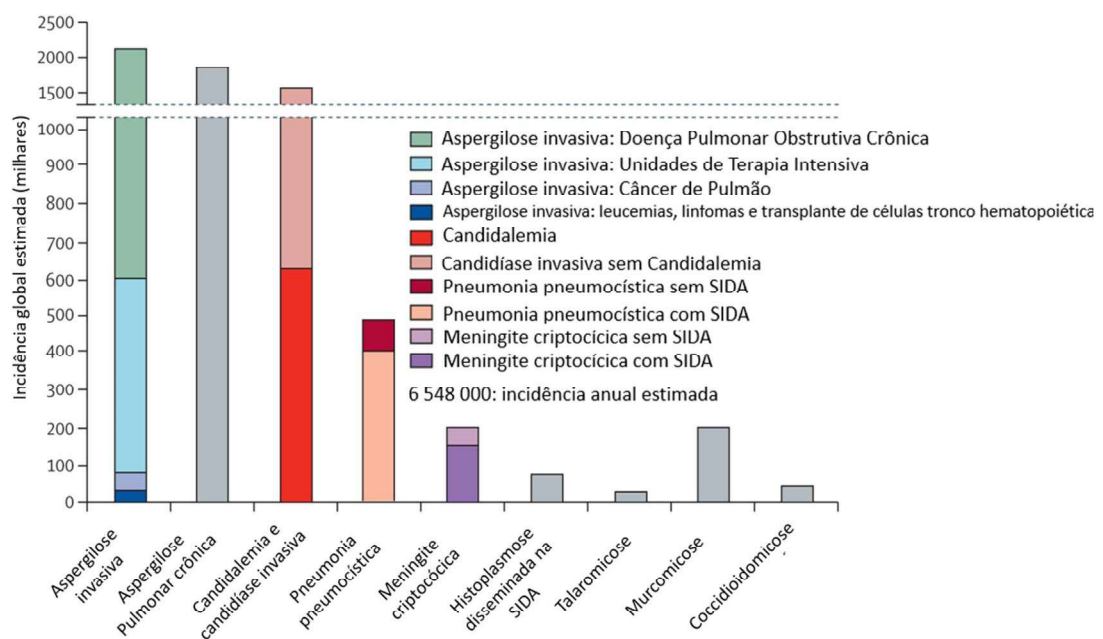


Figura 1: Incidência anual estimada de infecções fúngicas com risco de morte associadas a doenças pulmonares crônicas (adaptado de Denning, 2024). SIDA, Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida.

Dentre os principais agentes patogênicos envolvidos nessas infecções se destacam *Candida spp.* que atingem cerca de 1,5 milhão de pessoas anualmente (**Figuras 1 e 2**). Quando tratadas, as candidíases têm probabilidade de mortalidade de 35%, entretanto quando não há tratamento correto essa probabilidade pode chegar a 90%. A revisão bibliográfica realizada por Denning (2024) aponta que o aumento no número de incidência e morte por *Candida* nos últimos anos pode estar diretamente relacionado aos casos de COVID-19. Dado corroborado por um estudo clínico que analisou a microbiota de pacientes internados com COVID-19 onde eles estavam sendo tratados com antibióticos de largo espectro. Esse estudo classificou *Candida albicans* como biomarcador para a severidade da doença, pois foi encontrada de maneira significativa em pacientes críticos (Buendia *et al.*, 2024).

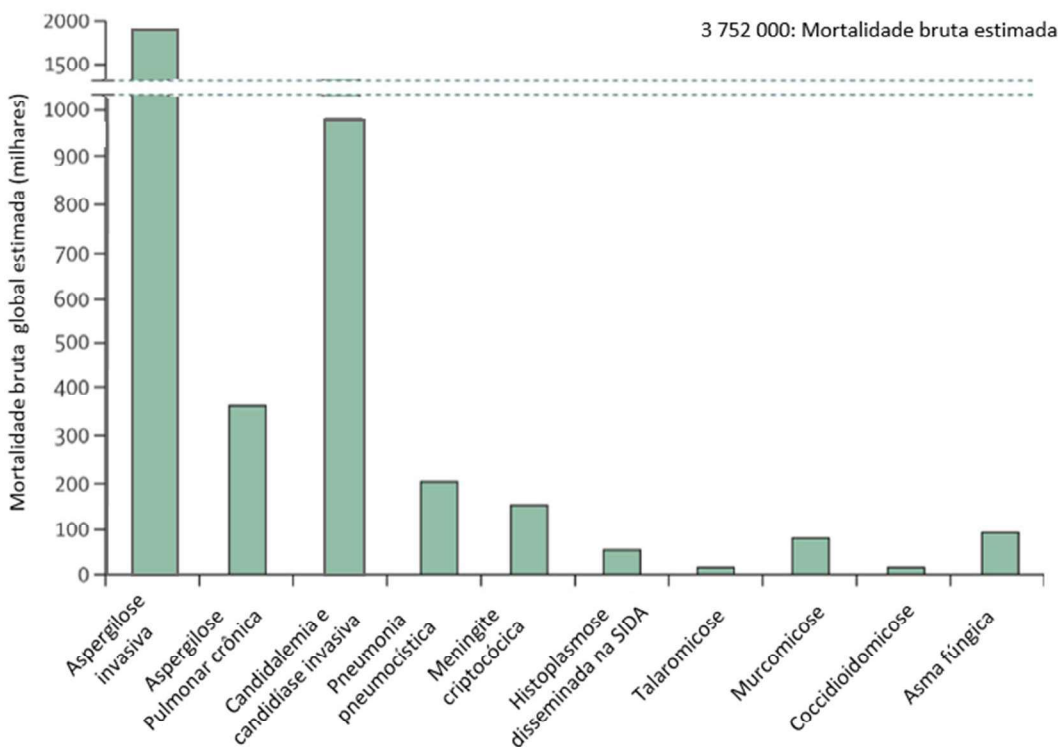


Figura 2: Mortalidade mundial bruta estimada para doenças fúngicas severas (adaptado de Denning, 2024). SIDA, Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida.

A espécie *C. albicans* é comumente a principal espécie de *Candida* associada a infecções hospitalares globalmente, apesar de também haver um aumento preocupante no número daquelas causadas por espécies não-*albicans* como

Nakaseomyces glabrata (previamente identificada como *C. glabrata*), *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Pichia kudriavzevii* (previamente identificada como *C. krusei*) e a emergente *C. auris* (WHO, 2022). *C. albicans* ganha destaque por se apresentar como uma levedura bem distribuída por todo o mundo, fazendo parte da microbiota humana em órgãos como: boca, garganta, intestino, vagina e pele, não produzindo danos à saúde em pessoas saudáveis (Makled *et al.*, 2024; WHO, 2022). Nesse tipo de infecção os números de casos anuais são de ~2.000.000 de candidíase oral, ~1.000.000 de candidíase oroesofageal e cerca de 70% das pessoas já apresentaram episódio de candidíase vulvovaginal, sendo que ~134.000.000 casos são infecções recorrentes (Bongomin *et al.*, 2017).

No entanto, essas infecções podem se espalhar pelas mucosas ou invadir outros tecidos, quadro chamado de candidemia. Essa é a forma mais comum de candidíase invasiva, nela a *C. albicans* pode invadir a corrente sanguínea, coração, sistema nervoso central, olhos e órgãos internos levando a altas taxas de mortalidade, mesmo com o surgimento de novos agentes antifúngicos. Isso se deve principalmente ao uso indiscriminado de compostos antimicrobianos de largo espectro e agentes imunossupressores, aumento da sobrevivência de prematuros, portadores de diabetes, cirurgias recentes, pancreatite, procedimentos abdominais, ventilação mecânica, entre outros (Anderson *et al.*, 2023; Denning, 2024; Makled *et al.*, 2024; WHO, 2022). A incidência de candidíase nosocomial tem aumentado nas últimas décadas representando aproximadamente 750.000 casos de candidíases invasivas (Bongomin *et al.*, 2017), sendo idosos e bebês prematuros os mais suscetíveis a esse tipo de infecção (Anderson *et al.*, 2023; WHO, 2022).

Dessa forma, *C. albicans* foi classificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos patógenos de prioridade crítica, sendo o principal fator adotado nessa classificação a resistência a antifúngicos. Vale-se ressaltar que esse fator, para a OMS, é mais relevante do que outros, a saber: número de mortes, tratamentos baseados em evidências, acesso a diagnósticos, incidência anual e complicações/sequelas (WHO, 2022), representando assim, alta ameaça à saúde humana global.

No contexto nacional, dados coletados por Bongomin *et al.* (2017) mostram que no Brasil foram reportados 28.991 casos de candidemias, uma taxa de 14,9 em cada 100.000 habitantes, o que coloca o país com a segunda maior incidência no ranking dos 39 países pesquisados. Este estudo ainda aponta que dos 43 artigos publicados

com essas estimativas 39 se tratavam de infecções por *Candida*. Dados mais recentes publicados por Denning (2024) mostram que, no Brasil, a taxa de mortalidade de pacientes suscetíveis está em torno de 77,3% dos adultos internados em UTIs. Dados ainda mais alarmantes foram evidenciados em pesquisa realizada em dois períodos distintos (2010-2011 e 2017-2018) com informações retiradas de 616 casos de 11 hospitais e revelam que: apesar do aumento do uso de equinocandinas de 13 para 41%, as taxas de morte não foram afetadas; o tempo de internação até o óbito da maioria dos pacientes em UTIs (>60%) é de 30 dias, para pacientes tratados com antifúngicos a diminuição dessa taxa não ultrapassa os 10%; homens e idosos seguem sendo os mais acometidos; comorbidades como doenças cardiovasculares, pulmonares, câncer sólido e diabetes mellitus são as principais; ~40% das infecções são causadas por *C. albicans*, seguida por *C. parapsilosis* (~21%) e *C. tropicalis* (~18%); o tratamento com fluconazol foi prevalente nos internados em UTIs, ~49%, no período de 2017-18 (Agnelli *et al.*, 2023). Na contramão do exposto, o Ministério da saúde (MS) diz que:

“As micoses sistêmicas não integram a lista nacional de doenças de notificação compulsória no Brasil. Elas também não são objeto de vigilância epidemiológica de rotina, por isso, não existem dados epidemiológicos da ocorrência, magnitude e transcendência da candidíase sistêmica em nível nacional. No Brasil, a taxa de incidência chega a 2,49 casos de candidemia por 1.000 admissões hospitalares, nos hospitais públicos terciários que corresponde a uma taxa de 2 a 15 vezes maior que relatadas em países dos EUA e da Europa” (Ministério da Saúde, [s.d.])

Apontando ainda que o número de profissionais por paciente, o manejo, o diagnóstico precoce e as características locais e patogênicas possam influenciar esse quadro (Ministério da Saúde, [s.d.]). Destacam-se algumas das ações do Ministério da Saúde (MS) - encontradas no site do órgão - para tentar reverter esse processo como webinários (Ministério da Saúde, 2022a), treinamento de profissionais dos laboratórios centrais (Ministério da Saúde, 2022b), novos antifúngicos incorporados (Anidulafungina, Voriconazol e Isavuconazol) ao Sistema Único de Saúde (SUS) (Ministério da Saúde, 2022c) e aumento da verba na compra desses medicamentos (Ministério da Saúde, 2023). No entanto os dados epidemiológicos são de extrema importância para que haja a correta alocação desses recursos e na avaliação das medidas adotadas no combate à candidemia como já relata a literatura, a subnotificação é vista como um dos principais fatores que aumentam a negligência

acerca dessas doenças (Borgomim *et al.*, 2017; Denning, 2022; Denning, 2024; WHO, 2022).

Dessa forma, essa ameaça ainda pouco reconhecida das doenças fúngicas invasivas é resultado da soma dos fatores já mencionados e também da rápida emergência da resistência aos antifúngicos. Essa resistência, leva ainda a terapias e estadias mais prolongadas em hospitais, aumentando também a necessidade do uso de medicamentos mais caros e tóxicos de segunda linha, que geralmente não estão disponíveis em países mais pobres (Denning, 2022; WHO, 2022). O pouco interesse de indústrias farmacêuticas em desenvolver novos medicamentos também faz parte desse cenário, considerando que o processo de pesquisa, produção e marketing desses novos compostos não proporcionam um retorno financeiro satisfatório quando comparado aos medicamentos de uso contínuo (Browne *et al.*, 2020).

Dentre os antifúngicos mais comuns, o fluconazol (FCZ) é o principal utilizado no tratamento e profilaxia destas infecções no mundo, sendo que já há relatos de cepas resistentes. Considerando que as taxas de prevenção em ambientes hospitalares são muito baixas, que não há vacinas disponíveis, que a disponibilidade de tratamentos baseados em evidências ainda é desconhecida e que nem todos os países possuem acesso aos medicamentos adequados ao tratamento, a situação se agrava. Logo, muitas infecções fúngicas ainda continuam não sendo diagnosticadas e tratadas adequadamente, seus agentes etiológicos não são confirmados microbiologicamente e, apesar de uma grande ameaça à saúde humana, elas ainda não recebem atenção e recursos adequados (Borgomim *et al.*, 2017; Kaur *et al.*, 2023; WHO, 2022).

1.2 Compostos antimicrobianos e resistência à fármacos

O início do uso de antibióticos clinicamente, como a penicilina e a sulfonamida na década de 1940, durante a Segunda Guerra Mundial, marcou um momento transformador na história da medicina. Essa era marcou o triunfo sobre as doenças infecciosas, visto que eles as controlavam. No entanto, o uso indiscriminado e descontrolado levou ao surgimento global da resistência aos antibióticos, agora reconhecida como um desafio crítico para a saúde pública. O mau uso e o uso excessivo dos mesmos em contextos humanos, veterinários e agrícolas deram origem a patógenos multirresistentes, um fenômeno conhecido como resistência antimicrobiana, que foi detectado logo após o desenvolvimento dos primeiros

medicamentos. Sendo que a resistência à penicilina surgiu apenas cinco anos após sua estreia clínica em 1942, observada em cepas de *Staphylococcus* em 1947. Da mesma forma, a resistência à estreptomicina surgiu em 1944, e a resistência à vancomicina levou três décadas para se manifestar após sua introdução clínica (Ahmad *et al.*, 2023; Dijksteel *et al.*, 2021).

Já para os antifúngicos, a Nistatina foi o primeiro a ser introduzido em usos clínicos no ano de 1958 (**Figura 3**) sendo largamente utilizado por décadas, apesar de seus pontos negativos como a nefrotoxicidade e baixa solubilidade em água, o que dificulta sua administração. O primeiro antifúngico sistêmico a base de imidazóis foi o Cetoconazol, no início dos anos 80, seguido pelos azóis Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Posaconazol e Isavuconazol, estes últimos vêm substituindo a Anfotericina B nos tratamentos (Ben-Ami & Kontoyiannis, 2021).

A introdução dos azóis foi muito importante já que representam até hoje grande efetividade e baixa toxicidade, com destaque para pacientes imunossuprimidos (**Figura 3**). No entanto, o uso expansivo desses compostos em pacientes com doenças hematológicas foi seguido do rápido surgimento da resistência a essa classe de fármacos principalmente no gênero *Candida*, sendo essa resistência intrínseca ou adquirida (**Figuras 3 e 4**). Algo similar também aconteceu com as equinocandinas nos anos 2000, poucos anos após sua introdução já é possível encontrar registros de cepas resistentes a esses antifúngicos (Ben-Ami & Kontoyiannis, 2021).

Como já mencionado anteriormente, ainda não existem vacinas disponíveis para a prevenção das infecções por *Candida* estando todas em fases de testes clínicos ou pré-clínicos (Kaur *et al.*, 2023). Assim, a prática clínica atual se baseia apenas em cinco classes de antifúngicos sistêmicos (alilaminas, fluoro-pirimidinas, polienos, azóis e equinocandinas), com um número limitado de novas opções em desenvolvimento. Embora esses medicamentos antifúngicos existentes demonstrem eficácia, eles vêm com uma série de efeitos adversos. Além disso, sua administração exige expertise, e as interações medicamentosas são comuns (Gupta *et al.*, 2024; Vanreppelen *et al.*, 2023; WHO, 2022).

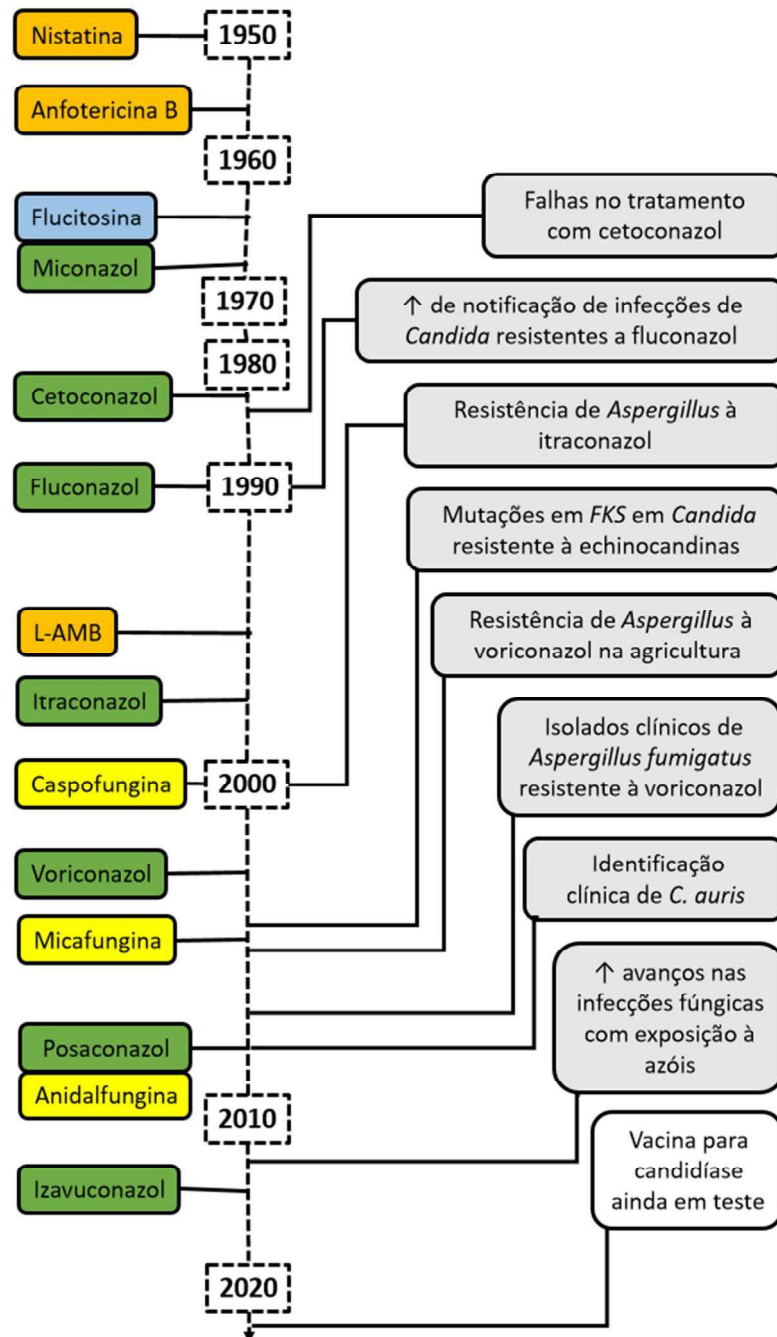


Figura 3: Linha do tempo ilustrativa mostrando alguns dos avanços e desafios no tratamento das infecções fúngicas mais comuns. Do lado esquerdo estão representados diferentes medicamentos: em laranja está a classe de polienos, em azul as pirimidinas, em verde os azóis e em amarelo as equinocandinas, e seu momento de introdução clínica. À direita alguns dos principais eventos associados ao seu desenvolvimento e ao surgimento de resistência (adaptado de Cardoso *et al.*, 2020; Kaur *et al.*, 2023; Miller, 2018).

Dentro das espécies de fungos, incluindo o gênero *Candida*, a resistência pode ser classificada como intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é aquela caracterizada pela sua ocorrência em todas ou quase todas as cepas representativas da espécie e é independente de pressão por antifúngicos. Exemplos de resistência intrínseca podem ser vistos nos tratamentos de *P. kudriavzevii* com Fluconazol, *N. glabrata* com azóis e *C. parapsilosis* com equinocandinas (**Figura 3**).

Já a resistência adquirida ocorre pela pressão de antifúngicos, durante o tratamento de pacientes ou exposição ambiental aos fármacos (**Figura 4**). A resistência adquirida aos polienos (como a Anfotericina B), apesar de mais de 50 anos de uso clínico, ainda não tem seus fatores completamente elucidados. Podendo estar relacionada à diminuição ou falta de ergosterol na membrana plasmática, o que pode ser devido a alterações no gene *ERG3*. Para os azóis, principal medicamento utilizado em pacientes de UTIs é o Fluconazol, a resistência ao fármaco tem sido descrita desde o início de seu uso clínico nos anos 90, estando relacionada principalmente a alterações no gene alvo *ERG11*, regulador da produção de ERG11p, importante para a síntese de ergosterol. Também foram descritos os mecanismos de efluxo por transportadores-multidrogas (*upregulation* dos genes *CDR1*, *CDR2* e *MDR1*) e da diminuição da afinidade e alterações nas vias biossintéticas de ergosterol. Já a resistência adquirida às equinocandinas, como a caspofungina, ainda não está completamente elucidada, mas possivelmente está ligada a mutações em duas regiões reguladoras *FKS1* e *FKS2*, que regulam uma glucano-sintase, importante na produção da parede celular (**Figura 4**), esse mecanismo pode explicar a resistência adquirida às três equinocandinas utilizadas atualmente (Ben-Ami & Kontoyiannis, 2021; Rabaan *et al.*, 2023; Vanreppelen *et al.*, 2023).

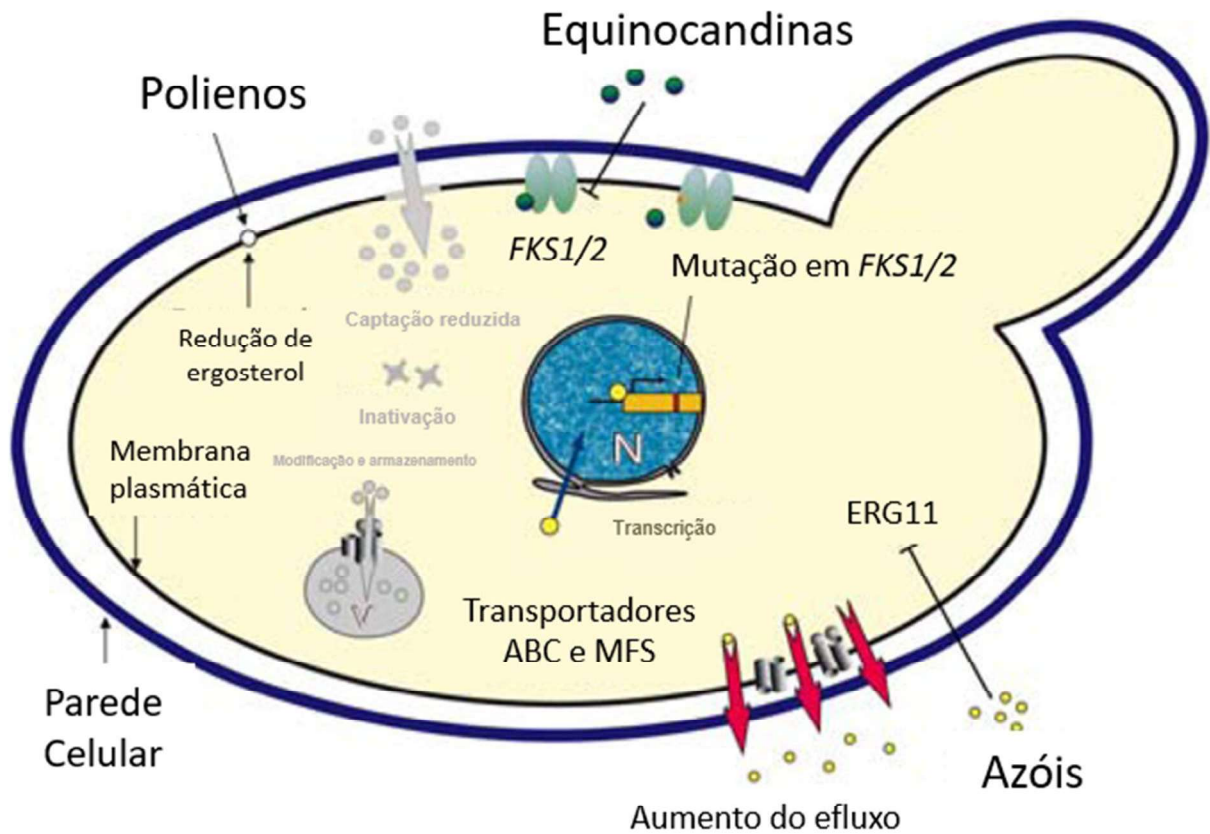


Figura 4: Mecanismos de resistência intrínseca e adquirida presentes em *Candida* spp. (adaptado de Tscherner *et al.*, 2011).

Dessa forma, a problemática da resistência aos compostos antifúngicos faz com que a pesquisa de alternativas viáveis a esses compostos se torne cada vez mais necessária, demonstrando novos mecanismos de ação e que sejam menos predispostos à resistência. Nessa busca, os peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*), que também foram descobertos na década de 40, mas só tiveram seu papel evidenciado na década de 80, têm recebido grande interesse clínico devido ao reconhecimento deles na participação da imunidade inata. A pesquisa atual tem focado nesses compostos naturais como substitutos ou coadjuvantes aos fármacos utilizados clinicamente (**Tabela 1**), principalmente por apresentarem um alto espectro de atividade contra microrganismos, alta estabilidade em ambientes extremos (e.g. temperatura e proteases), possibilidade de modificações em suas estruturas e baixa toxicidade em testes *in vitro* (Dijksteel *et al.*, 2021; Gupta *et al.*, 2024; Koehbach & Craik, 2019; Moretta *et al.*, 2021).

Apesar de demonstrarem um horizonte favorável, apenas onze AMPs antifúngicos (**Tabela 1**) estão, atualmente, em testes pré-clínicos/clínicos e resultados preliminares sugerem que vários outros estudos com AMPs foram parados,

principalmente por problemas nos perfis farmacocinéticos ou efeitos colaterais inesperados (Dijksteel *et al.*, 2021). No entanto, conforme estudos recentes já demonstraram, existe uma correlação entre a atividade biológica e a estrutura primária desses compostos. Onde a estrutura primária está intimamente relacionada à atividade dos peptídeos, podendo levar a um aumento na atividade antifúngica e também a níveis menores de toxicidade, o que se mostra como opção viável à amenização do problema apresentado (Ciulla *et al.*, 2023; Kovaleva *et al.*, 2020; Richter *et al.*, 2022).

Tabela 1: Lista dos atuais AMPs fúngicos em testes clínicos listados no DRAMP (do inglês *Data Repository of Antimicrobial Peptides*, repositório de dados de AMPs). A Database conta com mais de 3000 AMPs dos quais 1837 são antifúngicos, destes foram selecionados apenas o que tinham nos campos “Atividade”/”Uso médico” o termo antifúngico. Os AMPs com atividade e uso médico desconhecidos não foram considerados por essa seleção. Disponível em: <http://dramp.cpu-bioinfor.org/>. Acesso em 21/12/2024.

Nome	Atividade	Uso médico	Estágio	ID Pubmed
Histatin	Antifúngico (membrana da célula fúngica, mitocôndria)	AMP presente em enxaguante bucal para o tratamento de candidíase oral (gengivite e doenças periodontais)	Fase II-III	15025852##12492903
Histatin	Antifúngico (membrana da célula fúngica, mitocôndria)	Infecções crônicas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fase I	15025852
P113	Antifúngico	HIV	Fase II (Completa)	15025852##20815365
P113D	Antifúngico	Tratamento por inalação para infecções de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em pacientes com fibrose cística	Desconhecido	15025852##11709321
Mycoprex	Desconhecido	Infecções fúngicas	Fase III	21964560
Heliomocin variants(ETD151)	Desconhecido	Infecções fúngicas sistêmicas em pacientes imunocomprometidos e bacterinas multirresistentes	Pré-clínica	21964560
HB1275	Antifúngico	Infecções por <i>Trichophyton</i> spp.	Pré-clínica	Não disponível
PAC113	Antifúngico	Candidíase oral	Fase IIb	Não disponível
CZEN-002	Anti- <i>Candida</i>	Candidíase vulvovaginal	Fase IIb	Não disponível
D2A21(Demegal)	Desconhecido	Anti-infectivo-Antifúngico	Pré-clínica	Não disponível##11751108##12707542
Novexatin(NP213)	Antifúngico (membrana)	Tratamento de infecções fúngicas dermatópicas como a ornicomicose	Fase IIb	Não disponível

1.3 Defensinas de plantas: propriedades e bioinspiração para novos compostos

Os AMPs são moléculas curtas de até 100 resíduos de aminoácidos, tipicamente com carga líquida positiva em pH fisiológico, vale-se acrescentar que AMPs aniônicos já foram descritos na literatura. Essas moléculas também apresentam expressiva proporção de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos em regiões específicas da molécula, o que proporciona uma estrutura anfipática, tornando-os solúveis em ambientes aquosos. São divididos basicamente em quatro categorias, baseadas em suas estruturas secundárias: peptídeos lineares de α -hélice, peptídeos folhas- β (com a presença de pontes de dissulfeto), grampos- β (mistura entre α -hélice e folhas- β) e estruturas estendidas. Importante ressaltar ainda que a conformação tridimensional desses peptídeos pode variar de acordo com a interação com a membrana, conforme pode ser observado na **Figura 5**, onde em meio aquoso o AMP se mostra desestruturado, mas quando em contato com membranas celulares assume uma estrutura de alfa-hélice anfipática. Essas alterações estruturais também podem ocorrer de em diferentes meios e solventes (Chen *et al.*, 2023; Moretta *et al.*, 2021; Parisi *et al.*, 2019).

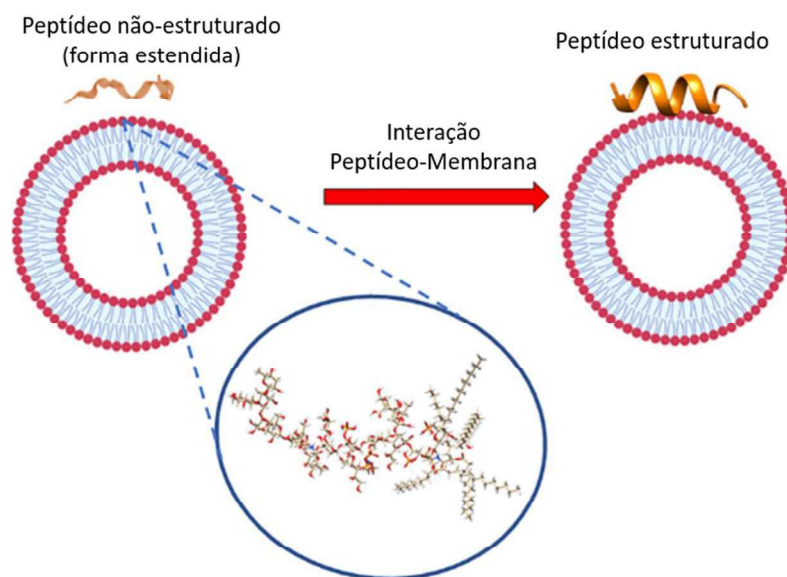


Figura 5: Esquema de interação entre AMPs e membranas celulares, mostrando a possível mudança na estrutura secundária desses peptídeos (adaptado de Chen *et al.*, 2023).

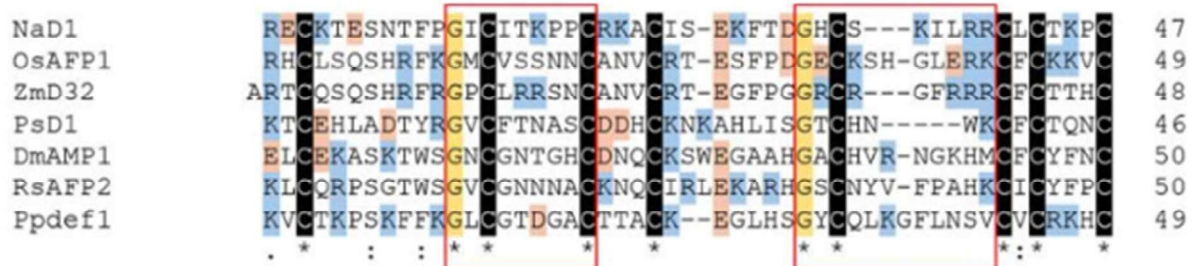
As plantas produzem vários AMPs que são reconhecidos por sua extraordinária importância fisiológica, atuando como componentes essenciais dos seus mecanismos de defesa. Eles oferecem proteção rápida contra infecções bacterianas, fúngicas e

virais (Moretta *et al.*, 2021). Sendo o grupo de AMPs mais bem descritos em plantas o grupo das defensinas (Parisi *et al.*, 2019). As primeiras defensinas nesses organismos foram isoladas a partir de cevada e trigo, no entanto foram consideradas como tioninas devido à semelhança no tamanho, número de cisteínas e atividade antimicrobiana, classificação que foi alterada tempo depois. Vale a pena ressaltar que elas fazem parte de uma superfamília que são encontradas em outros grupos de organismos como fungos, insetos e mamíferos (Manzanares *et al.*, 2024; Moretta *et al.*, 2021; Xu & Lu, 2020). Esta superfamília é dividida em *cis*- e *trans*-defensinas. As *trans*-defensinas têm duas pontes dissulfeto mais conservadas saindo da fita $\beta 3$ para um lado ligando-se à α -hélice e para o outro lado ligando-se à uma região de volta (**Figura 6.E**). Já as *cis*-defensinas possuem as duas pontes dissulfeto mais conservadas saindo da fita $\beta 3$ e ligando-se à α -hélice do mesmo lado (**Figura 6.D**). As defensinas de plantas pertencem à superfamília das *cis*-defensinas (Shafee *et al.*, 2016; Kovaleva *et al.*, 2020; Parisi *et al.*, 2019).

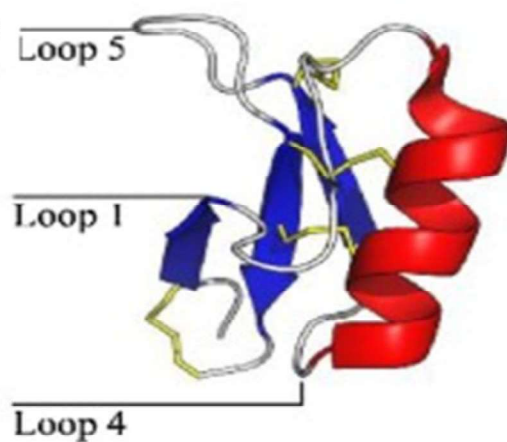
Assim, as defensinas de plantas estão relacionadas à defesa, tendo sua produção estimulada tanto por fatores bióticos quanto abióticos. Encontradas em vários tecidos, estágios de vida e espécies diferentes e, geralmente, não apresentam toxicidade para o organismo produtor (Du *et al.*, 2024). Quanto à sua estrutura, são representadas por um grupo de moléculas catiônicas pequenas, em torno de 45 a 54 resíduos de aminoácidos (**Figura 6A**). Pertencem à um grupo denominado peptídeos ricos em cisteínas (CRP, do inglês *cysteine-rich peptides*), que são peptídeos e proteínas pequenas possuidoras de vários resíduos de cisteína, formando pontes dissulfeto que estabilizam sua estrutura em diversas condições físicas e bioquímicas (Xu & Lu, 2020). Estes oito resíduos de cisteína formam quatro pontes dissulfeto: três estabilizam uma região central formada por três folhas- β antiparalelas – duas dessas estão ligadas à α -hélice formando o elemento estrutural conhecido como elemento estrutural $\alpha\beta$ estabilizado por cisteína (C $\alpha\beta$, do inglês *cysteine-stabilized α -helix β -sheet motif*) - a outra é formada pela primeira e pela última cisteína, essa última ligação faz com que as regiões N-terminal e C-terminal se aproximem conferindo uma estrutura pseudocíclica (**Figura 6B**) (Manzanares *et al.*, 2024; Parisi *et al.*, 2019). Outro elemento estrutural bem conservado e responsável pela atividade biológica dos peptídeos que os possuem é o γ -core (Yount & Yeaman, 2004). Este elemento estrutural é caracterizado pela sequência X_2 -G-X-C- X_{3-9} -C- X_2 , onde X representa qualquer outro aminoácido, vale-se ressaltar que esse elemento pode ser encontrado

em outras classes de AMPs que possuam uma região de volta entre duas folhas- β (Figura 6C).

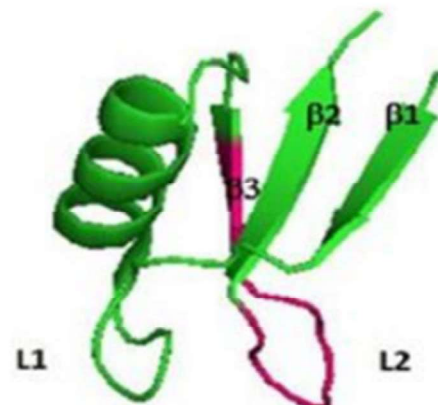
A



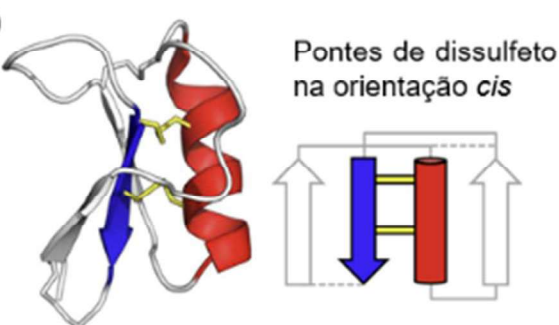
B



C



D



E

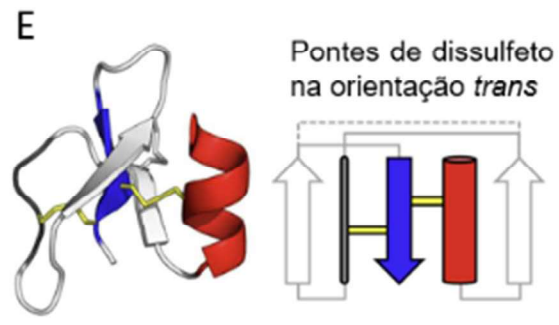


Figura 6: Representação das estruturas primárias e terciárias de algumas defensinas encontradas em plantas, bem como seus elementos estruturais. (A) Estrutura primária de algumas defensinas: tabaco (*Nicotiana glauca*) NaD1, arroz (*Oryza sativa*) OsAFP1, milho (*Zea mays*) ZmD32, ervilha (*Pisum sativum*) PsD1, dália (*Dahlia pinnatifida*) DmAMP1, rabanete (*Raphanus sativus*) RsAFP2 e *Picramnia pentandra* Ppdef1. Em preto estão destacados os resíduos de cisteína, os aminoácidos básicos em azul, aminoácidos ácidos em vermelho, as glicinas conservadas em laranja e as caixas vermelhas os Csq β presentes nas estruturas. Os asteriscos representam os aminoácidos que são idênticos (Manzanares *et al.*, 2024). (B) Estrutura terciária da NaD1. As regiões em azul indicam as folhas- β , em vermelho a α -hélice e amarelo as pontes de dissulfeto (Parisi *et al.*, 2019). (C) Estrutura terciária de uma defensina de planta. A região em rosa destaca o γ -core, β 1, 2 e 3 indicam as folhas- β 1, 2 e 3, respectivamente e L1 e 2, as voltas 1 e 2, respectivamente (Lacerda *et al.*, 2014). (D) e (E) Representação da organização estrutural de *cis* e *trans*-defensinas, respectivamente (adaptado de Shafee *et al.*, 2016).

1.4. Os peptídeos bionspirados na defensina de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

A defensina da planta *Vigna unguiculata* L. Walp. (feijão-de-corda) Vu-Def₁ mostrou atividade inibitória sobre *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Saccharomyces cerevisiae* (Carvalho *et al.*, 2001), α -amilases de insetos e humana (Dos Santos *et al.*, 2010) e *Leishmania amazonensis* (Souza *et al.*, 2013). Essa defensina possui a região conservada γ -core à qual é atribuída a atividade desse peptídeo, o que foi confirmado quando se isolou apenas a região do γ -core fazendo-se substituições nas Cys_{36,42,44} por Ala, para que não houvesse a formação de pontes de dissulfeto que não ocorrem no peptídeo original, e para que não haja resíduo de cisteína livre. Assim esse novo peptídeo foi abreviado para DD (A_{36,42,44}Y₃₂₋₄₆Vu-Def) (**Figura 7**) e, apesar de manter atividade inibitória sobre *L. amazonensis* (Souza *et al.*, 2019), não mostrou atividade significativa sobre fungos de interesse clínico (Toledo *et al.*, 2021).

Como a literatura já aponta que a combinação correta de hidrofobicidade, densidade da carga e tamanho do peptídeo influenciam na sua atividade, mudanças nos aminoácidos na cadeia peptídica ou o aumento de resíduos carregados positivamente podem afetar a estrutura dos AMPs e, conseqüentemente, sua atividade contra patógenos (Moretta *et al.*, 2021). Considerando-se ainda que grande parte dos AMPs que estão em testes clínicos são versões modificadas de peptídeos naturais (Dijksteel *et al.*, 2021). Assim, evidencia-se a importância de se fazer modificações direcionadas para atendendo aos requerimentos de melhor atividade contra microrganismos e baixa toxicidade para o hospedeiro. Foram feitas modificações na estrutura primária de DD para que sua atividade fosse melhorada. É importante salientar que para essas modificações foram feitas a partir de um estudo de 29 artigos e várias estruturas primárias de defensinas diferentes correlacionando com suas características e atividades biológicas. Então, para torná-lo mais positivo, dois resíduos de ácido aspártico (negativo) foram substituídos por duas argininas (positivas), dando origem ao peptídeo A_{36,42,44}R_{37,38}Y₃₂₋₄₆VuDef, apelidado RR (**Figura 7**). Para que houvesse aumento na hidrofobicidade a Ala₃₆ e a Val₄₀ foram substituídas pelo triptofano (aromático), sendo assim o novo peptídeo A_{36,42,44}R_{37,38}W_{36,40}Y₃₂₋₄₆VuDef foi apelidado de WR (**Figura 7**).

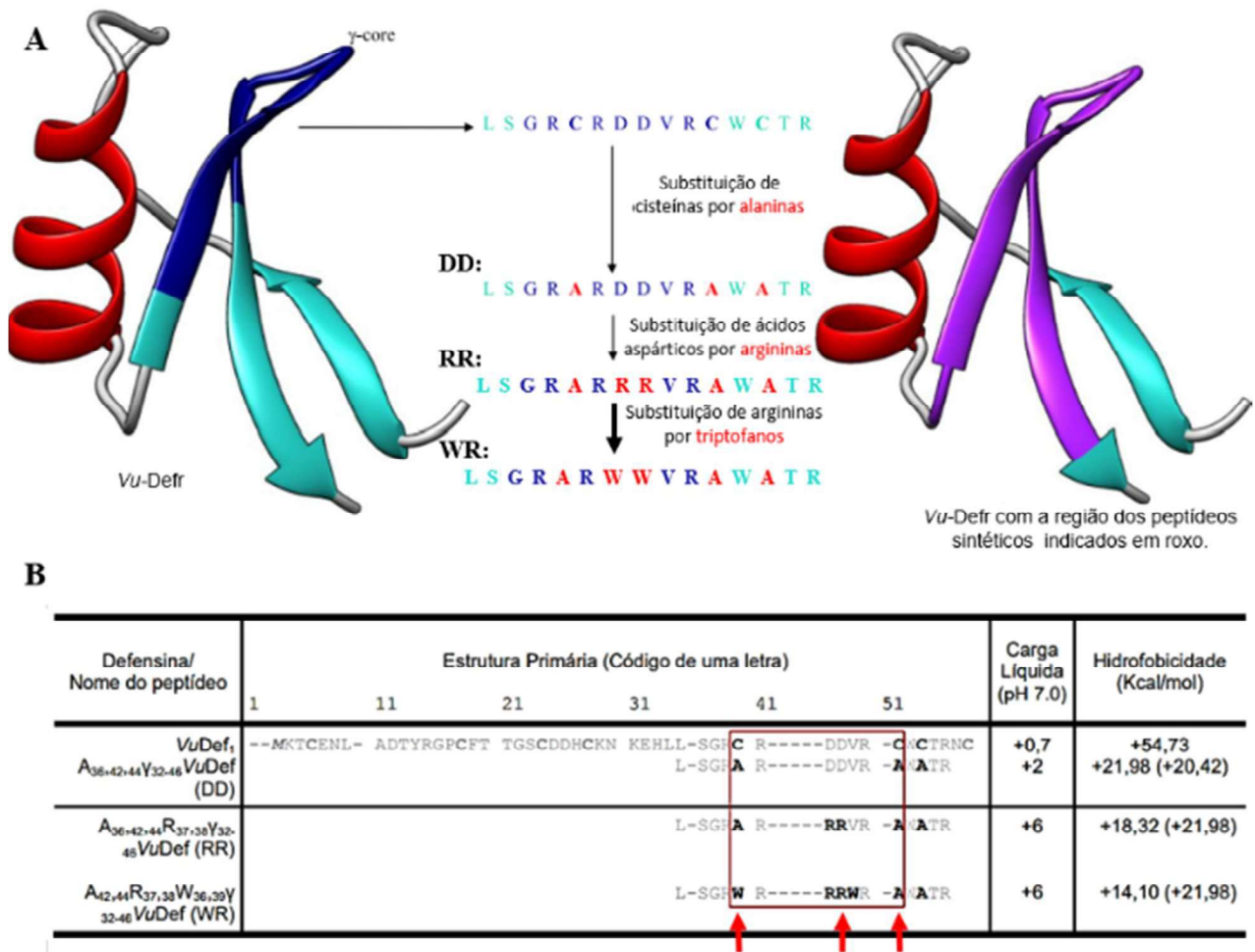


Figura 7: Estrutura primária e modificações de VuDef₁ para a bioinspiração dos peptídeos DD, RR e WR. (A) Estrutura representativa da defensina da planta *Vigna unguiculata* recombinante (VuDefr), as regiões em azul claro indicam as folhas-β antiparalelas, em vermelho a α-hélice e em azul escuro a região do γ-core (adaptado de Souza *et al.*, 2019 e Toledo *et al.*, 2021). (B) Tabela demonstrativa das estruturas primárias e propriedades físico-químicas. Em cinza escuro está indicada a metionina inicial, em cinza claro os demais resíduos de aminoácidos, em preto os resíduos de interesse, a caixa vermelha indica a posição do γ-core e as setas vermelhas indicam as modificações estruturais para a bioinspiração de WR (Toledo *et al.*, 2021).

Após as modificações, foi observado que WR possui atividade antifúngica sobre quatro dos seis fungos testados, inibindo o crescimento de *C. albicans* (96,2%), *C. buinensis* (98,5%), *C. tropicalis* (58,2%) e *S. cerevisiae* (26,1%) sendo o mais ativo dos três e o menos tóxico para células de mamíferos (Toledo *et al.*, 2021). Em ensaios *in vitro*, com células do fungo *C. albicans* verificou-se que WR induz um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), hiperpolarização da membrana mitocondrial, encolhimento celular, condensação de cromatina, e marcação positiva para iodeto de propídeo em momento tardio da morte,

o que sugere um mecanismo de morte celular regulada para esse fungo (Lucas *et al.*, 2024).

No entanto, ao passo que testes *in vitro* já demonstraram a eficácia de WR sobre *C. albicans* e que seu mecanismo de ação já esteja parcialmente esclarecido, ainda são necessárias análises que atestem a eficácia desse peptídeo em modelos *in vivo* dando início aos testes pré-clínicos desse composto, aprofundando-se no conhecimento sobre sua forma de atuação, toxicidade e eficácia (Dijksteel *et al.*, 2021; Lucas *et al.*, 2024; Magana *et al.*, 2020; Toledo *et al.*, 2021).

1.5. *Galleria mellonella* como modelo de infecção

A *Galleria mellonella* (grande-traça-da-cera), uma espécie pertencente à ordem Lepidoptera e à família Pyralidae, é um parasita ubíquo em colmeias de abelhas, vespas e *bumblebees* que pode se alimentar de mel, cera de abelha, fezes de abelhas, pólen, casulos e ocasionalmente de larvas. Com um ciclo de vida holometabólico, este inseto possui cinco estágios de desenvolvimento e, conseqüentemente, um ciclo de vida muito curto: ovo, lagarta, pré-pupa, pupa e adulto (**Figura 8**). A mariposa prefere colônias de abelhas e utiliza compostos voláteis das colmeias como sinais de localização para depositar seus ovos. Após localizar uma colmeia adequada à distância, a fêmea grávida se aproxima durante a noite, quando as abelhas estão menos ativas, e deposita seus ovos em fendas na colmeia. As larvas eclodem dos ovos após 5-8 dias, e em cerca de 6 semanas, a larva amadurece e cresce, atingindo um comprimento cilíndrico de 16-20 mm. No entanto, as abelhas não toleram a intrusão e removem as larvas das colmeias, colocando em risco a prole da mariposa e tornando colmeias vivas menos propícias para a oviposição. Após 8 a 10 mudas ao longo de 4 a 6 semanas, a lagarta para de se alimentar e inicia a formação de um casulo de seda, entrando no estágio de pré-pupa. A pré-pupa posteriormente se transforma em pupa, imobilizada no casulo. O adulto emerge após um período de 4 a 8 semanas, sendo uma mariposa de cor marrom-avermelhada e ativa durante a fase noturna (**Figura 8**). Na forma adulta, *G. mellonella* pode depositar até 300 ovos, com alguns estudos relatando até 600. O ciclo de vida, desde a eclosão dos ovos até a maturação das larvas, pode ser influenciado pela alimentação e temperatura (ideal entre 28 e 30 °C). Este ciclo rápido e simples não requer atenção especial para seu desenvolvimento (Giammarino *et al.*, 2024; Parepely *et al.*, 2023).

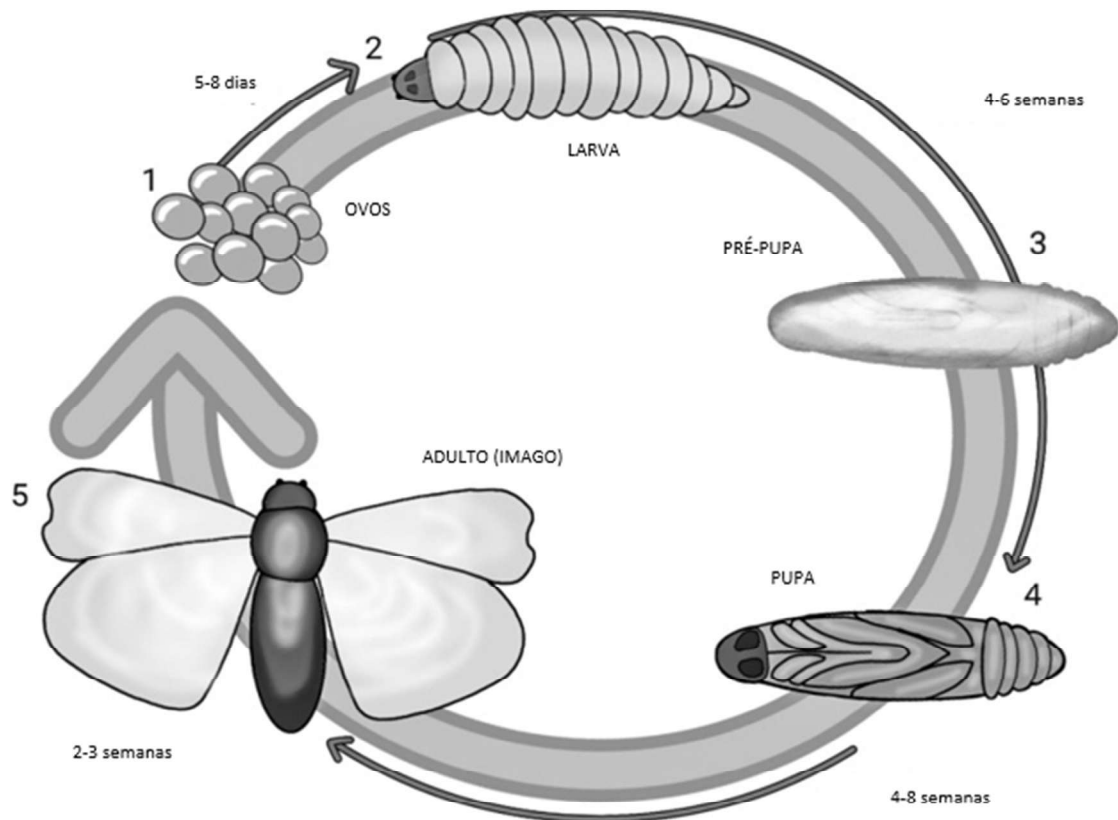


Figura 8: Imagem representativa do ciclo de vida de *G. mellonella* que em geral demora de 15 a 18 semanas (adaptado de Parepely *et al.*, 2023).

Nos diferentes estudos encontrados na literatura relacionados com a avaliação de virulência, progressão de infecções, eficácia e toxicidade de fármacos são utilizadas larvas no sexto estágio de desenvolvimento (Dinh *et al.*, 2021; Giammarino *et al.*, 2024; Ham *et al.*, 2024; Parepely *et al.*, 2023). Para isso são feitas inoculações na região da última pró-pata (**Figura 9A**) com uma seringa Hamilton ou de insulina de forma que atinja a hemocèle. Outras formas de inoculação também já foram documentadas como a alimentação forçada através de uma cânula colocada na região labial até o esôfago (**Figura 9A e C**), no entanto, esse método não garante que a concentração desejada, de microrganismo ou de fármaco, seja alcançada já que ao passar pelos diferentes órgãos do sistema digestório (**Figura 9B**) podem interagir com a microbiota interna ou serem retidos nesses órgãos não atingindo a hemocèle (Champion, Titball & Bates, 2018; Jemel *et al.*, 2020).

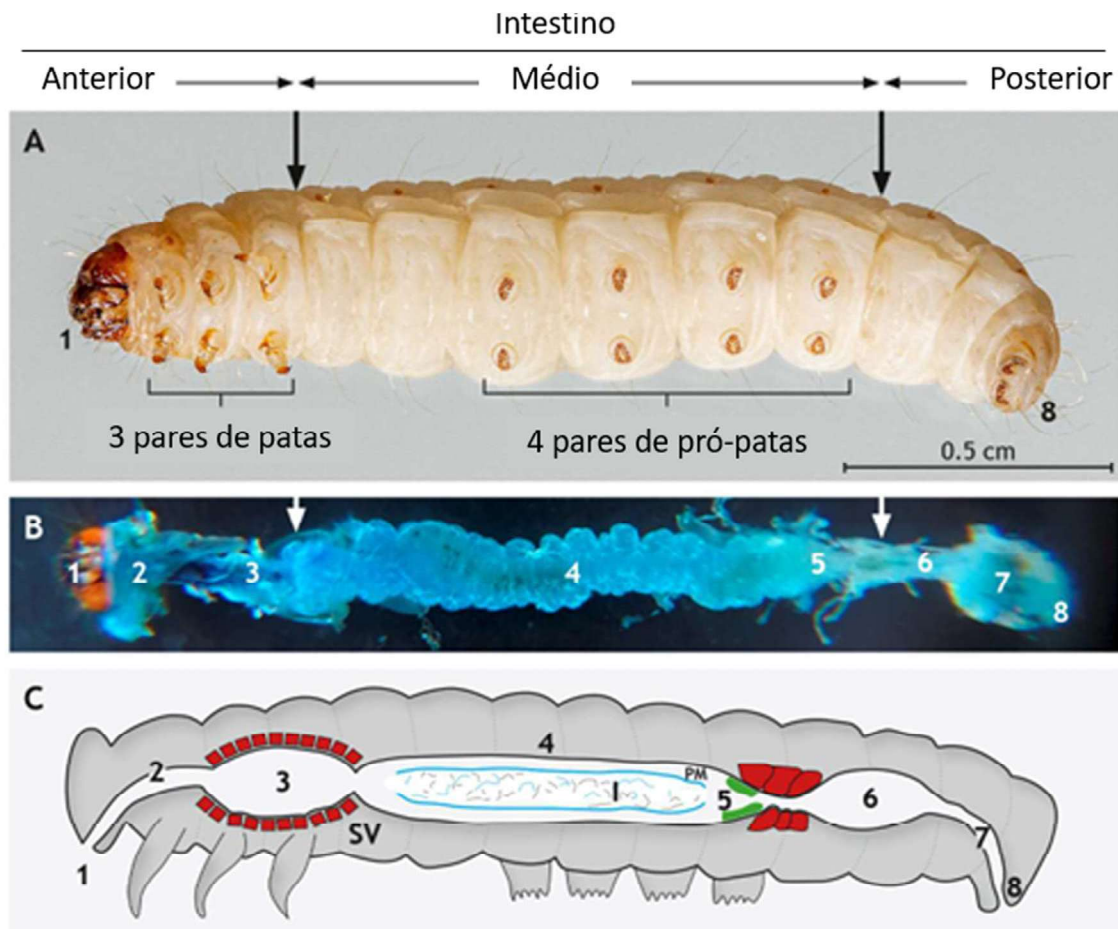


Figura 9: Anatomias externa e interna da larva de *G. mellonella* no sexto estágio. Em (A) parte ventral vista em microscópio estereoscópico. (B) microscopia óptica da anatomia do sistema digestivo da larva corada com azul de metileno. (C) representação gráfica da anatomia do inseto. Os órgãos estão indicados como segue: 1- boca, 2- esôfago, 3- papo, 4- intestino glandular, 5- zona de transição, 6- intestino cuticular, 7- reto, 8- ânus, I- ingesta, PM- matriz peritrófica e SV- válvula estomadeu (adaptado de Sanger *et al.*, 2022).

A larva de *G. mellonella* representa um organismo modelo para a avaliação da eficácia e da toxicidade *in vivo* de diferentes compostos, bem como modelar a patogenicidade de bactérias, fungos e vírus além de avaliar os mecanismos de defesa de hospedeiros em infecções (Dinh *et al.*, 2021; Ham *et al.*, 2024). Suas vantagens incluem o fato de as mesmas resistirem a ambientes com temperaturas parecidas com as de mamíferos (37 °C), requerem pouca manutenção, serem econômicas nos custos de manutenção, terem um ciclo de vida curto e uma resposta imunológica inata semelhante à de vertebrados (Jemel *et al.*, 2020; Ménard *et al.*, 2021; Pereira & Rossi, 2020), ressaltando-se que o sistema imune de invertebrados é extremamente eficiente já que eles não possuem sistema imune adaptativo (Moretta *et al.*, 2021), o que pode ser observado também na **Tabela 2**.

Tabela 2: Comparação entre modelos de infecção alternativos (Adaptado de Champion, Titball & Bates, 2018, Lange et al., 2018 e Serrano et al., 2023). Na tabela estão listados alguns dos modelos *in vivo* mais comuns utilizados em diferentes tipos de pesquisa laboratoriais, incluindo modelos de infecção e teste de fármacos. Foi feita uma interseção das informações de fontes diferentes disponíveis. A indicação “n.d.” significa que o parâmetro não foi determinado pelos estudos utilizados.

Modelo	Culturas celulares de monocamadas		Culturas de células 3D		Caenorhabditis elegans (nematódeo)		Panagrellus redivivus (nematódeo)	Danio rerio (Zebrafish)	Mus musculus	Drosophila melanogaster (mosca da fruta)	G. mellonella	Manduca sexta (lagarta do tabaco)
	não	não	não	não	sim	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Modelo Animal Completo	não	não	não	não	sim	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Utilização à 37 °C	sim	sim	sim	sim	não	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Dosagem precisa	sim	sim	sim	sim	não	não	não	sim	sim	não	sim	sim
Sistema imune	não	não	não	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Custos de manutenção	médio	alto	alto	baixo	baixo	baixo	baixo	alto	alto	baixo	baixo	baixo
Tamanho	n.d.	n.d.	n.d.	pequeno	pequeno	pequeno	n.d.	n.d.	grande	pequeno	significativo	n.d.
Experiência especializada	n.d.	n.d.	n.d.	não	não	não	n.d.	n.d.	sim	sim	não	n.d.
Centro de estoque	n.d.	n.d.	n.d.	sim	sim	sim	n.d.	n.d.	sim	sim	não	n.d.
Databases comunitárias	n.d.	n.d.	n.d.	sim	sim	sim	n.d.	n.d.	sim	sim	não	n.d.
Procedimentos padronizados	n.d.	n.d.	n.d.	sim	sim	sim	n.d.	n.d.	sim	sim	não	n.d.
Linhagens de OGM / Bibliotecas de microarrays e RNAi	n.d.	n.d.	n.d.	sim	sim	sim	n.d.	n.d.	sim	sim	não	n.d.
Genoma completo sequenciado e analisado	n.d.	n.d.	n.d.	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	não	sim
Imunidade adaptativa	n.d.	n.d.	n.d.	não	não	não	n.d.	sim	sim	não	não	n.d.
Imunidade Inata	n.d.	n.d.	n.d.	sim	sim	sim	n.d.	sim	sim	sim	sim	n.d.
Implicações éticas	n.d.	n.d.	n.d.	não	não	não	n.d.	sim	sim	não	não	n.d.

Das características positivas desse modelo chama atenção seu sistema imune inato, que pode ser dividido em duas partes: a celular, composta por basicamente seis tipos celulares diferentes: os pró-hemócitos, os plasmócitos, as células granulares, os coagulócitos, os esferulócitos e os oenocitóides, chamados coletivamente de hemócitos (Singikum *et al.*, 2018) e a humoral compreendida por AMPs, enzimas líticas, opsoninas e a fenoloxidase que catalisa a melanização (Dinh *et al.*, 2021). Um exemplo da interação entre as duas partes pode ser observado por exemplo no processo de coagulação da hemolinfa que ocorre na presença de patógenos ou injúria, nesse processo proteínas de hemolinfa se ligam às células granulares sendo detectadas, posteriormente, por moléculas que iniciam os processos de coagulação e da ação da profenoloxidase (Li *et al.*, 2002).

Apesar das potencialidades, durante muitos anos, as larvas de *G. mellonella* têm sido comercialmente disponíveis como alimento para répteis e aves em cativeiro, além de isca de pesca, e larvas criadas para esses fins têm sido amplamente utilizadas em pesquisas. Essas larvas não são definidas por idade ou peso, e são criadas, alimentadas e mantidas em condições variadas. A idade, o estado de alimentação e o manejo físico das larvas têm mostrado ter um impacto significativo na susceptibilidade delas a infecções. Além disso, as larvas podem conter resíduos de antibióticos e hormônios, o que pode resultar em respostas inconsistentes às infecções, possivelmente refletindo alterações no metabolismo das larvas (Champion, Titball & Bates, 2018). Assim para tentar sanar essas deficiências algumas alternativas são propostas, como utilizar larvas criadas sem o uso de antibióticos, em colônias internas nos laboratórios, com idade e peso definidos, descontaminando a superfície onde serão feitas as injeções e reduzir o número de grupos ao se utilizar padronizações internas (Champion, Titball & Bates, 2018; Serrano *et al.*, 2023).

Além disso, a gravidade das infecções em humanos parece estar relacionada à gravidade das infecções nas larvas (Borman, 2018). Estudos sobre como esses insetos reagem em termos de virulência, resistência e resposta a medicamentos antifúngicos já confirmaram que usar *G. mellonella* como modelo é eficaz (Borman, 2018; Marcos-Zambrano *et al.*, 2020). Isso é válido também quando estamos estudando o gênero *Candida* (García-Bustos *et al.*, 2022; Jemel *et al.*, 2020; Marcos-Zambrano *et al.*, 2020; Rossoni *et al.*, 2019). Apesar de *C. albicans* ser um dos principais patógenos fúngicos humanos, não existe uma grande variedade de estudos que explorem a eficiência do uso de *G. mellonella* para estudos de infecção (Denning

et al., 2022; Jemel *et al.*, 2020). Nesse sentido, Dinh *et al.* (2021) concluem que, apesar das limitações, o uso de *G. mellonella* como animal modelo de alto-rendimento, flexível e sofisticado, necessário a todos os pesquisadores contemporâneos e que muitos pesquisadores irão aderir esse modelo.

2. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de novos compostos é urgente e pesquisas com AMPs têm se mostrado relevantes no desenvolvimento de novos antifúngicos. AMPs são moléculas com até 100 resíduos de aminoácidos, tipicamente com carga líquida positiva em pH fisiológico, com grande proporção de resíduos hidrofóbicos, anfipáticos e solúveis em ambientes aquosos (Moretta *et al.*, 2021). Apesar do grande interesse em relação aos AMPs, há lacunas na relação estrutura-mecanismos de ação, necessitando maiores investigações (Koehbach & Craik, 2019).

Nesse sentido, o AMP A_{42,44}R_{37,38}W_{36,39}Y₃₂₋₄₆VuDef (abreviado WR) foi bioinspirado a partir do γ -core da defensina de sementes da planta *Vigna unguiculata* L. Walp. (feijão-de-corda) (Vu-Def), por meio de modificações direcionadas na sequência de aminoácidos visando o aumento da carga positiva e da hidrofobicidade. WR mostrou atividade na inibição de *C. albicans* em testes *in vitro* e é o menos tóxico para as células animais, comparado com outros AMPs sintetizados a partir de Vu-Def (Toledo *et al.*, 2021). Assim, ensaios pré-clínicos que elucidem a ação e a toxicidade dos AMPs são necessários (Magana *et al.*, 2020).

Um dos modelos mais comuns em estudos de infecções microbianas é o de roedores, no entanto existem barreiras éticas e orçamentárias que dificultam o seu uso. A larva do lepidóptera *Galleria mellonella* (grande-traça-da-cera, *Pyrilidae*) se mostra uma alternativa, pois além de possuir vários indicadores de resposta a infecções, viver em temperaturas similares às dos humanos, fácil manutenção, baixo custo e ciclo de vida curto, também tem uma resposta imune inata similar à de vertebrados, sendo a severidade da infecção em humanos correlata a das larvas (Borman, 2018; Pereira & Rossi, 2020). Estudos de virulência, resistência e resposta a drogas antifúngicas já demonstraram a eficácia do uso de *G. mellonella* como modelo (Borman, 2018; Marcos-Zambrano *et al.*, 2020), inclusive para o gênero *Candida* (García-Bustos *et al.*, 2022; Marcos-Zambrano *et al.*, 2020).

Dessa forma este trabalho visa avaliar a eficácia antifúngica *in vitro* do AMP WR sobre cepa de *C. albicans* em modelo de infecção em *G. mellonella* comparando-a com a de fármacos de referência, já que este modelo se mostrou equivalente em relação ao modelo murino. Por fim, procura-se elucidar a atividade e toxicidade desse composto a fim de torná-lo alternativa viável aos medicamentos já utilizados atualmente em ambiente comercial e hospitalares, contribuindo para a mitigação dos males causados por esse patógeno.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a toxicidade e a eficácia da administração do peptídeo A_{42,44}R_{37,38}W_{36,39}Y₃₂₋₄₆VuDef (WR) no tratamento do modelo de infecção por *Candida albicans* em *Galleria mellonella*.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Determinar a dosagem de *Candida albicans* para infecção efetiva em larvas de *Galleria mellonella*;
- 3.2.2. Determinar o momento ideal administração de WR;
- 3.2.3. Estimar a dosagem mínima de WR no controle da infecção;
- 3.2.4. Avaliar a toxicidade de WR para as larvas de *G. mellonella*;
- 3.2.5. Avaliar os indicadores externos de progressão da infecção (melanização, movimento quando estimulada e formação de casulo) e sobrevivência;
- 3.2.6. Avaliar os indicadores internos de infecção: órgãos internos e aspectos bioquímicos;
- 3.2.7. Comparar resultados com os resultados de fármacos de referência.

4. METODOLOGIA

4.1. Cultivo e armazenamento do material biológico

A cepa clínica *Candida albicans* SC5314/ATCC MYA-2876 presente na micoteca do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) foi cultivada em meio *Sabouraud* (Merck Millipore® Brasil: [Peptona de carne] 10g/L, [Peptona de caseína] 5 g/L, [D(+)-glicose] 20 g/L e [Ágar] 17 g/L e pH 5,6) à 30 °C por 24 h e, após crescimento, mantidas à 4 °C com transferência para novo meio a cada três meses. Para todas as análises foram usadas colônias com 24 h de crescimento. Daqui em diante a cepa *Candida albicans* SC5314/ATCC MYA-2876, será referida como *Candida albicans*.

O peptídeo WR foi sintetizado pela AminoTech Indústria e Comércio Ltda., com homogeneidade maior ou igual a 95% e preparado como descrito em Toledo *et al.* (2021).

Todas as fases do inseto *Galleria mellonella* provém da cultura mantida no LFBM em potes plásticos com tampa modificada para permitir circulação de ar e cobertos internamente com papel filtro, e dispostos em incubadora (Tecnal® Equipamentos Científicos Brasil TE-371/240L) à 27 °C. Os ovos e larvas foram colocados nos potes com ração artificial fresca (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 leite em pó desnatado e 100 g de farinha de soja) (Firacative *et al.*, 2020; Pereira & Rossi, 2020). Semanalmente foi feita a limpeza da seda, casulos e detritos produzidos pelas larvas e a renovação da ração, se necessário, até que as larvas atingissem o estágio de pupa. Então, dez pupas foram colocadas em potes plásticos, garantindo-se o abrigo da luz e sem ração para a emergência dos adultos (imago). Pedacos de papel filtro foram colocados no interior dos potes, para que neles as fêmeas fizessem a oviposição. Após 1-3 semanas os ovos presentes no papel filtro foram colocados em nova ração, reiniciando-se o ciclo que em geral demora aproximadamente 15 a 18 semanas.

4.2. Determinação da dose letal fúngica de *C. albicans* para a progressão da infecção e morte das larvas de *G. mellonella*

A fim de determinar a dose letal fúngica (DLF₁₀₀), quando há estabelecimento da infecção prolongada e morte de 100% das larvas do ensaio, foram feitos os

seguintes procedimentos. Para o preparo do inóculo da levedura, uma cultura foi colocada por 24 h à 30 °C e 250 rpm em caldo *Sabouraud* (Merck Millipore® Brasil: [Peptona de carne] 10 g/L, [peptona de caseína] 5 g/L, [D(+)-glicose] 20 g/L e pH 5,6). Após o crescimento, uma alíquota de 1 mL foi retirada e centrifugada por 1 min o sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspensionado em 1 mL de solução tampão-fosfato (PBS, do inglês *Phosphate-Buffered Saline*) ([NaCl] 30 mM, [KCl] 2,7 mM, [Na₂HPO₄] 10 mM, [KH₂PO₄] 1,8 mM e pH 7,3) previamente autoclavada (121 °C por 20 min). Então foi feita a contagem de células em câmara de Neubauer (LaborOptik) e microscópio óptico (Axio Imager.A2, Zeiss) para o cálculo e determinação da densidade celular em células/mL bem como as diluições necessárias para as concentrações de inóculo que seriam testadas (Pereira & Rossi, 2020; Toledo *et al.*, 2021).

Para a seleção das larvas para fazer a inoculação do fungo e também para verificar a progressão da infecção das larvas foi adotado um sistema de pontuação denominado como Índice de Saúde (IS), seguindo os parâmetros visuais e a pontuação mostrados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Critérios, pontuações e parâmetros visuais utilizados na determinação do Índice de Saúde (adaptado de Champion, Titball & Bates, 2018 - tradução nossa).

Categoria	Descrição	Pontuação	Parâmetro visual	Máximo
Resposta ao toque	sem movimento	0	Figura 10	3
	movimento mínimo quando estimulada	1		
	move-se quando estimulada	2		
	move-se sem estímulo	3		
Formação de casulo	sem casulo	0		1
	casulo parcial	0,5		
	casulo total	1		
Melanização	larvas escuras	0		4
	>40% do corpo	1		
	20-40% do corpo	2		
	<20% do corpo	3		
	sem melanização	4		
Sobrevivência	morta	0	-	2
	viva	2		
Total				10

Foi considerado para a categoria “Resposta ao toque” se, quando estimuladas com toque direto de uma pinça e viradas com parte ventral para cima, retornarão à posição normal rapidamente (**Figura 10**).

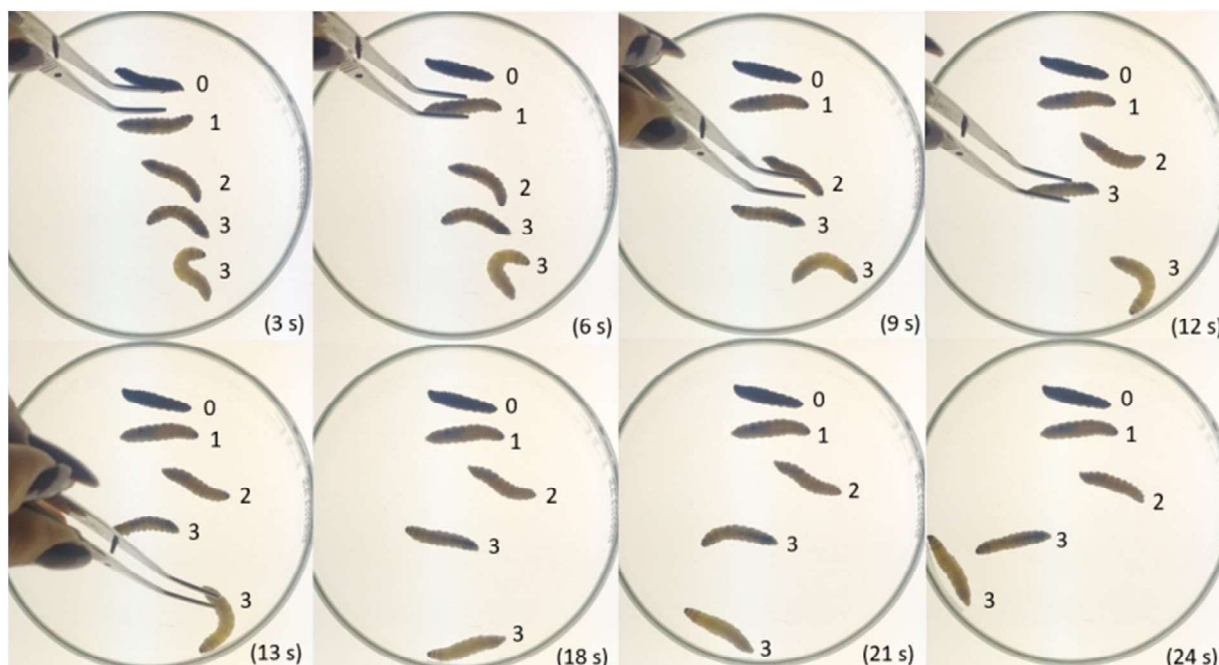


Figura 10: Imagens do vídeo de lapso de tempo representativo do critério “Resposta ao toque”. Os números próximos às larvas representam as notas que cada larva recebe para essa categoria.

Dessa forma, para cada repetição, foram selecionadas (12) doze larvas, no sexto instar com massas entre 250 e 300 mg e com pontuação 10,0, que indicava que as larvas eram saudáveis (Andrejko *et al.*, 2021).

Para esse ensaio foi feita a inoculação intra-hemocélica na última pró-pata esquerda de 10 μ L de inóculo contendo as doses fúngicas de $0,5 \times 10^6$ células/larva, $1,0 \times 10^6$ células/larva e $2,0 \times 10^6$ células/larva, ou PBS utilizando-se uma seringa de insulina estéril. O local da injeção foi previamente limpo com álcool 70% (Andrejko *et al.*, 2021; Jemel *et al.*, 2020) e as larvas foram observadas por 10 min para garantir que não houve extravasamento da hemolinfa e se elas se mantinham saudáveis. As larvas foram colocadas em placas de Petri, armazenadas a 37 °C e avaliadas por 144 h (6 dias) a cada 24 h para acompanhamento do IS e da mortalidade (Champion, Titball & Bates, 2018).

4.3. Eficácia de WR sobre concentração de 2.000 células/mL de *C. albicans*

Previamente a dose letal de WR foi determinada em 27,5 μ M para a cepa de *C. albicans* CE022 na densidade celular de 2.000 células/mL e com incubação por 1 h a 30 °C (Toledo *et al.*, 2021). A partir da dose letal determinada anteriormente por

Toledo *et al.* (2021), foram testadas novas doses com incrementos de 4,5 μM até que fosse atingida a dose letal para a nova cepa clínica. O ensaio foi feito em uma placa de 96 poços (Nunc) (ThermoScientific® Brasil) foram colocadas 2.000 células/mL da cepa clínica e diferentes concentrações de WR (μM) em caldo *Sabouraud* para o volume final de 100 μL em cada poço. A placa foi incubada a 30 °C por 1 h (tempo de indução para induzir a morte celular fúngica determinado por Toledo *et al.* (2021)). O controle foi feito sem a adição de WR. Ao final do tempo de incubação, o conteúdo dos poços foi lavado uma vez em caldo *Sabouraud* e plaqueado em ágar *Sabouraud* com auxílio de alça de *Drigalski*, sendo então incubadas por 24 h à 30 °C para crescimento e posterior contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). A amostra controle foi considerada como 100% viável. Imagens das placas de Petri foram adquiridas com câmera (Moto G8 Power lite xt2055, xt2055-2, 16 Mp, resolução 4619x3464 pixels).

4.4. Dose letal de WR e FCZ sobre a dose letal fúngica de *C. albicans* para as larvas de *G. mellonella*

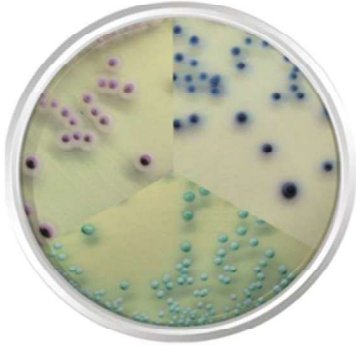
Foi realizado ensaio semelhante ao descrito no **item 4.3**, no entanto utilizando-se a dose letal de WR sobre a DLF₁₀₀ de *C. albicans* para *G. mellonella* encontrada no **item 4.2**. Foram seguidas as mesmas etapas como já descrito (**item 4.3**), sendo que após o tempo de incubação de 1 h, foi feita a leitura da absorbância em leitora de microplacas Synergy H1 (Biotek) a 620 nm. Para a determinação da UFC, o conteúdo dos poços do controle foi diluído 1.000 vezes em caldo *Sabouraud*, e desta diluição final foram plaqueados o volume em 2 μL em ágar *Sabouraud* com auxílio de alça de *Drigalski*, sendo então incubadas por 24 h à 30 °C para crescimento e posterior contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Para o fármaco de referência, FCZ foi considerada a dose indicada para o tratamento de candidíases sistêmicas (400 mg/kg), seguindo-se os mesmos procedimentos já descritos, entretanto o tempo de incubação foi de 6 h. Todas as outras amostras seguiram a mesma diluição do controle referente ao WR e FCZ. As porcentagens de inibição foram calculadas considerando o controle como 100% de crescimento.

4.5. Avaliação da progressão da carga fúngica nas larvas infectadas

Com o objetivo de determinar a concentração de leveduras presentes e o estabelecimento da infecção nas larvas infectadas, foi determinada a carga fúngica

da hemolinfa. Para esta determinação, foram escolhidas 5 larvas para a retirada da hemolinfa nos tempos de 1, 4, 6, 24 e 48 h. Adicionalmente, para cada tempo escolhido, as cinco larvas estavam dentro da média do IS (**Tabelas 3 e S10**) referente àquele tempo para evitar discrepâncias nas análises. Foi feita a limpeza da parte ventral da larva com álcool 70% e com auxílio de uma seringa de insulina estéril foi feita uma pequena punção na última pró-pata direita da larva apenas para que se formasse uma gota de hemolinfa (50 µL), que foi recolhida com uma micropipeta e transferida para um tubo de microcentrífuga previamente resfriado. Foram adicionados à hemolinfa solução de tropolona (0,01 g/mL) (1:1) - denominada solução de hemolinfa. Uma alíquota foi retirada para visualização morfológica ao microscópio óptico (Axio Imager.A2, Zeiss). Outra alíquota foi diluída na proporção 1:100 em caldo *Sabouraud* e plaqueada em ágar *Sabouraud* previamente preparada com os antibióticos ampicilina (50 mg/mL) e cloranfenicol (34 mg/mL) para evitar o crescimento de bactérias com auxílio de alça de *Drigalski*. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 h para crescimento de colônias e contagem de UFC. Foi realizado um controle com a hemolinfa de larvas não infectadas para a identificação da presença de microrganismos da microbiota larval. Das colônias crescidas, 14 colônias de cada tratamento (4, 24 e 48 h) foram escolhidas aleatoriamente e plaqueadas em meio diferencial ágar cromogênico candida (KASVI: [ágar] 15,0 g/L, [cloranfenicol] 0,5 g/L, [mistura cromogênica] 0,4 g/L, [dextrose] 20,0 g/L e [peptona] 10,0 g/L e pH 6,1) para confirmação da presença de *C. albicans*. A identificação foi feita de acordo com a **Tabela 4**.

Tabela 4: Padrão do resultado da análise qualitativa obtida a partir do cultivo em ágar cromogênico candida. Informações cedidas pelo fabricante. Disponível em: [https:// www .lojaprlabor .com.br/ produtos / agar-cromogenico - candida-frasco-500g-kasvi/](https://www.lojaprlabor.com.br/produtos/agar-cromogenico-candida-frasco-500g-kasvi/). Acesso em: 24/11/2024.

Microrganismo	Crescimento	Coloração da colônia	Imagem representativa
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 1369	Bom	Azul	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Bom	Verde	
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	Bom	Rosa arroxeadado	
<i>Candida parasilosis</i> ATCC 22019	Bom	Branco claro-roxo	
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	Bom	Branco claro-roxo	

4.6. Determinação da concentração de hemócitos na hemolinfa durante a progressão da infecção

Como o sistema imune inato larval é similar à imunidade inata de mamíferos (Singikum *et al.*, 2018), entende-se ser necessário avaliar se ele está respondendo à infecção. Para esse fim, foi realizada a contagem das células de defesa presentes na hemolinfa das larvas. Para isso, as larvas foram inoculadas com a DLF₁₀₀ de *C. albicans* conforme os **itens 4.2 e 4.5**, sendo retiradas amostras de hemolinfa para o preparo da solução de hemolinfa. Essa solução foi diluída na proporção 1:10 em solução fisiológica de inseto (IPS, do inglês *Insect Physiological Saline*) ([NaCl] 30 mM, [KCl] 5 mM, [TRIS/HCl] 100 mM; [EDTA] 10 mM; [Citrato de Sódio] 30 mM e pH 6,9) (Rossoni *et al.*, 2019). Uma alíquota foi retirada para que fosse feita a contagem de hemócitos em câmara de Neubauer (LaborOptik) e microscópio óptico (Axio Imager.A2, Zeiss) para o cálculo e determinação da densidade celular em células/mL.

4.7. Testes de toxicidade e eficácia do tratamento com WR *in vivo*.

O teste de eficácia foi feito a partir dos dados da determinação da DLF₁₀₀ de *C. albicans* sobre *G. mellonella*. O inóculo foi realizado como descrito no **item 4.2**, assim como os dados obtidos com a dose letal de WR nos experimentos de indução de morte celular e viabilidade celular *in vitro*. Os momentos das injeções intra-hemocélicas de WR na última pró-pata direita foram escolhidos a partir dos dados obtidos nos ensaios de progressão da carga fúngica, das concentrações de hemócitos durante a progressão da infecção e da curva de probabilidade de sobrevivência. Foram considerados ainda os dados de posologia do fármaco FCZ, como base para o tratamento. A dose de tratamento com WR foi determinada como 40 mg/kg, cálculo feito a partir da concentração (2 mg/mL) e pureza (>95%) informados pela AminoTech e considerando-se a média de peso larval como 275 mg. Para comparação com o fármaco FCZ foi considerada a dose de 400 mg/kg, como indicado pela bula do medicamento, e o tratamento ocorreu nos mesmos tempos de WR. O controle com PBS foi injetado nos mesmos tempos que os tratados. Após as injeções, as larvas foram incubadas à 37 °C por até 144 h com a avaliação do IS a cada 24 h. No teste de toxicidade foi seguindo o mesmo procedimento, com exceção à injeção do inóculo. Também foram feitas a avaliação da carga fúngica conforme o **item 4.5** e da concentração de hemócitos de acordo com o **item 4.6**.

A fim de avaliar efeitos posteriores às 144 h de tratamento com WR foram escolhidas aleatoriamente sete larvas e acompanhadas por mais oito semanas após o experimento, para que atingissem a fase adulta. Essas foram recolocadas em dieta artificial e a sobrevivência foi analisada a cada 7 dias.

4.8. Avaliação de parâmetros bioquímicos da hemolinfa larval

4.8.1. Dosagem de carboidratos e proteínas totais na hemolinfa larval

Para verificar possíveis impactos no metabolismo das larvas, foi feita quantificação de total açúcares redutores e da quantidade total de proteínas. Para as dosagens de proteínas e carboidratos presentes na hemolinfa larval, foram realizados os mesmos procedimentos de infecção e/ou tratamento com o peptídeo WR (itens 4.2 e 4.7). Sendo coletados 50 µL de hemolinfa de cinco larvas após 120 h da infecção e 64 h após a última injeção de WR, que foram colocados separadamente em tubos de microcentrifuga previamente resfriado. Foi feita centrifugação à 4 °C e 200 x g por 5 min e o sobrenadante coletado foi submetido à uma nova centrifugação a 4 °C e 20.000 x g por 10 min, o sobrenadante final foi diluído em solução tampão ([Tris-HCl] 5 mM (pH 6.6), [NaCl] 137 mM e [KCl] 2.7 mM) na proporção 1:10. Na determinação da concentração de glicose foi feita a reação com ácido dinitrosalicílico a partir de curva padrão com glicose (1,0 mg/mL) (Radford *et al.*, 2005; Matsuda *et al.*, 2014) em 540 nm. Na quantificação de proteínas, foi utilizado o método de reação com BCA (ácido bicinconínico, Sigma-Aldrich) a partir de curva padrão com ovoalbumina (1,0 mg/mL, Sigma-Aldrich) em leitura à 562 nm.

4.8.2. Perfil proteico da hemolinfa

Para avaliar a resposta molecular da defesa inata das larvas foi feita uma análise do perfil proteico da hemolinfa das larvas. Para isso, 50 µL de hemolinfa foram diluídos na proporção de 1:1 em solução de tropolona (0,01 g/L). À alíquota desta solução, foram adicionadas *C. albicans* ou *C. albicans* + WR para completar o volume até 50 µL com IPS. Neste volume final de 50 µL, a concentração final de hemolinfa foi de 30% e as concentrações de *C. albicans* e/ou WR nas doses previamente estipuladas ($0,5 \times 10^6$ células/tubo e 55,5 µM). As amostras foram colocadas em shaker a 200 rpm e 37 °C por 24 h. Depois disso foram adicionados 20 µL de EDTA (500 mM), as amostras foram homogeneizadas, centrifugadas (4 °C e 200 x g por 5 min) e o sobrenadante coletado foi submetido à uma nova centrifugação a 4 °C e 20.000 x g

por 10 min e o sobrenadante final foi retirado e seco por liofilização (LK100, Liotop). A amostra seca foi ressuspensa em 15 µL de Solução Tampão ([TRIS] 0,125 M, [SDS] 2,5%, [Azul de bromofenol] 0,25%, [β -mercaptoetanol] 5%) e foi analisada por eletroforese em gel de tricina por 13 h, a 15 V e temperatura ambiente (Gallagher, 2006; Schägger & Jagow, 1987). Após a corrida, o gel foi colocado em solução de Coomassie Azul Brilhante R250 ([Coomassie Azul Brilhante R250] 0,1%, [Metanol] 50%, [Ácido acético glacial] 10%). Ambos os géis foram corados sob agitação constante (100 rpm) e, se necessário, levemente descorados em água destilada aquecida, para facilitar a visualização das bandas e então fotografados. Os resultados da análise também permitem avaliar se WR ainda está circulante na hemolinfa.

4.8.3. Zimografia

Já que proteases podem levar a degradação do peptídeo dentro da hemolinfa larval, foi feita uma zimografia para avaliar a presença de proteases circulantes. Assim, as amostras foram preparadas conforme descrito no **item 4.8.2**. No entanto, as amostras foram ressuspensas em solução tampão ([TRIS] 0,125 M, [SDS] 2,5%, [Azul de bromofenol] 0,25%, [Sacarose] 10% e pH 6,8). As amostras foram analisadas em dois diferentes géis Laemmli: um para controle das bandas, chamado “gel espelho” e outro com a presença do substrato para proteólise, nesse caso gelatina de pele suína (0,1%). Após a corrida por 3 h, a 80 V e 4 °C, ambos os géis foram submetidos à duas etapas de lavagem em solução de lavagem ([Tris-HCl] 0,1 M, [Triton X-100] 2,5%, [CaCl₂] 20 mM, [MgCl₂] 20 mM e pH 8,0) por 30 min cada, em agitação constante (100 rpm). O excesso de solução de lavagem foi retirado com água ultrapura. O gel de zimografia foi incubado à 37 °C, *overnight* em tampão de incubação ([ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico] 50 mM, [CaCl₂] 10 mM, [MgCl₂] 5 mM e pH 6,9). Após o tempo de incubação, o gel foi lavado novamente em água ultrapura e colocado em solução de Coomassie Azul Brilhante R250. Ambos os géis foram corados sob agitação constante (100 rpm) e, se necessário, levemente descorados em água destilada aquecida, para facilitar a visualização das bandas e então fotografados (Vandooren *et al.*, 2013). Ressalta-se que foi retirada amostra de hemolinfa fresca de cinco diferentes larvas e o pH medido, obtendo-se o valor aproximado de 6,9. Dessa forma, o tampão de incubação foi ajustado para o pH mais próximo possível ao natural da hemolinfa, que seria adequado para a atividade das proteases.

4.9. Avaliação de parâmetros morfofisiológicos da larva.

4.9.1. Microscopia óptica.

Cinco larvas foram infectadas e tratadas com WR conforme **item 4.6**. Após 24 h da infecção com *C. albicans*, foi feita uma leve punção com uma agulha 18 G na região da pró-pata direita para que a hemolinfa extravasasse. O conteúdo (50 µL) foi coletado com uma micropipeta e transferido para um tubo de microcentrífuga contendo solução de tropolona (0,1 g/mL) previamente resfriado na proporção de 1:1. A mistura foi centrifugada por 60 s a 6000 rpm e 25 °C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de células ressuspensas em 10 µL de PBS. O conteúdo foi colocado numa lâmina e foram adicionados 10 µL de calcofluor white (Sigma-Aldrich) para a marcação de quitina na parede fúngica, sendo coberto com uma lamínula para visualização em microscópio óptico (Axio Imager.A2, Zeiss). Foram feitas imagens em contraste de interferência diferencial (DIC) e contraste de fluorescência, com excitação à ~365 nm e emissão à ~495 nm.

4.9.2. Dissecção das larvas.

A fim de obter parâmetros visuais da distribuição da infecção (nodulação, melanização e integridade de órgãos internos) foi feita a dissecção das larvas. Cinco larvas, de cada tratamento (conforme **item 4.6**) foram congeladas por pelo menos 24 h à -4 °C, seccionadas na região ventral com o auxílio de um bisturi n° 24, colocadas sobre uma placa de Petri e visualizadas sob estereomicroscópio binocular (SMZ 160T, Motic®) e sistema de iluminação (Jenalux 20). Com o auxílio de uma pinça, os órgãos foram expostos para melhor visualização de estruturas internas e foram feitas fotografias com câmera acoplada (Moto G8 Power lite xt2055, xt2055-2, 16 Mp, resolução 4619x3464 pixels) para registro das visualizações (Admella & Torrents, 2023; Torres *et al.* 2020).

4.10. Análises estatísticas.

Todos os experimentos foram feitos em triplicata. Sendo que as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.0.2) por One-way ANOVA e os testes aplicáveis a cada tipo de resultado ($p < 0,05$).

4.11. Tratamento e descarte de rejeitos.

Os materiais contaminantes foram descontaminados por autoclavagem a 121 °C, 1,1 atm por 20 min e depois descartados em local apropriado. Os perfurocortantes foram descartados em embalagens Descarpack.

5. RESULTADOS

5.1. Determinação da dose de *C. albicans* para a infecção e morte das larvas de *G. mellonella*.

Como a literatura já demonstra (Dinh *et al.*, 2021), o primeiro passo para o uso adequado de *G. mellonella* como modelo de estudo em infecções por patógenos é determinar quais são as concentrações os inóculos adequadas para levar à progressão da infecção e morte das larvas. Assim a **Figura 11** demonstra a probabilidade de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* nas diferentes doses fúngicas testadas.

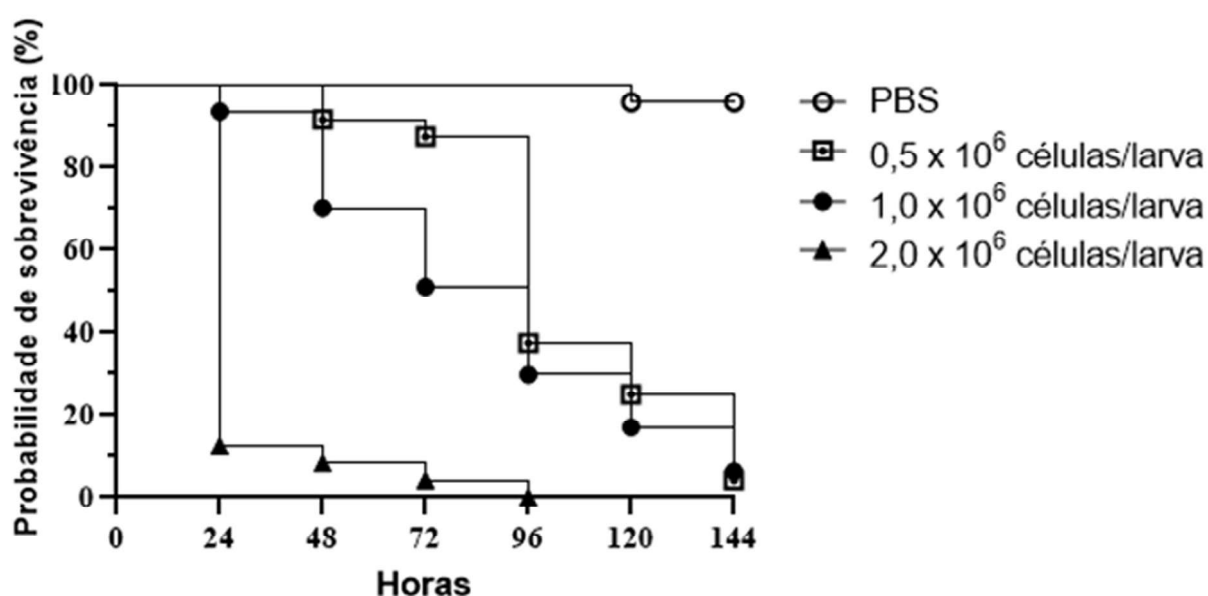


Figura 11: Curvas Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* à *C. albicans* SC5314/ATCC MYA-2876 ao longo de 144 h (6 dias). Todas as curvas são significativas entre si pelos testes de Gehan-Breslow-Wilcoxon e Mantel-Cox ($P < 0,0001$, 95% CI), exceto entre as curvas $0,5 \times 10^6$ células/larva e $1,0 \times 10^6$ células/larva no teste de Mantel-Cox, $n=24$, PBS foi usado como controle.

Observa-se que a dose de $2,0 \times 10^6$ células/larva leva à uma baixa probabilidade (12,5%) de sobrevivência nas primeiras 24 h, e 100% de morte em 96 h. Também é possível observar que tanto a dose de $0,5 \times 10^6$ células/larva como $1,0 \times 10^6$ células/larva levaram a progressão da doença mais constante durante os seis dias de infecção e morte ao final do experimento. O IS, que também foi analisado, corrobora com esses resultados, uma vez que demonstra que a concentração de $2,0 \times 10^6$ células/larva levou a uma queda abrupta em todas as categorias em 24 h. Uma rápida melanização e perda de movimento quando estimulada, o que não ocorre nos

demais tratamentos. Destaca-se a concentração de $0,5 \times 10^6$ células, onde o IS se mantém maior até às 120 h quando comparado à concentração de $1,0 \times 10^6$ células (Figuras 12 e 13, Tabela S5). Também é possível observar diferença nos desvios-padrão nas curvas de sobrevivência das duas concentrações no tempo de 72 h (Figura S1).

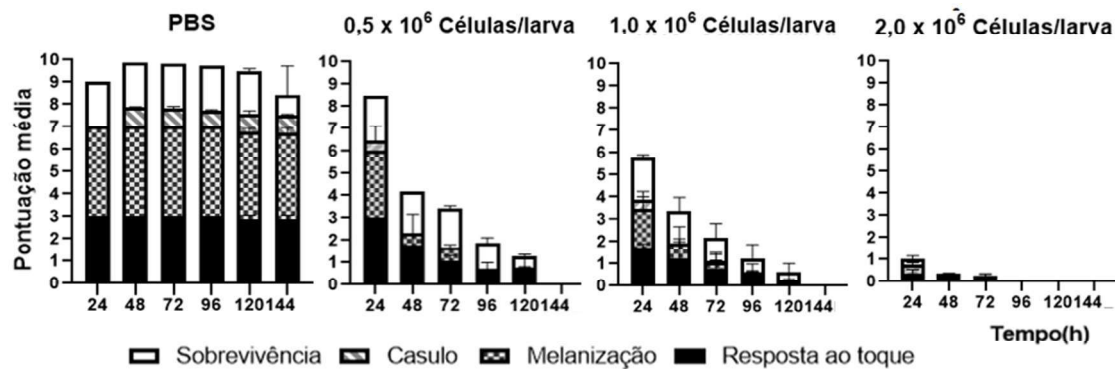


Figura 12: Índice de saúde das larvas de *G. mellonella* para infecções em diferentes concentrações de *C. albicans* SC5314/ATCC MYA-2876 (n=24). PBS foi usado como controle. Os ISs totais a cada 24 h são significativos em relação ao controle ($p < 0,0001$), bem como entre $0,5 \times 10^6$ e $2,0 \times 10^6$ células/larva ($p < 0,1$), entretanto $0,5 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^6$ células/larva não são significativamente diferentes, de acordo com o Two-way ANOVA teste de Turkey ($p < 0,0001$).

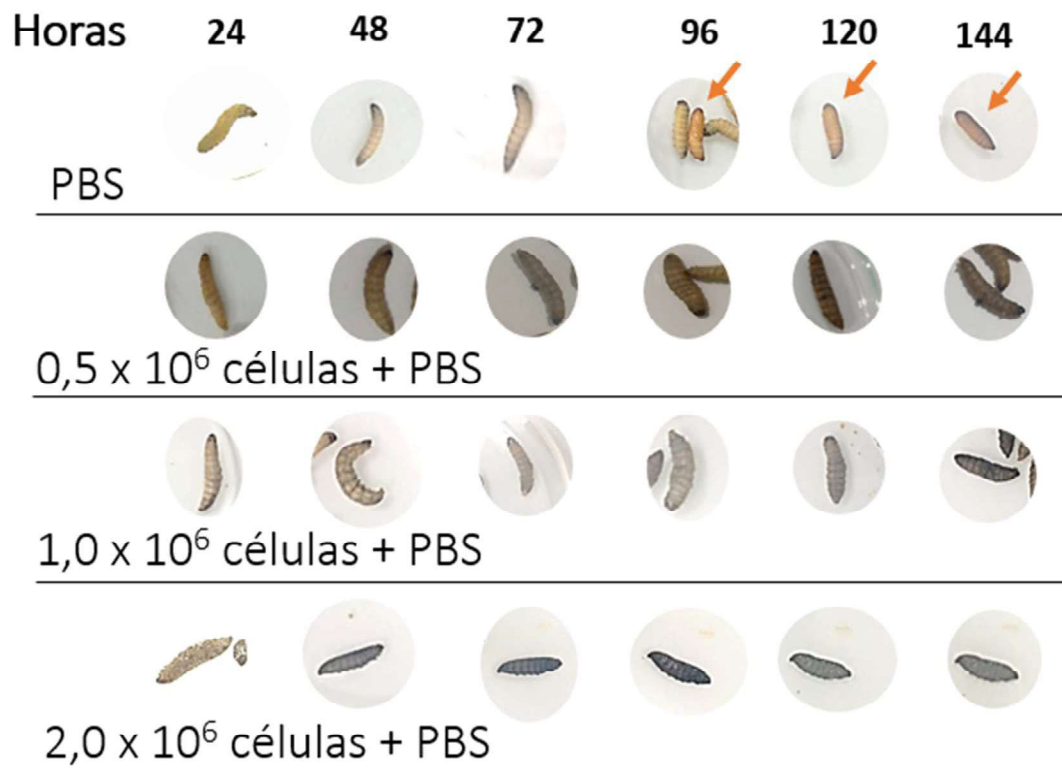


Figura 13: Imagens representativas das larvas em diferentes tratamentos durante as 144 h do experimento. A seta laranja indica o aparecimento de pupas.

Os resultados do IS podem ser analisados separadamente (**Tabelas Suplementares 1 a 5**). Para as categorias analisadas, todas as concentrações testadas foram significativamente diferentes ao controle com PBS. A concentração fúngica de $2,0 \times 10^6$ células/larva foi estatisticamente significativa em relação a concentração de $0,5 \times 10^6$ nas categorias “resposta ao toque”, “sobrevivência” e no IS total. A concentração de $1,0 \times 10^6$ células/larva foi estatisticamente significativa apenas na categoria “sobrevivência”. Dentre as concentrações fúngicas de $1,0 \times 10^6$ células/larva e $0,5 \times 10^6$ células/larva, não houve diferença significativa entre as categorias, com exceção da “sobrevivência” no tempo de 72 h (**Tabela S4**).

Dessa forma, a concentração fúngica letal (DLF₁₀₀) de *C. albicans* para *G. mellonella* escolhida para seguir nos experimentos posteriores foi a concentração de $0,5 \times 10^6$ células/larva.

5.2. Eficácia de WR sobre concentração de 2.000 células/mL de *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876

Os ensaios anteriores que avaliaram a eficácia de WR sobre as células de *C. albicans* foram realizados com a cepa CE 022 (Lucas *et al.*, 2024; Toledo *et al.*, 2021), enquanto o presente estudo realizou testes com cepa clínica SC 5314/ATCC MYA-2876. Assim, como mostra a **Tabela 5** e a **Figura 14**, pode-se observar que para a indução de morte celular da cepa clínica é necessária uma concentração superior à encontrada para a cepa não-clínica (27,5 μ M) usando a mesma densidade celular de 2.000 células/mL. Portanto a dose letal de WR capaz de induzir a morte de 99% das células fúngicas (DL₉₉) foi determinada em 60,0 μ M, sem diferenças estatísticas significativas entre as temperaturas de 30 °C (padrão dos testes anteriores) e 37 °C (temperatura utilizada nos ensaios de incubação das larvas) e também em relação à concentração de 55,5 μ M. A DL₉₉ foi definida como a concentração em μ M de WR que no tempo de incubação de 1 h a 30 °C mata 99% da população de células *C. albicans* do ensaio.

Tabela 5: Concentrações de WR e morte celular de *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876. *Os cálculos foram feitos a partir da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). O desvio padrão está representado para cada tratamento que foi feito em triplicata (n=9). (a) Valores que não são significativos entre si (One-way ANOVA Turkey test) (P<0,0001).

Tratamento	Concentração (μM)	Temperatura (°C)	UFC*	% de morte
Controle	0	30	203 ±3,6	0
WR	27,5	30	112 ±16	45,9
	32,0	30	110 ±8	45,8
	55,5	30	2 ±1	99,0 ^a
	60,0	30	1 ±1	99,5 ^a
	60,0	37	0,66 ±1	99,7 ^a

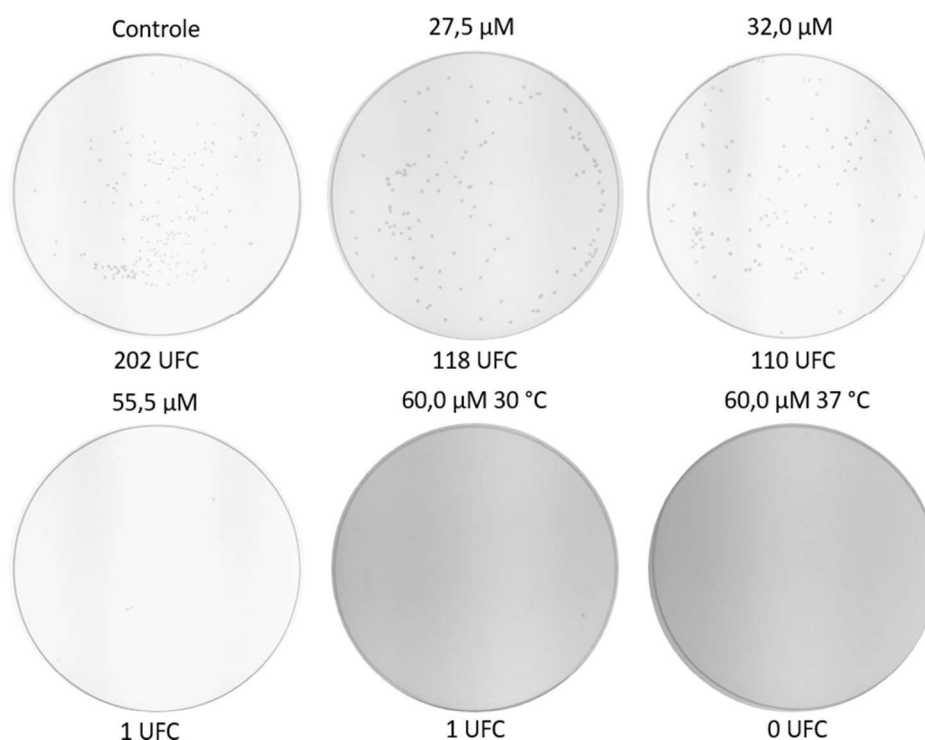


Figura 14: Imagens representativas (n=9) das placas de Petri após 24 h de incubação a 30 ou 37 °C na ausência (controle) e presença de diferentes concentrações de WR. As UFC de *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-28764 das respectivas placas estão mostradas embaixo de cada imagem.

5.3. Dose letal de WR e FCZ sobre a DLF₁₀₀ de *C. albicans* para as larvas de *G. mellonella*.

Como a LD₉₉ foi determinada como 60,0 μM ou 55,5 μM para a cepa clínica de *C. albicans* na concentração de 2.000 células/mL, foi necessário verificar se essa dose também seria capaz de induzir a morte celular de 0,5 x 10⁶ células, que é DLF₁₀₀ de *C. albicans* para as larvas de *G. mellonella*. A **Figura 15.A** mostra que em relação à densidade óptica (OD) no comprimento de 620 nm, foram encontrados resultados significativos entre as duas diferentes concentrações testadas e o controle com uma redução de 93,1% de crescimento na concentração de 60,0 μM e de 90,3% na

concentração de 55,5 μM . Resultado confirmado em **Figura 15.B**, onde observa-se que a concentração de 60,0 μM reduz a viabilidade das leveduras em 97,4%, valor próximo ao encontrado para 2.000 células/mL (Tabela 4). Também não houveram diferenças estatísticas significativas em relação à concentração de 55,5 μM (92,0%). Em relação ao fármaco de referência FCZ, pode-se observar que sua ação fungistática foi confirmada já que houve inibição significativa do crescimento e sobrevivência de cerca de 50% no ensaio de viabilidade.

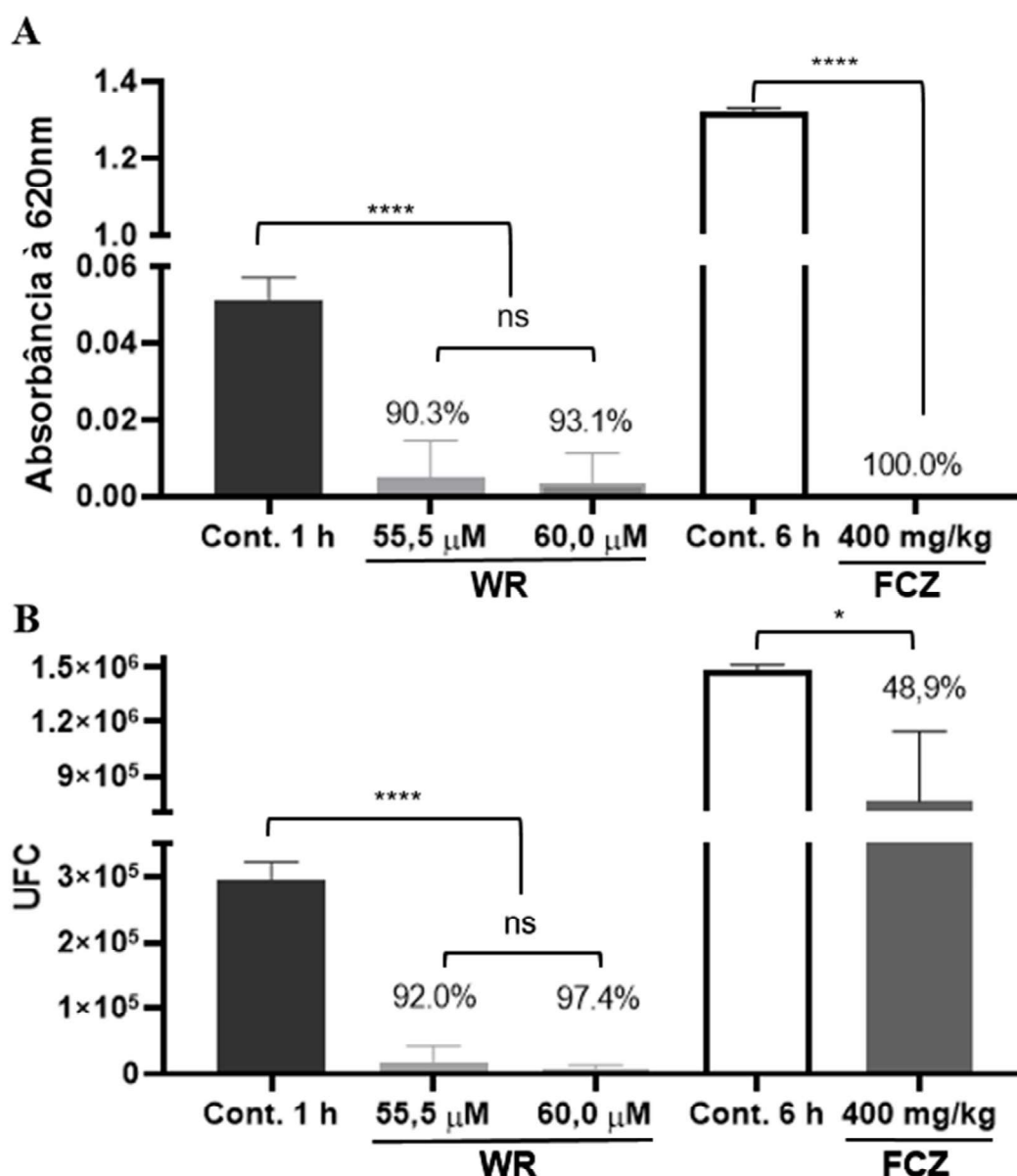


Figura 15: Análise da atividade inibitória nas LD₉₉ de WR (55,5 μM e 60,0 μM) e da dose recomendada de FCZ (400 mg/kg) para *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876 sobre a DLF₁₀₀ de *C. albicans* para *G. mellonella* ($0,5 \times 10^6$ células/larva). (A) Ensaio de espectrofotometria a 620 nm. O eixo esquerdo mostra a diferença de absorbância no início e fim do tempo de indução de morte celular para o peptídeo WR, o eixo da direita mostra a porcentagem de inibição calculada a partir das médias dos tratados e do

controle. (B) Ensaio de viabilidade celular. Os valores acima das barras representam as respectivas porcentagens de inibição. São mostradas as significâncias em relação ao controle, t test ($P < 0,0001$). ns, não significativo. Tempo de incubação de WR foi de 1 h e FCZ de 6 h.

5.4. Avaliação da progressão da carga fúngica e da densidade de hemócitos.

A carga fúngica é um dos parâmetros relacionados ao estabelecimento e progressão da infecção e indicação de fatores de virulência. A **Figura 16.A** evidencia que a carga fúngica aumenta a partir de 4 h de experimento se mantendo estável até 48 h de experimento. Já a densidade de hemócitos, que está diretamente relacionada à resposta imune das larvas, apresenta um pico na produção no tempo 24 h e diminuição em 48 h (**Figura 16.B**). Nos tempos de 1, 4 e 6 h as densidades de hemócitos são estatisticamente iguais.

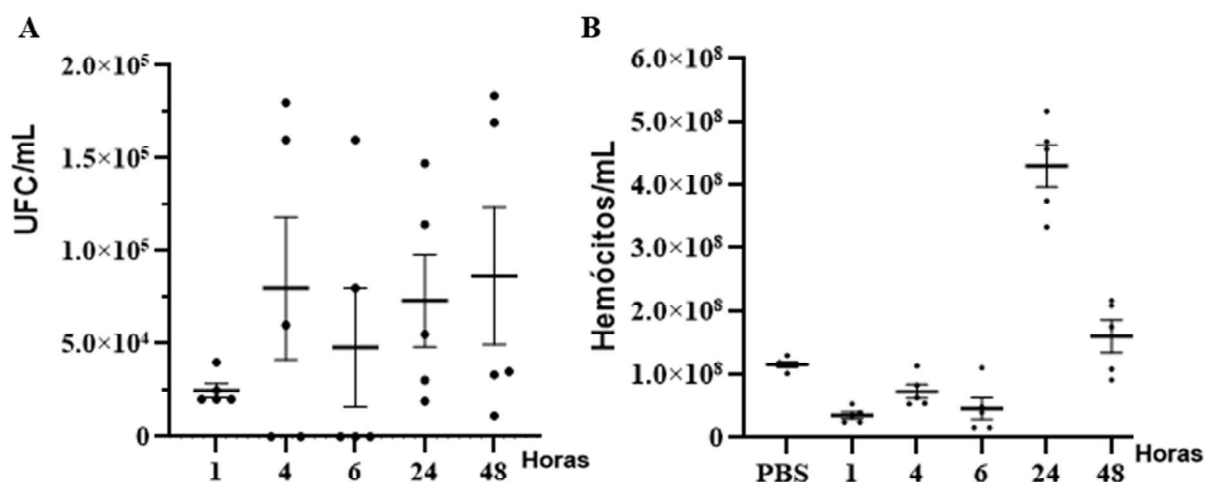


Figura 16: Parâmetros para a definição do padrão de tratamento de *G. mellonella* com o peptídeo WR. (A) Carga fúngica de larvas infectadas, onde cada ponto representa a carga individual, os valores de 4, 6, 24 e 48 h não são significativos entre si, mas são significativos em relação à 1 h (Ordinary One-way ANOVA Turkey Test, $P < 0,05$). (B) Densidade de hemócitos nas larvas de *G. mellonella* infectadas com a LD de *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876 em diferentes tempos. Cada ponto representa a densidade individual ($n=5$, para cada tempo) e estão representadas as médias e o SEM. Os desvios-padrão são estatisticamente diferentes (Bartlett test, $P < 0,0001$; Brown-Forsythe test, $P = 0,0004$). A densidade média no tempo 24 h é estatisticamente significativa em relação a todas as outras (Ordinary One-way ANOVA Turkey Test, $P < 0,0001$).

Considerando que já possa existir a microbiota circulante na hemolinfa, na **Figura 17** é possível ver o crescimento de colônias oriundas da hemolinfa de *G. mellonella* saudável, também é possível diferenciar visualmente pelas características da cultura ao menos três tipos de colônias, indicando três microrganismos diferentes,

dentro dos limites desta pesquisa e de acordo com as bases bibliográficas consultadas, não há estudos que indiquem ou caracterizem a microbiota presente na hemolinfa das larvas. Na **Figura 17** é possível observar o aumento do número de colônias em ágar Sabouraud a partir da hemolinfa das larvas. Para confirmar a presença de *C. albicans* 14 colônias foram escolhidas aleatoriamente de cada tratamento e cultivadas em ágar cromogênico e a cor esverdeada indica a presença positiva de *C. albicans*.

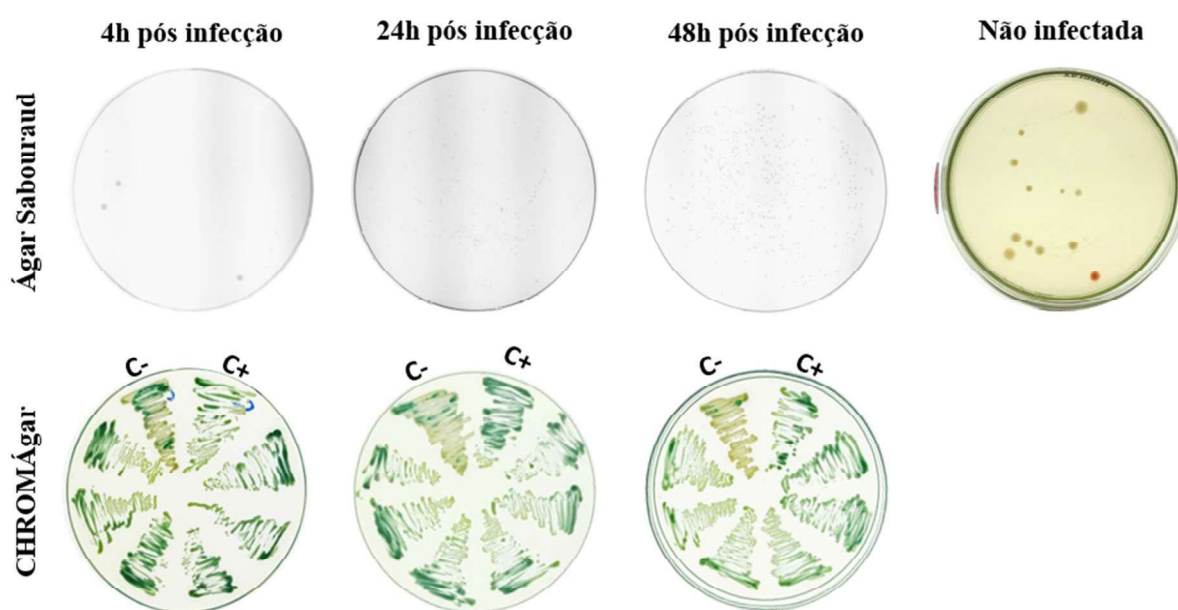


Figura 17: Placas representativas dos ensaios de carga fúngica. Placas de Petri da hemolinfa de *G. mellonella* utilizadas para contagem de UFC no ensaio de carga fúngica, plaqueadas em ágar Sabouraud suplementado com ampicilina (50 mg/mL) e cloranfenicol (34 mg/mL). Abaixo as placas de Petri das colônias de *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876 (controle positivo: C+), *C. tropicalis* ATCC 750 (controle negativo: C-) e colônias aleatórias (n=14 para cada tempo de infecção) plaqueadas em ágar cromogênico. Por fim, placa de Petri plaqueada com hemolinfa de *G. mellonella* saudável (n=5), onde é possível distinguir visualmente, pelas características da cultura, três tipos de colônias diferentes.

Assim, a partir dos resultados obtidos com as análises de sobrevivência, foi entendido que o tratamento precisa ser iniciado antes de 72 h. Considerando a análise da carga fúngica que permitiu determinar que a estabilidade da infecção a partir de 4 h, esta janela (4 a 72 h, pós inóculo) seria adequada para realizar o tratamento com o peptídeo. Sendo assim, somando-se a interpretação da densidade de hemócitos, que tem seu pico em 24 h, entende-se que o tratamento deveria ser composto por três doses: 8, 32 e 56 h após a infecção do patógeno.

5.5. Testes de toxicidade e eficácia do tratamento com WR *in vivo*.

Como foi possível determinar *in vitro* que o peptídeo é capaz de inibir o crescimento da DLF₁₀₀ de $0,5 \times 10^6$ células/larva bem como de diminuir a viabilidade celular para a mesma quantidade de células, foi possível dar início aos testes *in vivo*. Assim, a **Figura 18A** mostra a curva de probabilidade de sobrevivência para os diferentes ensaios realizados. Observa-se então que para as larvas injetadas com PBS não houve alteração na probabilidade de sobrevivência, o mesmo ocorre com as larvas injetadas apenas com WR. Quando comparado ao fármaco de referência FCZ, a probabilidade de sobrevivência é maior já que em 72 h a mesma decresce para 6,7%, ou seja, o peptídeo é menos tóxico para as larvas do que o fármaco de referência, não demonstrando danos às larvas nem diminuindo a sua viabilidade.

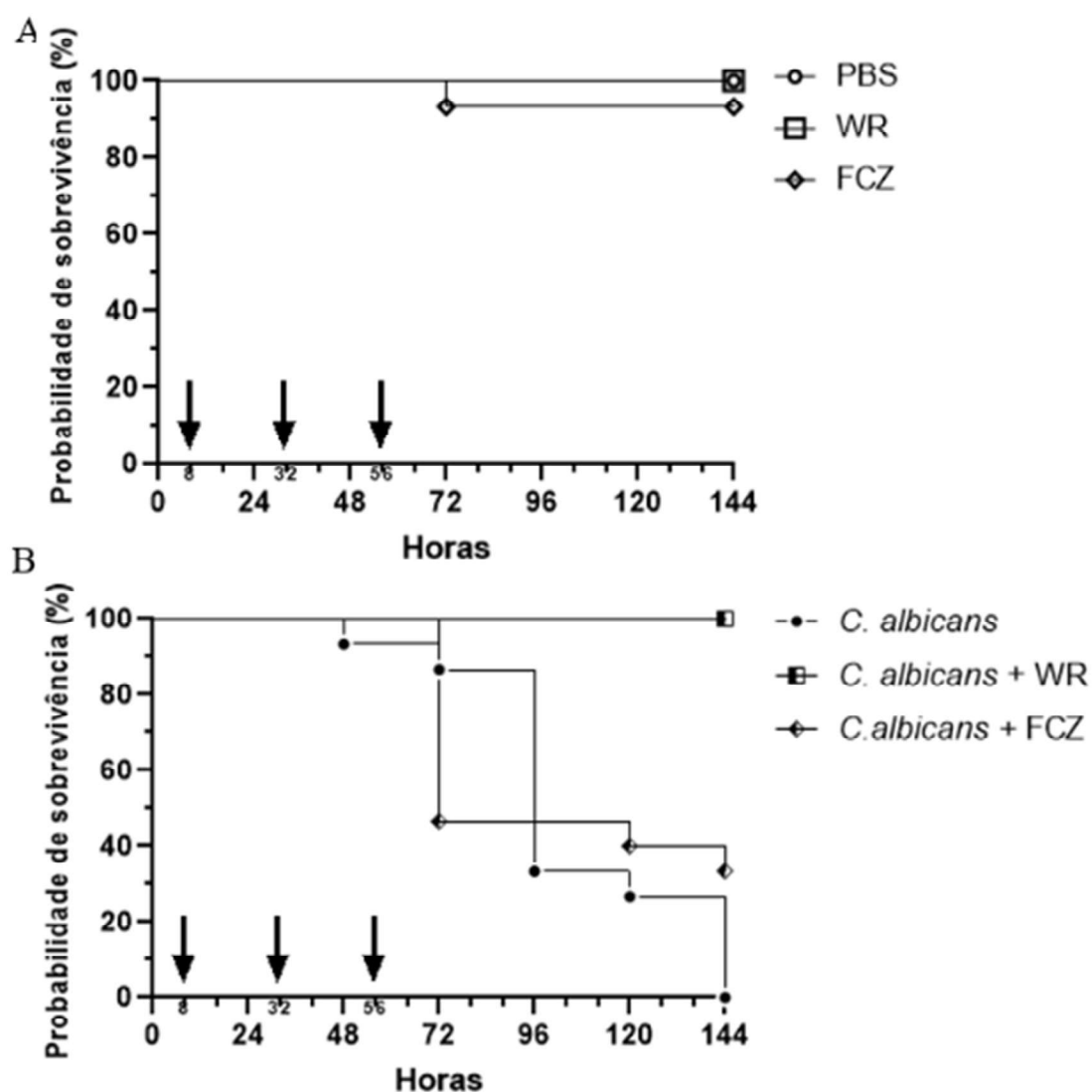


Figura 18: Curvas Kaplan-Meier de probabilidade de sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* em diferentes tratamentos ao longo de 144 h (6 dias). Em (A) ensaio de toxicidade e em (B) o ensaio de eficácia. As curvas para os ensaios com PBS, FCZ, WR e *C. albicans* + WR não são diferentes

estatisticamente entre si, mas são em relação às curvas *C. albicans* e *C. albicans* + FCZ. As curvas *C. albicans* e *C. albicans* + FCZ não são diferentes estatisticamente entre si. Por fim, a curva *C. albicans* + WR é estatisticamente significativa tanto em relação à *C. albicans* quanto à *C. albicans* + FCZ ($P < 0,001$, testes Gehan-Breslow-Wilcoxon e Mantel-Cox). As setas representam o momento da injeção de PBS, WR ou FCZ, os horários estão indicados em números menores.

Já para as larvas infectadas com o fungo e não tratadas, a probabilidade de sobrevivência é de 0% em 144 h. Entretanto, as larvas infectadas quando tratadas com WR tem probabilidade de sobrevivência de 100% durante as 144 h (**Figura 18B**). O que não pode ser observado, com tamanha intensidade, para o fármaco FCZ. Para esse, a sobrevivência cai abruptamente após encerrado o tratamento ficando em 43,3% em 72 h, e continua decrescendo até atingir 33,3% em 144 h.

Os dados das curvas de sobrevivência são corroborados pelo IS, conforme mostra a **Figura 19**. Conforme já demonstrado anteriormente, larvas injetadas com PBS não têm seu IS alterado durante o experimento, o mesmo ocorre com as larvas injetadas com WR. Como já mostrado anteriormente, além de o peptídeo não alterar a taxa de sobrevivência das larvas, também não causa alterações nos parâmetros de saúde avaliados. Entretanto, as larvas injetadas com FCZ têm seu IS diminuído a partir de 72 h.

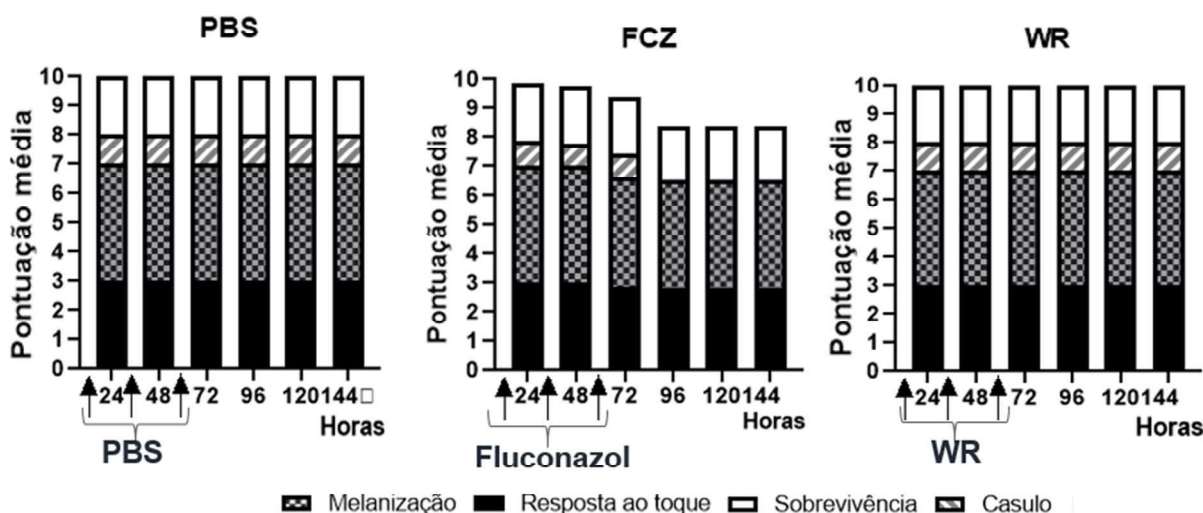


Figura 19: Índice de saúde das larvas de *G. mellonella* para o ensaio de toxicidade. O PBS foi usado como controle. Os ISs totais do fármaco FCZ e do peptídeo WR não são significativos em relação ao controle durante todo o experimento. Entre os resultados de FCZ e WR também não há diferença estatística significativa, de acordo com o Two-way ANOVA teste de Turkey.

Na **Figura 20** pode-se reafirmar que larvas infectadas com a DLF₁₀₀ decrescem seu IS progressivamente. Quando tratadas com FCZ ou WR vemos um aumento no seu IS, quando comparado com as larvas apenas infectadas, parâmetro que volta a decrescer quando o tratamento é terminado. O tratamento com FCZ não tem diferença estatística significativa, logo não fornece a recuperação adequada das larvas. Já aquelas tratadas com WR têm um aumento maior na pontuação do IS, que é significativo em relação as larvas apenas infectadas com *C. albicans* e não tratadas (**Tabelas Suplementares 6-10**). Ainda, há uma queda menos acentuada daquela demonstrada pelo FCZ, havendo diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) entre os dois tratamentos. Também é nítido que as pontuações continuam maiores nos dias posteriores do que aquelas apresentadas pelos outros ensaios.

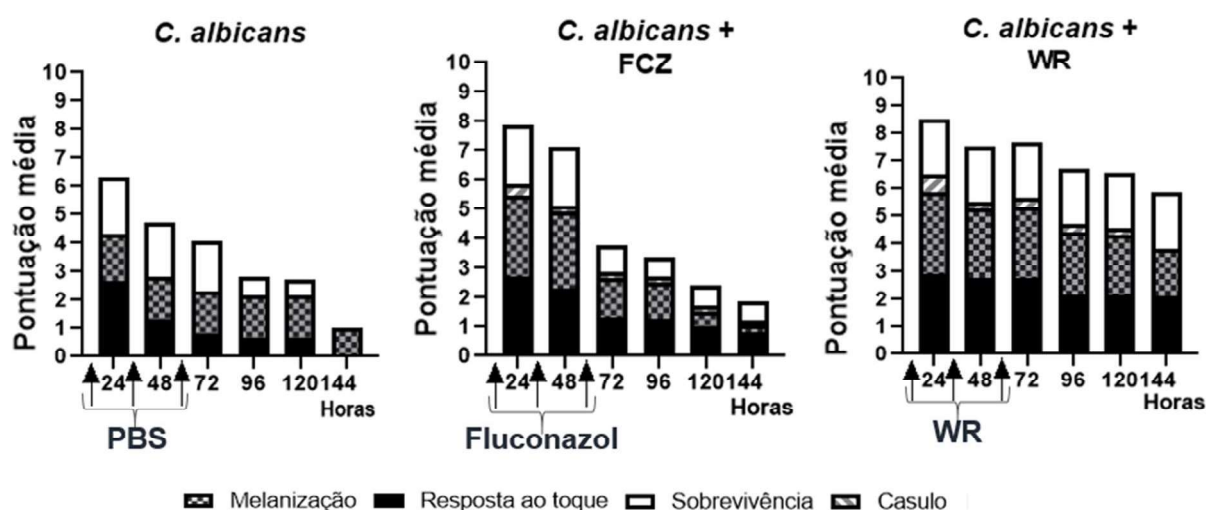


Figura 20: Índice de saúde das larvas de *G. mellonella* para o ensaio de eficácia. O PBS foi usado como controle. Os ISs totais do peptídeo WR são significativos em relação ao controle durante todo o experimento ($p < 0,0001$). Já para o fármaco FCZ não há diferença estatística significativa. Entre os resultados de FCZ e WR também há diferença estatística significativa ($p < 0,001$), de acordo com o Two-way ANOVA teste Turkey.

Comparativamente também foram feitos os ensaios de quantificação de carga fúngica e quantidade de hemócitos. Como mostra a **Figura 21**, não houve diferença estatística significativa na carga fúngica no tempo de 24 h, mas houveram diferenças nas densidades de hemócitos no mesmo tempo. Em 48 h não houveram diferenças estatísticas significativas tanto entre as larvas tratadas e não tratadas com WR, como em relação ao controle. Vale ressaltar que foi considerada a quantidade individual de UFC e densidade de hemócitos por larva.

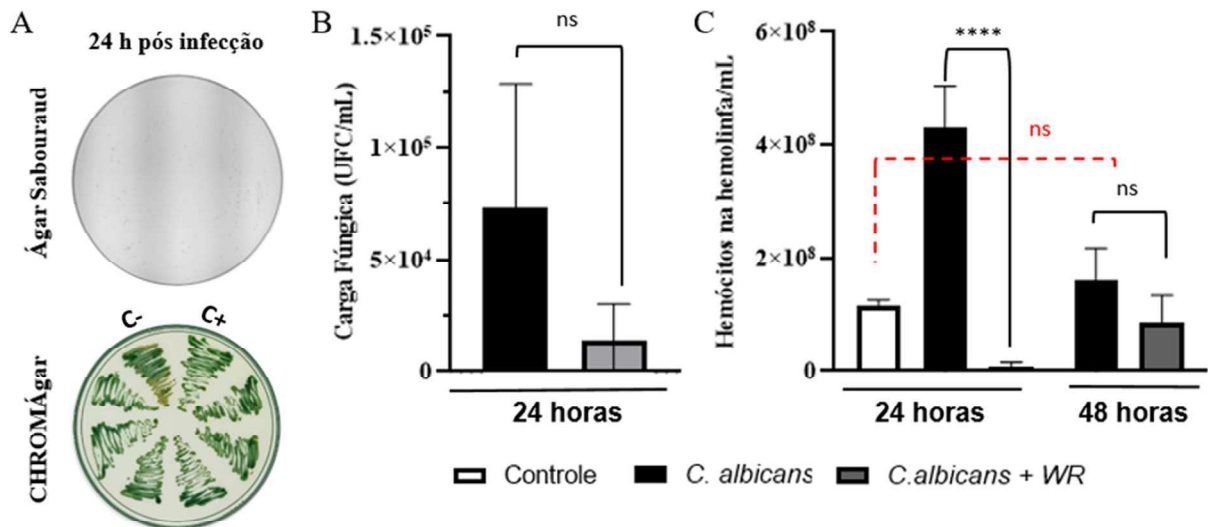
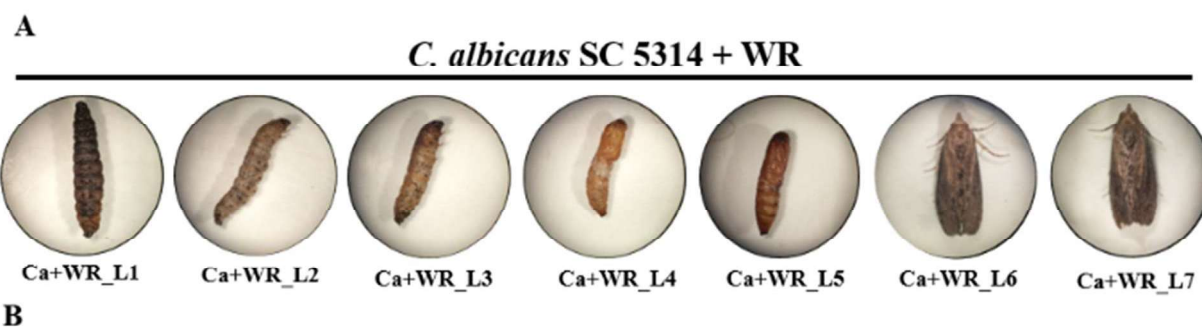


Figura 21: Parâmetros de progressão da infecção fúngica em *G. mellonella* e tratada com o peptídeo WR. (A) Placas de petri representativas para a contagem de UFC e confirmação da presença de *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876 em ágar cromogênico: *C. albicans* SC 5314/ ATCC MYA-2876 (controle positivo: C+), *C. tropicalis* ATCC 750 (controle negativo: C-); (B) Carga fúngica de larvas infectadas os valores não são significativos (ns) entre si (Ordinary One-way ANOVA Turkey Test); (B) Densidade de hemócitos nas larvas de *G. mellonella* infectadas com a DLF₁₀₀ de *C. albicans* com e sem tratamento com WR, os resultados tanto para 24 h são estatisticamente significativos em entre as tratadas com WR e as não tratadas, mas não significativos (ns) em 48 h (Ordinary One-way ANOVA Turkey Test, $P < 0,0001$). Foi considerado cada ponto individualmente e os gráficos representam as médias e desvios-padrão ($n=5$, para cada tempo). O controle é composto por larvas intocadas.

A fim de se obter dados mais prolongados dos efeitos de WR sobre a saúde das larvas foi feita uma análise continuada por mais oito semanas para o ciclo de vida da *G. mellonella* fosse completado com as larvas chegando a fase adulta (Fig. 8). Na **Figura 22** podemos ver que duas das larvas morreram ainda no estágio larval. Das cinco larvas que continuaram seu processo de desenvolvimento, duas chegam à fase adulta, completando o ciclo de vida, demonstrando a reversão do processo infeccioso. Também é possível observar que não houveram danos morfofisiológicos visíveis àquelas que atingiram a fase adulta/imago e que não houve atraso no ciclo de vida normal dessas. No entanto, observamos que três larvas interromperam seu desenvolvimento nos estágios de pré-pupa/pupa.



Identificação	Estágio	Semana da morte*	Observações**
Ca+WR_L1	Larva	1	Larva completamente melanizada, imóvel, sem formação de casulo
Ca+WR_L2	Larva	4	Larva com alguns focos de melanização, move-se pouco apenas quando estimulada, sem formação de casulo
Ca+WR_L3	Pré-pupa	2	Focos de melanização, sem movimento, sem formação de casulo, apenas a retração dos segmentos posteriores pode ser observada
Ca+WR_L4	Pré-pupa	2	Focos de melanização, sem movimento, sem formação de casulo, pupação incompleta
Ca+WR_L5	Pupa	4	Poucos focos de melanização, movimento quando estimulada apenas da parte posterior (normal), pupação completa
Ca+WR_L6	Imago	8	Sem focos de melanização, número/tamanho de antenas e patas normais, voo normal, movimentação na presença de luz normal
Ca+WR_L7	Imago	8	Sem focos de melanização, número/tamanho de antenas e patas normais, voo normal, movimentação na presença de luz normal

Figura 22: Avaliação pós-tratamento com WR. (A) Imagens do desenvolvimento larval quatro semanas após o término do ensaio de eficácia do peptídeo WR. (B) Tabela com os parâmetros morfológicos externos das larvas quatro semanas após o término do ensaio de eficácia do peptídeo WR. (*) Semanas após o término do experimento de 144 h. (**) Observações analisadas quatro semanas após o término do ensaio de eficácia do peptídeo WR (n=7).

5.6. Avaliação de parâmetros bioquímicos da hemolinfa larval.

5.6.1. Dosagem de carboidratos e proteínas da hemolinfa larval.

Como a literatura já aponta, as infecções por patógenos podem alterar a concentração de carboidratos e proteínas presentes na hemolinfa, ambos relacionados ao estresse causado pela infecção (Barakat *et al.*, 2019; Sevcan *et al.*, 2017; Uçkan *et al.*, 2021). Comparativamente, é possível observar que não há diferenças estatísticas significativas entre as concentrações de proteínas entre a hemolinfa das larvas infectadas tratadas ou não com WR (**Figura 23**), mas ambos se diferem estatisticamente do controle com PBS. Em relação à concentração de glicose não há diferenças estatísticas significativas entre os diferentes tratamentos.

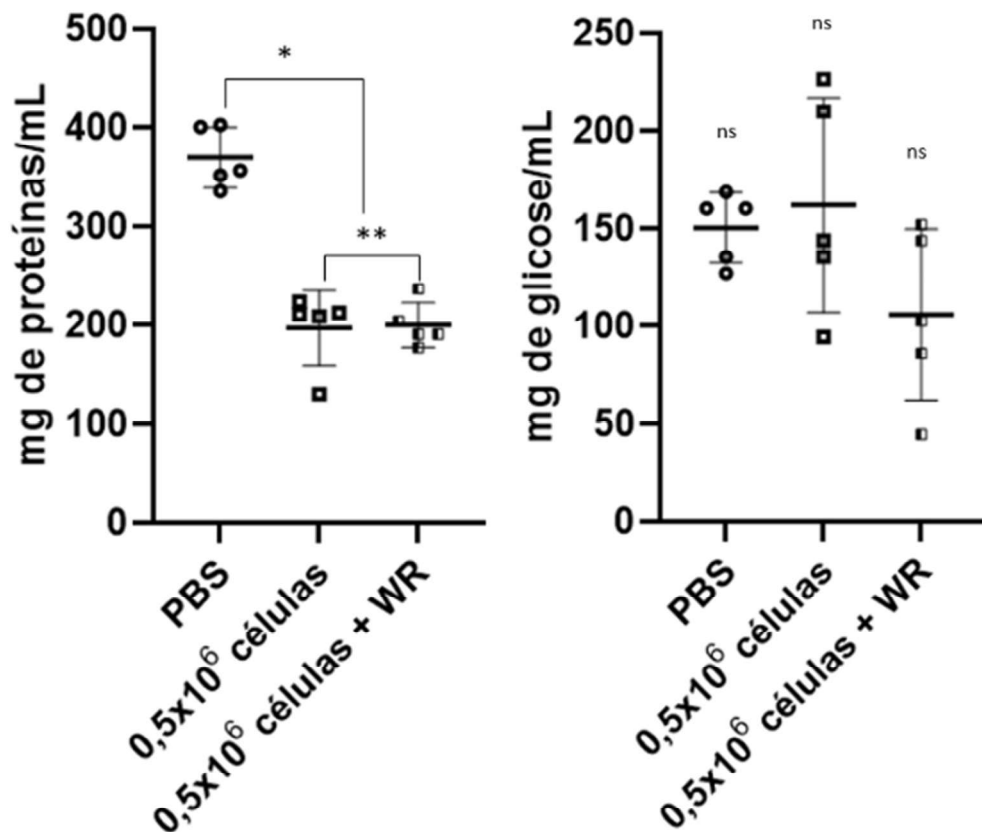


Figura 23: Dosagem de proteínas e carboidratos em larvas após 120 h do início de diferentes tratamentos. (A) Dosagem de proteínas pelo método BCA. Os valores foram calculados a partir de fórmula de regressão linear da curva-padrão com Ovoalbumina ($R^2 \approx 0,99$). (B) Dosagem de glicose na hemolinfa das larvas por reação com DNS. Os valores foram calculados a partir de fórmula de regressão linear da curva-padrão com glicose ($R^2 \approx 0,99$). (*) Valores com significância entre si e (ns) sem significância estatística entre si (One-Way ANOVA teste de Turkey, $p < 0,001$).

5.6.2. Perfil proteico da hemolinfa larval

Para verificar se há alteração no perfil proteico da hemolinfa e se WR fica circulante na hemolinfa durante o tratamento foram feitas análises do perfil proteico. Como mostra a **Figura 24**, existem proteínas que passam a ser expressas e outras reprimidas como resposta à infecção, em comparação com as larvas intocadas (Unt.) e injetadas com PBS. Também é possível observar diferenças nos perfis proteicos em relação às larvas infectadas com *C. albicans* tanto em comparação com as intocadas como as injetadas com PBS. As infectadas e tratadas com WR exibem um perfil proteico que se difere dos demais incluindo uma banda proteica diminuída em relação às larvas intocadas ou injetadas com PBS, no entanto com aumento em relação às larvas infectadas. Nota-se o desaparecimento de WR na amostra Ca+WR.

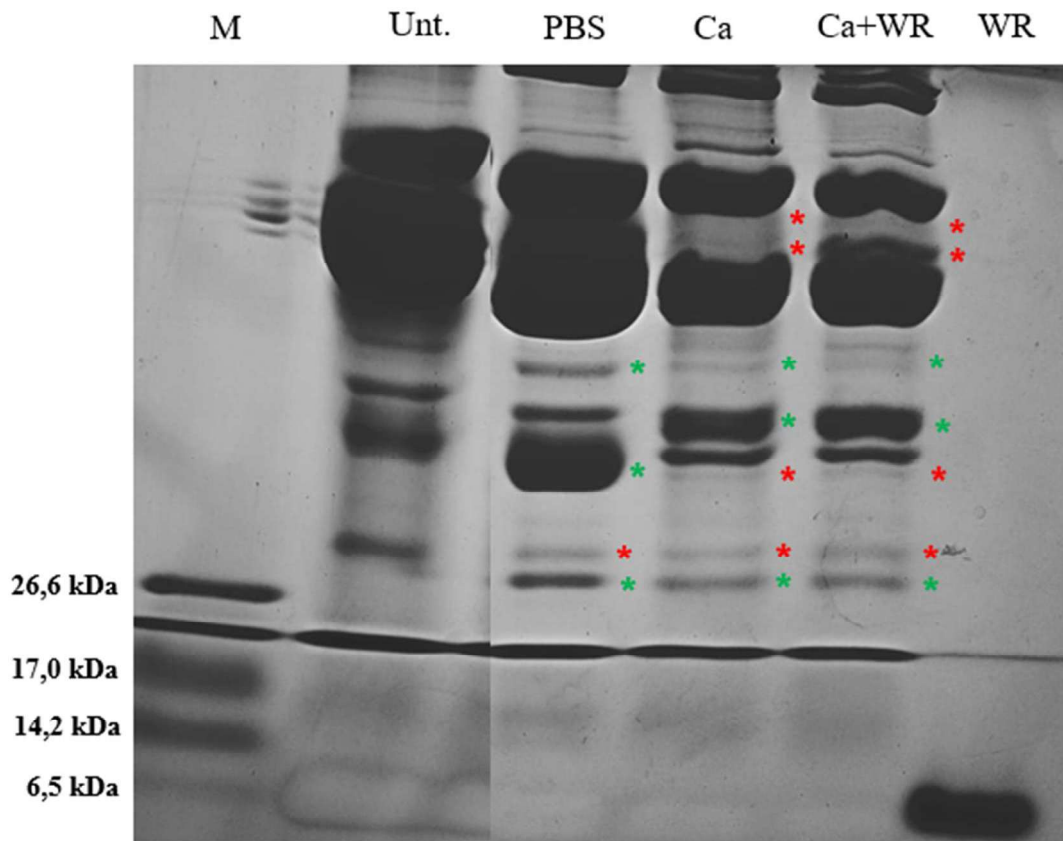


Figura 24: Análise do perfil proteico por eletroforese em diferentes tratamentos. É possível notar a diferença nos perfis entre os diferentes tratamentos, com algumas proteínas apresentando aumento em relação ao controle intocado (Unt). A banda característica de WR não aparece em nenhum dos tratamentos. (M) Marcador de baixa massa molecular; (Unt.): Hemolinfa de larvas intocadas; (PBS): Hemolinfa de larvas que receberam quatro injeções de PBS em diferentes tempos; (Ca): Hemolinfa de larvas infectadas com *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876 e injetadas com três doses de PBS; (Ca+WR): Hemolinfa de larvas infectadas com *C. albicans* e injetadas com três doses de WR e (WR): apenas o peptídeo WR. Asteriscos verdes indicam as bandas proteicas que tiveram aumento em relação ao controle Unt. e asteriscos vermelhos indicam as bandas proteicas que tiveram diminuição em relação ao controle Unt.

Como a proteólise de AMPs é uma das principais barreiras em seu desenvolvimento nos testes pré-clínicos e não foi observada a presença da banda de WR no perfil proteico da amostra Ca+WR, um zimograma foi realizado a fim de avaliar a presença de proteases na hemolinfa larval. Assim, a **Figura 25** mostra a presença de bandas com atividade proteolítica tanto na hemolinfa de larvas intocadas (Unt.) como na hemolinfa de larvas infectadas com o fungo, mostrando também que existem diferenças na presença dessas proteases entre os tratamentos. Este resultado indica que o desaparecimento de WR na hemolinfa pode ser devido a degradação proteica.

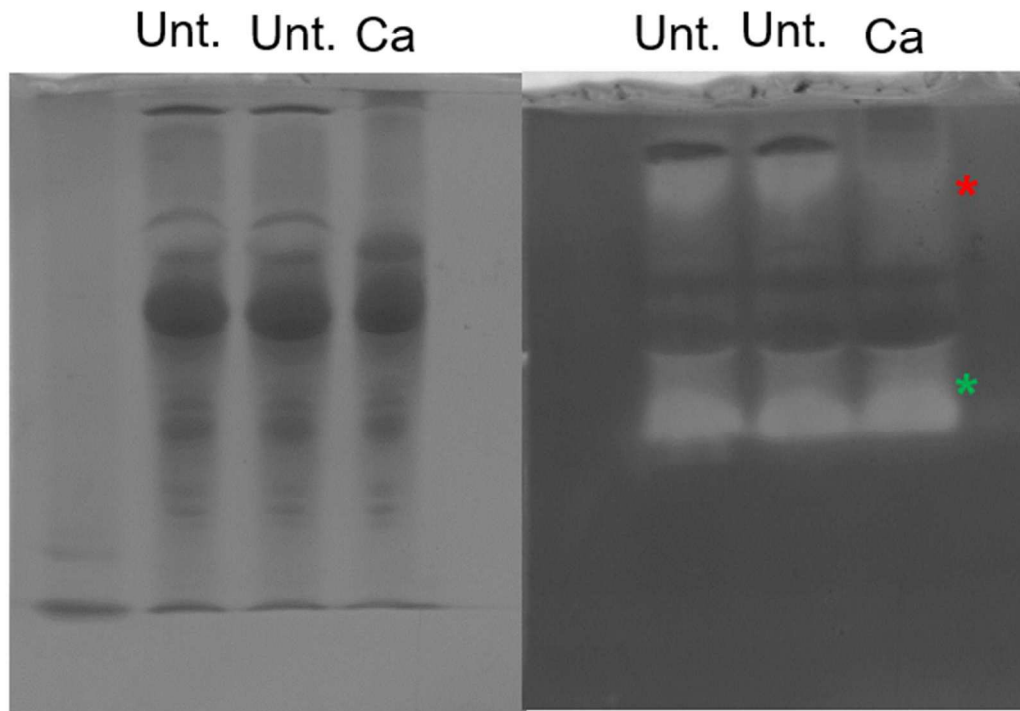


Figura 25: Zimografia da hemolinfa de *G. mellonella* em diferentes tratamentos. É possível ver a presença de diferentes proteínas com atividade proteolítica em especial uma banda que não está presente nos controles Unt. e aparece no infectado com *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876 (asterisco vermelho) e outra banda que está presente no controle Unt. e não aparece no infectado com *C. albicans* (asterisco verde). (Unt.): Hemolinfa de larvas intocadas e (Ca): Hemolinfa de larvas infectadas com *C. albicans* e injetadas com três doses de PBS. Asteriscos vermelhos indicam as proteases, cuja atividade diminuiu em relação ao controle Unt. e asteriscos verdes indicam as proteases que tiveram atividade aumentaram em relação ao controle Unt.

5.7. Avaliação de parâmetros morfofisiológicos.

5.7.1. Microscopia óptica

Para ter mais clareza acerca da dinâmica dos hemócitos durante a infecção por *C. albicans* e se existem diferenças com as larvas tratadas com WR, foi feita uma microscopia óptica da hemolinfa de larvas infectadas com *C. albicans* e de larvas infectadas com *C. albicans* e tratadas com WR (**Figura 26**). Nela podemos observar a formação de nódulos que encapsulam as células do patógeno, aqueles formados pelas defesas mediadas por moléculas – nódulos de melanização – (painéis A e E). Também é possível ver ação mediada pela defesa celular – nódulos de células fagocitárias – (painéis B e F). Quando as larvas recebem a primeira dose de WR, já é possível visualizar a diminuição na formação de nódulos e a presença de mais hemócitos livres circulantes (painéis C, D, G e H), que fagocitam células fúngicas

remanescentes (painéis D e H). Importante salientar que não foram visualizadas células fúngicas circulando livremente pela hemolinfa.

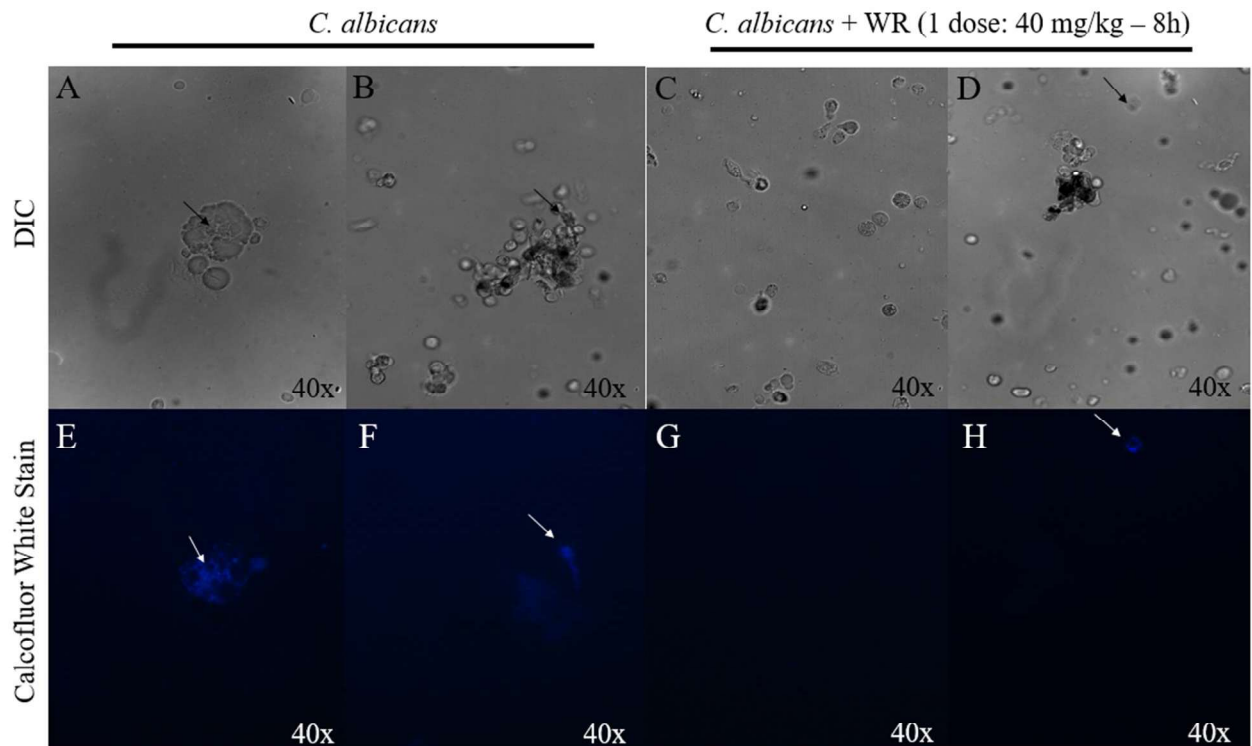


Figura 26: Imagens de microscopias da hemolinfa de larvas infectadas com *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876 e infectadas com *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876 e tratadas com a primeira dose de WR (40 mg/kg) após 8 h da infecção. Painéis A-D mostram as visualizações em DIC dos nódulos presentes na hemolinfa bem como hemócitos variados isolados. Já os painéis E-H mostram os mesmos campos no contraste de fluorescência com Calcofluor White, à 495 nm. Setas pretas e brancas indicam os mesmos locais nos diferentes contrastes.

5.7.2. Dissecção das larvas

A fim de avaliar a formação de nódulos e a integridade dos órgãos internos foi feita a dissecção de larvas em diferentes tempos/tratamentos. Pode-se perceber a partir da **Figura 27** que a infecção na DLF₁₀₀ de $0,5 \times 10^6$ células/larva de *C. albicans* progride com o passar das horas atingindo órgãos internos importantes para o organismo larval, como o corpo gorduroso e o intestino. Também é possível observar a reação do sistema imune com a formação de nódulos cada vez mais evidentes. Quando injetadas apenas com WR não é possível ver focos de melanização, formação de nódulos ou degradação de órgãos internos, estado visualmente idêntico às larvas intocadas e às injetadas com PBS, corroborando que WR não foi tóxico para as larvas no esquema de tratamento adotado. Já para as larvas infectadas e tratadas com WR, é notável que há uma diminuição nos focos de melanização e invasão de órgãos

internos, quando comparado às larvas infectadas no tempo de 120 h. Isso indica que a infecção não progride, ficando visualmente similar às larvas infectadas no tempo de 72 h, assim a eficácia de WR no controle da infecção é confirmada. Em relação ao fármaco fluconazol, apesar de não apresentar toxicidade para as larvas, ele não é capaz de controlar a infecção, já que, as estruturas internas encontram-se completamente comprometidas em 120 h.

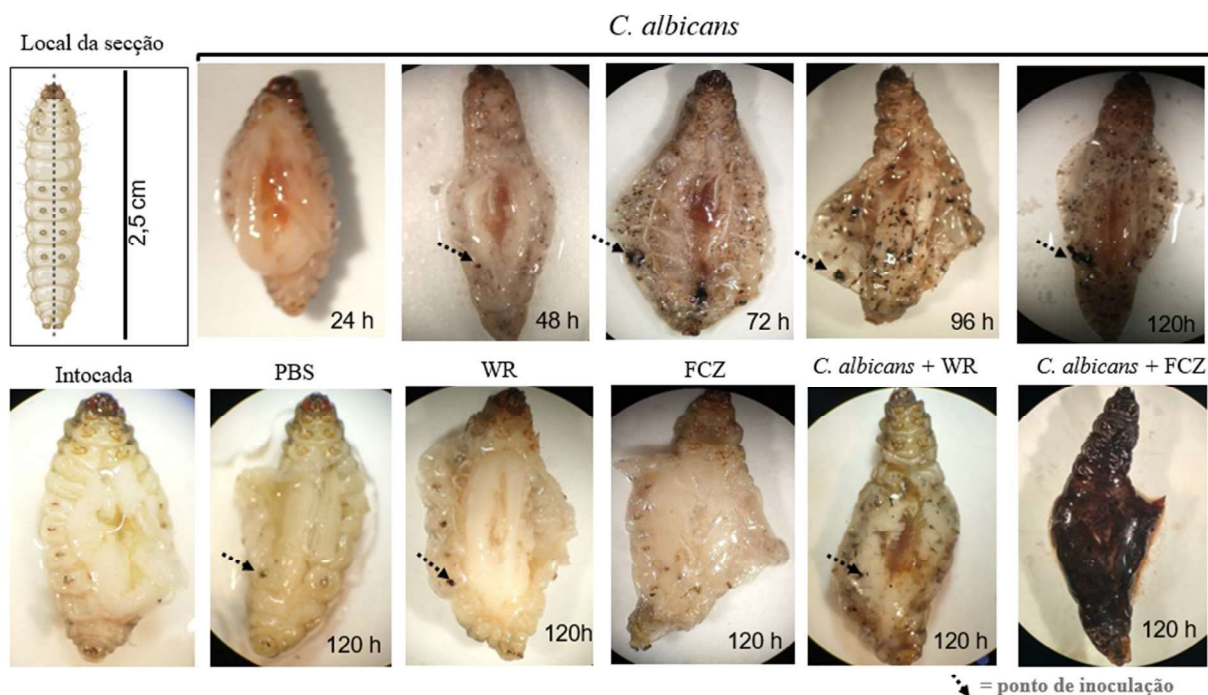


Figura 27: Dissecção das larvas em diferentes tratamentos. A formação de nódulos é presente em todas as larvas que foram infectadas por *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876, progredindo gradualmente com o passar do tempo. As larvas que recebem o tratamento com WR tiveram diminuição no comprometimento de órgãos internos, quando comparadas aos controles infectados. WR e FCZ não se mostraram tóxicos, se assemelhando visualmente às intocadas e às injetadas com PBS. FCZ não se mostrou eficaz no controle da infecção. A melanização decorrente da injúria das injeções, indicadas pelas setas, não foram consideradas para fins comparativos.

6. DISCUSSÃO

A problemática em torno das doenças fúngicas invasivas, apesar dos dados alarmantes que vêm sendo apresentados, ainda é pouco reconhecida. O que ainda é agravado ao se considerar o pouco interesse das indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de novos medicamentos para contornar essa problemática, pois o retorno financeiro não é satisfatório em relação a outros tipos de medicamentos, como os de uso contínuo. Somado a esse aspecto, para a OMS o risco dessas doenças fúngicas está atrelado, principalmente, à resistência aos fármacos utilizados nos tratamentos atuais. De forma que o desenvolvimento de novos compostos se torna cada vez mais urgente (Browne *et al.*, 2020; Denning, 2024; WHO, 2022). Nesse contexto os AMPs têm se mostrado promissores no combate a vários tipos de patógenos, inclusive os fúngicos, apresentando resultados *in vitro* consistentes e baixa toxicidade, trazendo uma possibilidade de atenuar o problema da resistência à antifúngicos. No entanto, esses compostos geralmente têm seu desenvolvimento estacionado nos testes pré-clínicos quando se iniciam as avaliações de sua atividade *in vivo*, por fatores relacionados principalmente à sua farmacocinética, farmacodinâmica e mecanismos de ação (Magana *et al.*, 2020; Dijksteel *et al.*, 2021; Toledo *et al.*, 2021; Lucas *et al.*, 2024). Assim, o AMP bioinspirado WR que já tem sua atividade *in vitro* comprovada (Toledo *et al.*, 2021) e seu mecanismo de ação sobre as células de *C. albicans* parcialmente elucidado (Lucas *et al.*, 2024) se mostra como uma proposta promissora como alternativa aos fármacos de referência. Contudo sua atividade *in vivo* precisa ser avaliada para que progrida nos testes pré-clínicos e se consolide enquanto fármaco viável para uso clínico.

A literatura já aponta que o modelo *in vivo* de *G. mellonella* é eficaz para avaliar tanto a eficácia quanto a toxicidade de vários compostos de interesse clínico e apresenta vários pontos positivos em relação ao modelo murino (da Silva *et al.* 2023; Jemel *et al.*, 2020; Denning *et al.*, 2024; Dinh *et al.*, 2021; Moretta *et al.*, 2021; Serrano *et al.* 2023). No entanto uma das barreiras em seu uso é o fato de as cepas dos insetos ainda não estarem padronizadas, ou seja, podem haver algumas variações entre as colônias mantidas em laboratório, seja por fatores intrínsecos (pequenas variações entre cepas locais) ou extrínsecos (dieta, temperatura, umidade), sendo assim o primeiro passo de um laboratório ao utilizar esse modelo é a padronização tanto do cultivo como dos tratamentos a serem utilizados (Dinh *et al.* 2021). Logo, assim que estabelecidos os parâmetros de manutenção da colônia e a dieta artificial, foi

necessário determinar a dose de *C. albicans* que causa a progressão da doença e leva à morte. De forma que a dose escolhida foi $0,5 \times 10^6$ células/larva como mostrado nas **Figuras 11, 12 e 13** e **Tabelas S1-5**. Apesar de estatisticamente não haverem diferenças entre essa dose e a de $1,0 \times 10^6$ células/larva, considera-se que as larvas ficam no estado doente/moribunda por mais tempo, principalmente quando se considera diferença entre os desvios-padrão e o IS no tempo de 72 h (**Figura S1 e Tabela S4**). A **Figura 13** também mostra que as larvas estão em um estado de saúde visualmente diferente. Como um dos objetivos deste estudo é avaliar o tratamento de candidíases sistêmicas, se faz interessante que as larvas se mantenham no estado doente/moribunda por mais tempo. Ademais, dados da literatura ainda apontam que as pseudo-hifas se formam em tecidos adjacentes apenas a partir de 24 h e levam cerca de 48 h para o início da desagregação e destruição desses tecidos, dado corroborado pela **Figura 27**. Assim o tempo mínimo para que a infecção se instale adequadamente é de 24 h (Jayatilake *et al.*, 2006). Considerando também que para o fármaco de referência Fluconazol, as indicações para o tratamento de candidíases são de no mínimo sete dias, sendo as candidemias tratadas até que o quadro clínico mude, isso pode indicar que esses tipos de infecção são persistentes e o tratamento deve ser de forma mais prolongada (Govindarajan *et al.*, 2023).

Outro parâmetro utilizado nesse mesmo sentido é a avaliação do IS, esse parâmetro é importante pois visa mitigar o efeito de uma das limitações do modelo de *G. mellonella*: a morbidade ou mortalidade pode ser subjetiva, levando à problemas na delimitação dos *endpoints* dos experimentos, sendo assim o uso do IS é de grande importância (Champion, Titball & Bates, 2018). Ele é mostrado na **Figura 12 e Tabelas S1-6** onde fica evidente uma queda menos acentuada nos parâmetros que avaliam a saúde das larvas e a progressão da doença é maior na LD₁₀₀ escolhida. Quando os critérios são avaliados individualmente é possível observar que “Melanização” impacta diretamente o IS, tanto por ser o que mais pontua (4,0 pontos máximos), quanto por ser o aspecto visual mais marcante. A formação de “Casulo” também é um critério importante, pois em 48 h sua pontuação chega a zero em duas concentrações de infecção e em menos de 90% da pontuação máxima na outra concentração. Entretanto, o parâmetro determinante do IS ainda é a “Sobrevivência”, considerando-se que foi o único parâmetro estatisticamente significativo entre os diferentes inóculos.

Quanto a melanização, trata-se de um processo importante na defesa imune inata, promovido pela proteína profenoxidase (PPO) pertencente ao grupo das

proteínas de cobre-tipo 3 que ocorre em vários organismos (Lu *et al.*, 2014; Sheehan *et al.*, 2019). Durante as infecções ela é responsável por formar nódulos em volta do patógeno levando a inativação do mesmo, nódulos que também podem ser observados nas **Figuras 26 e 27**. A melanização também é um dos principais sinais visuais de progressão da infecção, já que as larvas doentes/moribundas apresentam mudança de coloração bem evidente como mostrado nas **Figuras 10 e 13**, não há diferenças estatísticas significativas em relação às diferentes concentrações de leveduras utilizadas, o que pode sugerir que a carga microbiana utilizada leva a uma rápida resposta em pouco tempo de inoculação.

Já em relação a formação de casulo, foi apontado anteriormente que, durante todas as etapas larvais, a seda é produzida para a formação de canais por onde as larvas se locomovem nas colmeias e para que o mel seja extravasado facilitando a alimentação e levando à morte da colmeia. No último estágio larval essa produção é quatro vezes maior, já que se inicia a preparação da fase de pupa (Jindra & Sehna, 1989). Importante ressaltar que a morte da colmeia também é importante no ciclo de vida natural deste lepidóptera já que, preferencialmente, as fêmeas põem ovos em colmeias onde não há abelhas presentes (Parepely *et al.*, 2023). Também pode-se considerar que as proteínas utilizadas para formação de casulo são mobilizadas para hemolinfa quando a larva está infectada, com o objetivo de promover a coagulação, que ocorre em diferentes etapas como já demonstrado para outros lepidópteros (Aprelev *et al.*, 2019; Korayem *et al.*, 2007). Nesse sentido também já foi demonstrado que a produção de hemolina, membro da superfamília das imunoglobulinas, produzida na glândula de seda e em outros órgãos (e.g. corpo gorduroso) é estimulada durante infecções bacterianas e fúngicas, promovendo a fagocitose por hemócitos (Serrano *et al.*, 2023). Em estudo de proteoma do bicho-da-seda (*Bombix mori*), outro lepidóptera, foram detectadas 93 proteínas que aparentemente estão envolvidas não apenas na produção e secreção de seda como também na defesa do organismo contra patógenos, entre outros processos (Li *et al.*, 2021). Sendo assim, é possível afirmar que, quando saudáveis, há um maior investimento na produção de seda do que quando inoculadas com diferentes concentrações de patógenos. Nessas, há investimento maior na defesa contra o patógeno, o que é evidenciado pela pupação de algumas larvas no tempo de 96 h nos controles (**Figura 13**). Assim, como estão plenamente saudáveis e com o processo de produção de casulo ocorrendo normalmente o desenvolvimento das larvas ocorre sem interrupções.

Para esse trabalho foram necessárias outras padronizações, dentre elas a reavaliação da dose letal de WR para *C. albicans*, haja visto que a cepa utilizada nos trabalhos que determinaram a atividade *in vivo* e o mecanismo de ação (Lucas *et al.*, 2024; Toledo *et al.*, 2021) foi na cepa CE 022, enquanto neste trabalho foi utilizada a cepa clínica, referência na literatura, a SC 5314/ATCC MYA-2876. De modo que a dose letal previamente encontrada de 27,5 μ M por Toledo *et al.* (2021), sob os mesmos parâmetros metodológicos, induziu 45,9% de morte sobre a cepa clínica. É possível sugerir que como a virulência da cepa clínica em relação à cepa CE 022 está relacionada com a formação de pseudohifas, a resistência a WR também pode estar relacionada a esse processo (Angiolella *et al.*, 2024). A literatura também aponta que a virulência da cepa SC 5314/ATCC MYA-2876 de *C. albicans* está relacionada à heterozigose do gene ROB1, com os alelos ROB^{1946P} (ancestral) e ROB^{1946S} (raro). Em infecções orofaríngeas, ROB^{1946S} facilita a penetração nas mucosas, enquanto ROB^{1946P} favorece o estado comensal. O alelo ROB^{1946S} promove maior filamentação, formação de biofilmes e invasão de tecidos, conferindo um ganho de função que a torna altamente patogênica. A cepa SC 5314/ATCC MYA-2876 destaca-se como uma das cepas mais invasivas e filamentosas, superando outras 223 cepas de *C. albicans* estudadas, sendo a única cepa com o fenômeno de heterozigose relatado. Além disso, o gene ROB1 e sua homologia em *C. tropicalis* sugerem que, apesar das semelhanças genéticas, a cepa SC 5314/ATCC MYA-2876 desenvolveu uma vantagem competitiva que aumenta sua capacidade patogênica em ambientes clínicos (Glazier *et al.*, 2023).

Assim, mesmo aumentando a dose, não foi obtido uma LD₁₀₀, o que levou a considerar a LD₉₉ como 60,0 μ M, como demonstrado na **Tabela 5** e **Figura 14**. Ainda é possível observar que não houve diferença estatística entre as concentrações de 55,5 μ M e 60,0 μ M, o que reforça a proposta da formação de pseudohifas na proteção das leveduras da indução de morte celular, também não houve diferença estatística para diferentes temperaturas de incubação, ao se considerar que 37 °C é um dos fatores que estimulam a virulência desses patógenos (Twittenhoff *et al.*, 2020). Além dos fatores intrínsecos à cepa, já existem estratégias descritas que são utilizadas pelas células de levedura para superar a atividade dos AMPs, tais como a secreção de efetores peptídicos e proteases (Bras *et al.*, 2024; Makled *et al.*, 2024; Meiller *et al.*, 2009), bombas de efluxo de AMP (Li *et al.*, 2013) e regulação de vias de sinalização (Jung *et al.*, 2013). Assim, uma vez que o mecanismo de indução de morte

do fungo pelo WR ainda não está completamente elucidado, ainda restam lacunas no entendimento do porquê a cepa clínica necessita de uma maior dose para que a indução de morte celular ocorra.

Após essa determinação, foi necessário avaliar se a LD₉₉ de WR é capaz de induzir a morte da LD₁₀₀ de *C. albicans* SC 5314/ATCC MYA-2876 sobre *G. mellonella*, ou seja, se WR é eficaz na dose do inóculo ($0,5 \times 10^6$ células/larva), indicando a morte de uma quantidade maior de células *in vitro*. A **Figura 15** mostra que WR é capaz de induzir a morte das células nas concentrações de 55,5 e 60,0 μ M, tanto no ensaio de espectrofotometria quanto no ensaio de viabilidade celular. Assim, é possível sugerir que a ação do peptídeo combinada ao sistema imune da larva seria capaz de controlar a infecção diminuindo a mortalidade das larvas, evidenciando seu efeito fungicida. Já para o fármaco FCZ a dose recomendada para o tratamento interrompe o crescimento das células, mas não as matam, confirmando a sua atividade fungistática já relatada (Jayatilike *et al.*, 2006).

Outro parâmetro de estudo da progressão da infecção é o estabelecimento da carga fúngica presente na hemolinfa, conforme já citado anteriormente, esse dado se relaciona intrinsecamente com a ação da PPO e o número de hemócitos circulantes, ou seja, espera-se que quanto maior for a quantidade de células fúngicas na hemolinfa, maior será a resposta do organismo no combate à infecção. Assim, como já esperado, após o estabelecimento da carga fúngica - a partir de 4 h pós infecção, em 24 h há um pico na quantidade de hemócitos na hemolinfa, indicando a resposta do organismo à instalação da infecção e à invasão dos demais tecidos (Lu *et al.*, 2014; Jayatilike *et al.*, 2006; Sheehan *et al.*, 2019). Também foi possível evidenciar, mediante análise qualitativa das colônias em ágar cromogênico, que as mesmas eram do patógeno *C. albicans*, e não de outros fungos oportunistas. Na contagem de hemócitos foi possível observar diferentes tipos de hemócitos circulantes (dados não mostrados), no entanto, como já elucidado Campbell *et al.* (2022), a maior parte dos hemócitos circulantes é composta por células granulares ou plasmócitos, ambos com capacidade fagocitária sem a presença abundante de outros subtipos celulares como os oenocitóides ou esferulócitos, os autores ainda elucidam que a resposta majoritária tanto para as partículas fúngicas quanto bacterianas é a fagocitária. Assim, apesar de diferentes dos tipos celulares circulantes na hemolinfa do inseto, a resposta fagocitária é predominante tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo*, o que também fica evidenciado na **Figura 26**.

Com os parâmetros de infecção e de atividade do peptídeo *in vitro* avaliados foi necessário estudar como seria o esquema de tratamento com o peptídeo para o teste de sua toxicidade e eficácia sobre as leveduras. Como já foi apontado anteriormente, a posologia do fármaco FCZ requer múltiplas doses diárias, exceto para tratamento de candidíase vaginal. Geralmente no primeiro dia há administração de 200 mg e nos dias seguintes, doses de 100 mg (candidíase orofaríngeal ou oroesofageal) ou de 50 a 100 mg (peritonites ou infecções do trato urinário), considerando que no caso de candidíase sistêmica, doses diárias acima de 400 mg já foram reportadas, com um limite de 600 mg/dia (Govindarajan *et al.*, 2023). Somado a isso, nos dados obtidos na **Figura 11**, como a probabilidade de sobrevivência começa a diminuir em 72 h, decidiu-se realizar três doses numa das LD₉₉ de WR (55,5 µM, que equivale a 40 mg/kg). O esquema de tratamento foi feito considerando os resultados da carga fúngica e a produção de hemócitos como mostrado na **Figura 16**. Assim a primeira dose foi administrada 8 h após a infecção, relacionado a estabilização da carga fúngica, a segunda dose em 32 h após a infecção, tempo após o pico na produção de hemócitos e o início da invasão dos tecidos adjacentes e a terceira dose em 56 h, antes de início do aumento da probabilidade de morte.

No teste de toxicidade é possível observar que WR não se mostrou tóxico para as larvas, no esquema de tratamento adotado, já que seus resultados são estatisticamente semelhantes às larvas injetadas com PBS, inclusive nos aspectos visuais (**Figura 27**). Esses resultados confirmam os dados já registrados por Toledo *et al.* (2021), que mostram a baixa toxicidade de WR tanto para os macrófagos murinos RAW 264.7 quanto para monócitos humanos THP-1. Resultados similares foram encontrados para os peptídeos StigA8 e StigA18, ambos análogos ao peptídeo Stigmurina (extraído da glândula de veneno de *Tityus stigmurus*, escorpião), que possuem cargas líquidas positivas maiores que o peptídeo original (+4 e +5, respectivamente) e massas moleculares de 1907,42 e 1948,51 Da, respectivamente. Essas características são similares à WR, que não mostraram atividade hemolítica ou toxicidade em larvas de *G. mellonella* (Furtado *et al.*, 2022).

Analisando os resultados obtidos nos testes de eficácia, podemos observar que o tratamento com WR é capaz não apenas de melhorar a sobrevivência das larvas infectadas, pois apresenta resultados semelhantes aos das injetadas com PBS e estatisticamente diferentes ao infectado com *C. albicans*. Mas também mostra um aumento significativo em relação ao estado de saúde das larvas, principalmente

quando analisamos a “Melanização” e o IS total (**Tabelas Suplementares 7 e 10**). Percebe-se ainda a diminuição/atenuação da formação de nódulos de melanização visíveis na dissecação de larvas com 120 h, utilizando-se parâmetros visuais é possível perceber que a melanização não progride como nos infectados (**Figura 27**). Foi observado também que apesar de não existir diferenças estatísticas significativas entre a carga fúngica de larvas tratadas e não tratadas com WR no tempo de 24 h, há diferenças na densidade de hemócitos, o que pode sugerir que o peptídeo conteve a infecção levando à uma resposta imune mais branda que volta aos níveis iguais ao controle (não-infectado) em 48 h (**Figura 21**).

Além disso, como pode ser observado na **Figura 22**, WR também recupera as larvas a ponto de continuarem seu ciclo de vida normal, atingindo os próximos estágios de desenvolvimento sem danos aparentes às estruturas externas. Também é possível notar que apesar de continuarem com o ciclo de vida usual, as larvas tem o seu desenvolvimento interrompido nos estágios de pré-pupa/pupa. Sabidamente, esses estágios oferecem maiores desafios metabólicos para os lepidópteros (Moreira & Hermes-Lima, 2024) e evidenciam a atuação do corpo gorduroso no estoque de ácidos graxos e sua relação ao metabolismo do organismo, sendo a atividade de fosforilases no corpo gorduroso dos insetos aumentada significativamente durante o desenvolvimento larval e pupal, refletindo a necessidade de energia e glicose para processos essenciais, como a síntese de quitina antes da pupação. Durante a transição pupal-adulta, essa atividade permanece elevada, destacando sua importância no metabolismo (Arrese & Soullage, 2010). Assim, como demonstrado na **Figura 27**, a infecção por *C. albicans* leva à degradação de outros órgãos, incluindo o corpo gorduroso, entendendo que esses danos podem ser irreversíveis e, mesmo com o tratamento com WR, causam prejuízos ao desenvolvimento do inseto. À nível microscópico, observa-se que o tratamento com WR também reduz a formação de nódulos e a presença do patógeno na hemolinfa circulante quando comparado ao controle (**Figura 26**), de modo que as células fagocitárias são capazes de conter a infecção enquanto há o tratamento com WR.

Quando comparado ao fármaco de referência, o WR possui maior eficácia, tanto em termos de sobrevivência quanto em progressão da infecção. Pois durante o tratamento com FCZ vemos uma melhora no IS, mas que ainda é inferior ao aumento observado com o tratamento com WR, ainda que, como já mencionado anteriormente, após a interrupção do tratamento na terceira dose (56 h) é possível notar um declínio

no IS para larvas tratadas tanto com FCZ ou WR. No entanto, a queda é mais abrupta para as larvas tratadas com FCZ, corroborado pela **Figura 27**, onde as larvas estão completamente melanizadas em 120 h. Assim, as **Tabelas Suplementares 6-10** e as **Figuras 18 e 27** também evidenciam que larvas tratadas com FCZ não tiveram diferenças estatísticas com as infectadas pelo fungo. Outros peptídeos sintéticos também demonstraram atividade antimicrobiana como o IKR18 (origem computacional) e a Epidermicina NI01 (versão sintética da epidermicina isolada de *Staphylococcus epidermidis*) que mostraram efetividade no controle de infecções de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii* no modelo de *G. mellonella* (Gibreel & Upton, 2013; Ramalho *et al.*, 2022). Os peptídeos previamente citados, StigA8 e StigA18, também foram eficazes no controle *in vivo* tendo como modelo *G. mellonella* sobre *S. aureus*, sendo utilizada dose única de 40 mg/kg e efeito dose-dependente. Vê-se que, geralmente, para compostos testados em bactérias não se é exigido um tratamento prolongado. Este estudo discute que a presença de um grupamento amino na porção C-terminal nesses e em outros peptídeos é importante na proteção contra proteólise na hemolinfa larval, já que esta possui um metabolismo próprio (Furtado *et al.*, 2022).

Considerando essa possibilidade, o declínio no IS total após término do tratamento com WR, a interrupção na produção de seda, aumento da produção de PPO e que proteases são barreiras para que peptídeos sejam usados para combater candidemias. Foi necessário avaliar alguns parâmetros bioquímicos como: o perfil proteico, presença de proteases na hemolinfa, quantificação de proteínas e de açúcares redutores totais, a fim de avaliar as mudanças no metabolismo nativo da hemolinfa larval e possíveis vias de degradação dos peptídeos.

Assim foi possível observar que não houveram mudanças significativas nas concentrações de açúcares redutores e proteínas totais em relação ao tratamento com WR. Estudos demonstram que a concentração de carboidratos na hemolinfa de *G. mellonella* pode variar em resposta a diferentes fatores. Sevcan *et al.* (2017) observaram que doses baixas de veneno de *Pimpla turionellae* aumentaram os níveis de carboidratos após 4 e 24 h, enquanto doses altas reduziram os níveis, possivelmente devido ao uso de glicose nas respostas imunológicas do hospedeiro. Barakat *et al.* (2019) relataram aumento nos níveis de carboidratos após a exposição à bactéria *Bacillus thuringiensis*, seguido por normalização em 48 h, indicando recuperação da infecção. Já Uçkan *et al.* (2021) constataram que o ácido indol-3-

acético reduziu o glicogênio hemolinfático em todas as doses testadas. Essas variações destacam a relação entre as condições fisiológicas e o metabolismo de carboidratos em *G. mellonella*. Vale ressaltar que esses estudos dosaram diferentes tipos de carboidratos, em especial, o uso de trealose pelos insetos varia conforme o tipo de voo e a necessidade metabólica. Longos voos, como os de gafanhotos e mosquitos, iniciam com trealose, mas posteriormente utilizam lipídios. Insetos de voo curto, como a barata *Periplaneta americana*, dependem principalmente da trealose. Já o besouro-da-batata-do-Colorado utiliza glicose e prolina de forma combinada para sustentar o ciclo de prolina-alanina. Abelhas, por outro lado, dependem exclusivamente de carboidratos armazenados no papo para alimentar o voo, sem utilizar reservas do corpo gorduroso (Arrese & Soulages, 2010). Assim, como neste estudo foram dosados açúcares redutores, trealose ou glicogênio, seria necessário realizar as dosagens desses carboidratos de forma a obter, de maneira mais clara, um entendimento sobre as mudanças desses perfis metabólicos.

Em relação às proteínas, a sua concentração na hemolinfa de larvas de *G. mellonella* varia devido a fatores como estágio de desenvolvimento, infecção e exposição a toxinas. Sendo moléculas essenciais para o metabolismo energético e a síntese de ATP, apresentam níveis mais altos na fase larval, com redução no estágio pupal e declínio acentuado na fase adulta, refletindo seu consumo na morfogênese. Infecções por *B. thuringiensis* causam significativa redução proteica, possivelmente ligada à indução de proteínas antibacterianas e à eliminação de proteínas por ação bacteriana. O ácido indol-3-acético (IAA) também reduz os níveis proteicos, sugerindo maior catabolismo como adaptação ao estresse, além de uso em reparo celular. No entanto, o veneno da vespa *Pimpla turionellae* não altera significativamente os níveis de proteína hemolinfática (Barakat *et al.*, 2019; Sevcan *et al.*, 2017; Uçkan *et al.*, 2021). Dessa forma, assim como para as infecções pelos patógenos citados, também foi possível observar redução significativa na quantidade de proteínas totais de larvas infectadas por *C. albicans* (**Figura 23**), com ou sem a presença de WR.

Posteriormente, a análise do perfil proteico da hemolinfa das larvas revelou uma diversidade de proteínas que são mais ou menos abundantes a depender do tratamento (**Figura 24**), em especial uma banda proteica que está diminuída em relação aos controles (Unt. e PBS) porém está aumentada em relação ao infectado por *C. albicans*. Andrejko *et al.* (2021) discute que a hemolinfa de *G. mellonella* contém diversas proteínas e peptídeos com funções cruciais para a resposta imune, cuja

concentração pode variar conforme a infecção e outras condições. Estudos identificaram 13 proteínas, destacando-se os peptídeos ricos em prolina, cuja concentração aumenta após infecção bacteriana, e os peptídeos aniônicos, sendo o aniônico 2 o mais abundante. Proteínas antimicrobianas, como defensina, cecropina e gallerimicina, também são induzidas durante infecções, enquanto a lisozima e o peptídeo semelhante a moricina B exibem elevações específicas. Proteínas metabólicas, como apolipoproteínas e superóxido dismutase, são encontradas, mas podem ser degradadas por proteases bacterianas, como as de *Pseudomonas aeruginosa*.

Assim, se tornou necessário investigar a presença de proteases na hemolinfa, já que essas podem surgir tanto a partir da resposta imune das larvas quanto do patógeno inoculado. De forma que foi possível observar a presença de proteases residentes na hemolinfa de larvas intocadas (**Figuras 24 e 25**), bem como outras que são encontradas na presença de *C. albicans*, em especial a banda citada anteriormente que, por estar na mesma altura, sugere que tenha atividade proteolítica. A literatura já descreve a atividade proteolítica da hemolinfa, sugerindo a presença de enzimas endógenas, como as serina-proteases, que desempenham papéis na imunidade do inseto (Andrejko *et al.*, 2021). Assim, como esse estudo não buscou a completa caracterização das proteínas presentes na hemolinfa do inseto, pode-se analisar que, conforme a literatura já aponta para patógenos bacterianos, patógenos fúngicos induzem a produção diferencial de proteínas para que seja feita a resposta imune contra o agente. As proteases encontradas podem ser tanto produzidas pelo hospedeiro quanto pelo patógeno como forma de resistência ao sistema imune ou ao peptídeo WR, já que nessas análises não foi possível encontrar a banda característica de WR (**Figura 24**) (Andrejko *et al.*, 2021; Bras *et al.*, 2024; Meiller *et al.*, 2009; Twittenhoff *et al.*, 2020).

Assim, foi possível, dentro dos parâmetros metodológicos desta pesquisa, estabelecer que WR não é tóxico e possui eficácia no tratamento de infecções de *C. albicans* no modelo de *G. mellonella*. Os próximos passos incluem entender as vias de degradação/metabolização do peptídeo, seus efeitos no metabolismo das larvas, a produção *in loco* do peptídeo, avaliação das formas mais eficazes para a sua administração e o teste em modelos mamíferos, permitindo o avanço do peptídeo como alternativa farmacológica viável.

7. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que o peptídeo antimicrobiano WR apresenta alto potencial como uma nova alternativa farmacológica para o tratamento de infecções por *C. albicans*. A eficácia do WR foi evidenciada por sua capacidade de aumentar significativamente a sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas, melhorar o (IS) e reduzir marcadores imunológicos de progressão da doença, como a melanização. Esses resultados confirmam a ação antifúngica robusta do WR, alinhando-se à necessidade urgente de desenvolver compostos inovadores frente à crescente resistência aos antifúngicos convencionais.

Os resultados também indicaram a baixa toxicidade do WR para as larvas, corroborando dados prévios que atestam sua segurança em células de mamíferos. Adicionalmente, a eficácia do WR foi superior à do Fluconazol, especialmente em termos de controle da infecção e manutenção da saúde do hospedeiro após a suspensão do tratamento. A análise bioquímica revelou alterações no perfil proteico da hemolinfa, sugerindo uma resposta imunológica ativa, embora a interação do WR com proteases do hospedeiro e do patógeno levante questões sobre sua estabilidade *in vivo*.

Apesar desses avanços, algumas lacunas permanecem e abrem espaço para futuras investigações. Nesse sentido, não foi possível determinar completamente os mecanismos moleculares subjacentes à ação do WR, bem como as possíveis vias de degradação enzimática no ambiente da hemolinfa ou possíveis vias em órgãos específicos como a metabolização no corpo gorduroso ou a excreção via túbulos de Malpighi. Além disso, a otimização da dosagem e do regime de administração do WR para maximizar sua eficácia e minimizar potenciais efeitos colaterais requer estudos adicionais.

Perspectivas futuras incluem a transposição do modelo larval para modelos mamíferos, permitindo uma avaliação mais aprofundada da toxicidade, farmacocinética e eficácia do WR em sistemas mais complexos. Estudos estruturais mais aprofundados podem esclarecer as interações do WR com alvos celulares específicos e proteases, possibilitando melhorias na sua formulação. Adicionalmente, o desenvolvimento de estratégias para proteger o WR da degradação enzimática e potencializar sua biodisponibilidade é uma prioridade para viabilizar seu uso clínico.

Em suma, os resultados deste estudo consolidam o WR como um candidato promissor no combate a infecções fúngicas invasivas, com o potencial de preencher

lacunas críticas no arsenal terapêutico atual. Avanços no entendimento de seus mecanismos de ação e melhorias no *design* do peptídeo poderão viabilizar sua transição para ensaios clínicos, marcando um passo significativo na luta contra a resistência antifúngica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADMELLA, Joana; TORRENTS, Eduard. Investigating bacterial infections in *Galleria mellonella* larvae: Insights into pathogen dissemination and behavior. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 200, 2023. DOI: 10.1016/j.jip.2023.107975.
- AGNELLI, C. *et al.* Prognostic trends and current challenges in candidemia: A comparative analysis of two multicenter cohorts within the past decade. *Journal of Fungi*, v. 9, p. 468, 2023. DOI: 10.3390/jof9040468.
- AHMAD, N. *et al.* Antimicrobial efficacy of *Mentha piperata*-derived biogenic zinc oxide nanoparticles against UTI-resistant pathogens. *Scientific Reports*, v. 13, p. 14972, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-41502-w.
- ANDERSON, F. M. *et al.* *Candida albicans* selection for human commensalism results in substantial within-host diversity without decreasing fitness for invasive disease. *PLOS Biology*, v. 21, n. 5, e3001822, 2023. DOI: 10.1371/journal.pbio.3001822.
- ANDREJKO, Mariola *et al.* A comparison of the production of antimicrobial peptides and proteins by *Galleria mellonella* larvae in response to infection with two *Pseudomonas aeruginosa* strains differing in the profile of secreted proteases. *Journal of Insect Physiology*, v. 131, 2021. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2021.104239.
- ANGIOLELLA, L. *et al.*, Identification of Virulence Factors in Isolates of *Candida haemulonii*, *Candida albicans* and *Clavispora lusitaniae* with Low Susceptibility and Resistance to Fluconazole and Amphotericin B. *Microorganisms* **2024**, 12, 212. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010212>
- APRELEV, P. *et al.* Nucleation and formation of a primary clot in insect blood. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 3451, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-40129-0.
- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, v. 55, p. 207-225, 2010. DOI: 10.1146/annurev-ento-112408-085356.
- BARAKAT, Emad; MO'MEN, Shaimaa; ABOKERSH, Mohamed. The biochemical alterations of *Galleria mellonella* hemolymph following induction of immune response. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, v. 7, n. 24-31, 2019.
- BEN-AMI, R.; KONTOYIANNIS, D. P. Resistance to antifungal drugs. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 35, n. 2, p. 279-311, 2021. DOI: 10.1016/j.idc.2021.03.003.
- BONGOMIN, F. *et al.* Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *Journal of Fungi*, v. 3, n. 4, p. 57, 2017. DOI: 10.3390/jof3040057.

BORMAN, A. M. Of mice and men and larvae: *Galleria mellonella* to model the early host-pathogen interactions after fungal infection. *Virulence*, v. 9, n. 1, p. 9-12, 2018. DOI: 10.1080/21505594.2017.1382799.

BRAS, G. *et al.* Secreted aspartic proteinases: Key factors in *Candida* Infections and host-pathogen interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 9, p. 4775, 2024. DOI: 10.3390/ijms25094775.

BROWNE, K. *et al.* A new era of antibiotics: The clinical potential of antimicrobial peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 1, 2020. DOI: 10.3390/ijms21197047.

BUENDIA, P. *et al.* Hospital antimicrobial stewardship: Profiling the oral microbiome after exposure to COVID-19 and antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, 2024. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1346762.

CAMPBELL, J. S. *et al.* Characterising phagocytes and measuring phagocytosis from live *Galleria mellonella* larvae. *Virulence*, v. 15, n. 1, p. 2313413, 2024. DOI: 10.1080/21505594.2024.2313413.

CARDOSO, J. *et al.* Marine-Derived compounds and prospects for their antifungal application. *Molecules*, v. 25, p. 5856, 2020. DOI: 10.3390/molecules25245856.

CARVALHO, A. de O. *et al.* Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 39, n. 2, p. 137–146, 2001. DOI: 10.1016/S0981-9428(00)01230-4.

CHAMPION, Olivia; TITBALL, Richard; BATES, Steven. Standardization of *Galleria mellonella* larvae to provide reliable and reproducible results in the study of fungal pathogens. *Journal of Fungi*, v. 4, p. 108, 2018. DOI: 10.3390/jof4030108.

CHEN, E. H. L. *et al.* Visualizing the membrane disruption action of antimicrobial peptides by cryo-electron tomography. *Nature Communications*, v. 14, p. 5464, 2023. DOI: 10.1038/s41467-023-41156-2.

CIULLA, M. G.; GELAIN, F. Structure-activity relationships of antibacterial peptides. *Microbial Biotechnology*, v. 16, n. 4, p. 757-777, 2023. DOI: 10.1111/1751-7915.14213.

COATES, C. J. *et al.* The insect, *Galleria mellonella*, is a compatible model for evaluating the toxicology of okadaic acid. *Cell Biology and Toxicology*, v. 35, n. 3, p. 219-232, 2019. DOI: 10.1007/s10565-018-09448-2.

DA SILVA, J. R. *et al.* Is *Galleria mellonella* model a good alternative to study virulence in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis? *Brazilian Journal of Microbiology*, 2023. DOI: 10.1007/s42770-023-01181-1.

DENNING, D. W. Antifungal drug resistance: An update. *European Journal of Hospital Pharmacy*, v. 29, n. 2, p. 109-112, 2024. DOI: 10.1136/ejhpharm-2020-002604.

DIJKSTEEL, G. S. *et al.* Review: Lessons learned from clinical trials using Antimicrobial Peptides (AMPs). *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 616979, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.616979.

DINH, H. *et al.* Microbiology's next top model: *Galleria* in the molecular age. *Pathogens and Disease*, v. 79, n. 2, 2021. DOI: 10.1093/femspd/ftab006.

DOS SANTOS, I. S. *et al.* Purification of a defensin isolated from *Vigna unguiculata* seeds, its functional expression in *Escherichia coli*, and assessment of its insect α -amylase inhibitory activity. *Protein Expression and Purification*, v. 71, n. 1, p. 8-15, 2010. DOI: 10.1016/j.pep.2009.11.008.

DU, B. *et al.* Strategies of plants to overcome abiotic and biotic stresses. *Biological Reviews*, 2024. DOI: 10.1111/brv.13079.

FIRACATIVE, C. *et al.* Rearing and maintenance of *Galleria mellonella* and its application to study fungal virulence. *Journal of Fungi*, v. 6, n. 3, p. 130, 2020. DOI: 10.3390/jof6030130.

FURTADO, A. A. *et al.* In silico and in vitro structure-stability-function relationship of analog peptides of Stigmurin and its antibacterial and antibiofilm activities. *Pharmacological Research*, v. 181, p. 106245, 2022. DOI: 10.1016/j.phrs.2022.106245.

GALLAGHER, S. R. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Current Protocols in Immunology*, v. 8, p. Unit 8.4, 2006. DOI: 10.1002/0471142735.im0804s75.

GARCIA-BUSTOS, V. *et al.* Host–pathogen interactions upon *Candida auris* infection: Fungal behaviour and immune response in *Galleria mellonella*. *Emerging Microbes & Infections*, v. 11, n. 1, p. 136-146, 2022. DOI: 10.1080/22221751.2021.2017756.

GIAMMARINO, A. *et al.* *Galleria mellonella* as a model for the study of fungal pathogens: Advantages and disadvantages. *Pathogens*, v. 13, n. 3, p. 233, 2024. DOI: 10.3390/pathogens13030233.

GIBREEL, T. M.; UPTON, M. Synthetic epidermicin NI01 can protect *Galleria mellonella* larvae from infection with *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, n. 10, p. 2269-2273, 2013. DOI: 10.1093/jac/dkt195.

GLAZIER, V. E. *et al.* The *Candida albicans* reference strain SC5314 contains a rare, dominant allele of the transcription factor Rob1 that modulates filamentation, biofilm formation, and oral commensalism. *mBio*, v. 14, n. 5, p. e0152123, 2023. DOI: 10.1128/mbio.01521-23.

GOVINDARAJAN, A. *et al.* Fluconazole. *StatPearls*, 2023.

GUPTA, A. K. *et al.* Treatment of onychomycosis in an era of antifungal resistance: Role for antifungal stewardship and topical antifungal agents. *Mycoses*, v. 67, n. 1, p. e13683, 2024. DOI: 10.1111/myc.13683.

HAM, S. Y. *et al.* Limited impact of bacterial virulence on early mortality risk factors in *Acinetobacter baumannii* bacteremia observed in a *Galleria mellonella* model. *Scientific Reports*, v. 14, p. 14960, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-65940-2.

HUSSAIN, Jaffer; COOK, Paul P. Resistance: The emerging reality of antifungal treatment. *Infectious Disease Special Edition*, 2018.

JAYATILAKE, J.A. *et al.* Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-albicans *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med*. 2006 Sep;35(8):484-91. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2006.00435.x.

JEMEL S, *et al.* *Galleria mellonella* for the evaluation of antifungal efficacy against medically important fungi, a narrative review. *Microorganisms*. 2020 Mar 11;8(3):390. DOI: 10.3390/microorganisms8030390.

JINDRA, M.; SEHNAL, F. Larval growth, food consumption, and utilization of dietary protein and energy in *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, v. 35, p. 719-724, 1989.

JUNG, S. I. *et al.* Bcr1 functions downstream of Ssd1 to mediate antimicrobial peptide resistance in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, v. 12, n. 3, p. 411-419, Mar. 2013. DOI: 10.1128/EC.00285-12.

KAUR, G. *et al.* Advancing vaccine strategies against *Candida* infections: Exploring new frontiers. *Vaccines (Basel)*, v. 11, n. 11, p. 1658, 2023. DOI: 10.3390/vaccines11111658.

KOEHBACH, J.; CRAIK, D. J. The vast structural diversity of antimicrobial peptides. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 40, n. 7, p. 517-528, 2019. DOI: 10.1016/j.tips.2019.04.012.

KORAYEM, A. M. *et al.* Evidence for an immune function of lepidopteran silk proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 352, n. 2, p. 317-322, 2007. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.11.022.

KOVALEVA, V.; BUKHTEEVA, I.; KIT, O. Y.; NESMELOVA, I. V. Plant defensins from a structural perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 15, p. 5307, 26 jul. 2020. DOI: 10.3390/ijms21155307.

LACERDA, A. F. *et al.* Antifungal defensins and their role in plant defense. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 116, 2014. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00116.

LANGE, A, *et al.*, Genome Sequence of *Galleria mellonella* (Greater Wax Moth). *Genome Announc*. 2018 Jan 11;6(2):e01220-17. DOI: 10.1128/genomeA.01220-17.

LI, D. *et al.* Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. *Insect Biochemistry*

and *Molecular Biology*, v. 32, n. 8, p. 919-928, 2002. DOI: 10.1016/s0965-1748(02)00030-9.

LI, R. *et al.* *Candida albicans* flu1-mediated efflux of salivary histatin 5 reduces its cytosolic concentration and fungicidal activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 4, p. 1832-1839, 2013. DOI: 10.1128/AAC.02295-12.

LI, T. *et al.* Proteomic Identification of *Bombyx mori* organelles using the engineered ascorbate peroxidase APEX and development of silkworm organelle proteome database (SilkOrganPDB). *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 9, p. 5051, 2021. DOI: 10.3390/ijms22095051.

LU, Anrui *et al.* Insect prophenoloxidase: The view beyond immunity. *Frontiers in Physiology*, 2014. DOI: 10.3389/fphys.2014.00252.

LUCAS, D. R. *et al.* Bioinspired peptides induce different cell death mechanisms against opportunistic yeasts. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 16, n. 2, p. 649-672, 2024. DOI: 10.1007/s12602-023-10064-8.

LUONG, H. X.; THANH, T. T.; TRAN, T. H. Antimicrobial peptides - Advances in development of therapeutic applications. *Life Sciences*, v. 260, p. 118407, 2020. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118407.

MAGANA, M. *et al.* The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 20, n. 9, p. e216-e230, 2020. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30327-3.

MAKLED, A. F.; ALI, S. A. M.; LABEEB, A. Z.; SALMAN, S. S.; SHEBL, D. Z. M.; HEGAZY, S. G.; SABAL, M. S. Characterization of *Candida* species isolated from clinical specimens: Insights into virulence traits, antifungal resistance and molecular profiles. *BMC Microbiology*, v. 24, n. 1, p. 388, 5 out. 2024. DOI: 10.1186/s12866-024-03515-x.

MANZANARES, P.; GINER-LLORCA, M.; MARCOS, J. F.; GARRIGUES, S. Fighting pathogenic yeasts with plant defensins and anti-fungal proteins from fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 108, n. 1, p. 277, 2024. DOI: 10.1007/s00253-024-13118-1.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J. *et al.* *Candida* isolates causing candidemia show different degrees of virulence in *Galleria mellonella*. *Medical Mycology*, v. 58, n. 1, p. 83–92, 2020. DOI: 10.1093/mmy/myz027.

MATSUDA, H. *et al.* Flies without trehalose. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 2, p. 1244–1255, 2014. DOI: 10.1074/jbc.m114.619411.

MAZURKIEWICZ-PISAREK, A.; BARAN, J.; CIACH, T. Antimicrobial peptides: Challenging journey to the pharmaceutical, biomedical, and cosmeceutical use.

International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 10, p. 9031, 2023. DOI: 10.3390/ijms24109031.

MEILLER, T. F. *et al.* A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*: Proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide. *PLoS One*, v. 4, n. 4, e5039, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0005039.

MÉNARD, G.; ROUILLON, A.; CATTOIR, V.; DONNIO, P. Y. *Galleria mellonella* as a suitable model of bacterial infection: Past, present and future. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, p. 782733, 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2021.782733.

MILLER, Rachel. A case for antifungal stewardship. *Current Fungal Infection Reports*, v. 12, p. 10–20, 2018. DOI: 10.1007/s12281-018-0307-z.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde e OPAS realizam webinar sobre micoses invasivas oportunistas. 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2021/novembro/ministerio-da-saude-e-opas-realizam-webinario-sobre-micoses-invasivas-oportunisticas>. Acesso em: 16 abr. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde treina profissionais de Lacen's para o diagnóstico laboratorial de micoses. 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/abril/ministerio-da-saude-treina-profissionais-de-lacen2019s-para-o-diagnostico-laboratorial-de-micoses>. Acesso em: 16 abr. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Pacientes imunocomprometidos ou com infecções fúngicas terão novas opções de tratamento pelo SUS. 2022c. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/agosto/pacientes-imunocomprometidos-ou-com-infeccoes-fungicas-terao-novas-opcoes-de-tratamento-pelo-sus>. Acesso em: 16 abr. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica. [s.d.]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/candidiase-sistemica/situacao-epidemiologica>. Acesso em: 16 abr. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SUS amplia acesso a novos tratamentos para micoses endêmicas. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2023/dezembro/sus-amplia-acesso-a-novos-tratamentos-para-micoses-endemicas>. Acesso em: 16 abr. 2024.

MOREIRA, D. C.; HERMES-LIMA, M. Dynamics of redox metabolism during complete metamorphosis of insects: insights from the sunflower caterpillar *Chlosyne lacinia* (Lepidoptera). *Antioxidants*, v. 13, p. 959, 2024. DOI: 10.3390/antiox13080959.

MORETTA, A. *et al.* Antimicrobial peptides: A new hope in biomedical and pharmaceutical fields. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2021.668632.

NNADI, N. E.; CARTER, D. A. Climate change and the emergence of fungal pathogens. *PLoS Pathogens*, v. 17, n. 4, e1009503, 2021. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009503.

PAREPELY, S. K. et al. The greater wax moth, *Galleria mellonella* (L.) uses two different sensory modalities to evaluate the suitability of potential oviposition sites. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, p. 211, 2023. DOI: 10.1038/s41598-022-26826-3.

PARISI, K. et al. The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 88, p. 107–118, 2019. DOI: 10.1016/j.semcdb.2018.02.004.

PEREIRA, M. F.; ROSSI, C. C. Overview of rearing and testing conditions and a guide for optimizing *Galleria mellonella* breeding and use in the laboratory for scientific purposes. *APMIS*, v. 128, p. 607–620, 2020. DOI: 10.1111/apm.13082.

RABAAN, A.A., et al., Potential strategies to control the risk of antifungal resistance in humans: A comprehensive Review. *Antibiotics (Basel)*. 2023 Mar 18;12(3):608. DOI: 10.3390/antibiotics12030608.

RADFORD, C. A. et al. Haemolymph glucose concentrations of juvenile rock lobsters, *Jasus edwardsii*, feeding on different carbohydrate diets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 140, n. 2, p. 241–249, 2005. DOI: 10.1016/j.cbpb.2005.01.002.

RAMALHO, S. R. et al. The synthetic antimicrobial peptide IKR18 displays anti-infectious properties in *Galleria mellonella* in vivo model. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1866, n. 12, p. 130244, 2022. DOI: 10.1016/j.bbagen.2022.130244.

RAUT, A.; HUYNH, N. T. Rising incidence of mucormycosis in patients with COVID-19: Another challenge for India amidst the second wave? *Lancet Respiratory Medicine*, v. 9, n. 8, e77, 2021.

RICHTER, A. et al. Associating biological activity and predicted structure of antimicrobial peptides from amphibians and insects. *Antibiotics*, v. 11, n. 12, p. 1710, 2022. DOI: 10.3390/antibiotics11121710.

ROSSONI, R. D. et al. Effects of surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) eluate on *Candida* spp.: Antifungal activity, anti-biofilm properties, and protective effects on *Galleria mellonella* against *C. albicans* infection. *Biofouling*, v. 35, n. 9, p. 997–1006, 2019. DOI: 10.1080/08927014.2019.1686485.

SÄNGER, P. A. et al. Dissecting the invasion of *Galleria mellonella* by *Yersinia enterocolitica* reveals metabolic adaptations and a role of a phage lysis cassette in insect killing. *PLoS Pathogens*, v. 18, n. 11, e1010991, 2022. DOI: 10.1371/journal.ppat.1010991.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, v. 166, n. 2, p. 368–379, 1987. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90587-2.

SHAFEE, T. M.; LAY, F. T.; HULETT, M. D.; ANDERSON, M. A. The defensins consist of two independent, convergent protein superfamilies. *Molecular Biology and Evolution*, v. 33, n. 9, p. 2345-2356, set. 2016. DOI: 10.1093/molbev/msw106.

SERRANO, I. *et al.* The virtuous *Galleria mellonella* model for scientific experimentation. *Antibiotics*, v. 12, p. 505, 2023. DOI: 10.3390/antibiotics12030505.

SEVCAN K. *et al.* Alterations in hemolymph carbohydrate and lipid composition of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: *Pyrilidae*) induced by parasitism and venom of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Annals of the Entomological Society of America*, Volume 110, Issue 2, March 2017, Pages 221–226, DOI: doi.org/10.1093/aesa/saw076

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*, Vienna, v. 51, n. 10–12, p. 1633–1648, nov. 2019. DOI: 10.1007/s00726-019-02800-8.

KULELI, S. *et al.* Alterations in hemolymph carbohydrate and lipid composition of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: *Pyrilidae*) induced by parasitism and venom of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Annals of the Entomological Society of America*, v. 110, n. 2, p. 221–226, 2017. DOI: 10.1093/aesa/saw076.

HAAQ, A. S.; SEHNAL, F. Hemolin expression in the silk glands of *Galleria mellonella* in response to bacterial challenge and prior to cell disintegration. *Journal of Insect Physiology*, v. 55, n. 9, 2009. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2009.04.010.

SHEEHAN, G.; DIXON, A.; KAVANAGH, K. Utilization of *Galleria mellonella* larvae to characterize the development of *Staphylococcus aureus* infection. *Microbiology*, v. 165, p. 863–875, 2019.

SOUZA, G. S. *et al.* Activity of recombinant and natural defensins from *Vigna unguiculata* seeds against *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology*, v. 135, n. 1, p. 116–125, 2013. DOI: 10.1016/j.exppara.2013.06.005.

SOUZA, G. S. *et al.* A synthetic peptide derived from the $\beta 2$ - $\beta 3$ loop of the plant defensin from *Vigna unguiculata* seeds induces *Leishmania amazonensis* apoptosis-like cell death. *Amino Acids*, 2019. DOI: 10.1007/s00726-019-02800-8.

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 γ -cores. *Amino Acids*, v. 53, n. 2, p. 219–237, 2021. DOI: 10.1007/s00726-020-02929-x.

TORRES, M. *et al.* *Galleria mellonella* as a novelty in vivo model of host-pathogen interaction for *Malassezia furfur* CBS 1878 and *Malassezia pachydermatis* CBS 1879.

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 10, p. 199, 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00199.

TSCHERNER, M.; SCHWARZMÜLLER, T.; KUHLER, K. Pathogenesis and antifungal drug resistance of the human fungal pathogen *Candida glabrata*. *Pharmaceuticals*, v. 4, n. 1, p. 169–186, 2011. DOI: 10.3390/ph4010169.

TWITTENHOFF, C. *et al.* An RNA thermometer dictates production of a secreted bacterial toxin. *PLOS Pathogens*, v. 16, n. 1, e1008184, 2020. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008184.

UÇKAN, F. *et al.* Influence of indol-3-acetic acid on hemolymph chemistry of the host *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*, v. 4, p. 38–42, 2021.

VANREPELEN, G. *et al.* Sources of antifungal drugs. *Journal of Fungi*, v. 9, n. 2, p. 171, 2023. DOI: 10.3390/jof9020171.

VANDOOREN, J. *et al.* Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nature Methods*, v. 10, p. 211–220, 2013. DOI: 10.1038/nmeth.2371.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 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.

XU, D.; LU, W. Defensins: A double-edged sword in host immunity. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 764, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00764.

YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, DC, v. 101, n. 19, p. 7363–7368, 11 maio 2004. DOI: 10.1073/pnas.0401567101.

9. MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura S1: Barras de erros das curvas de sobrevivência das concentrações $0,5 \times 10^6$ células/larva $1,0 \times 10^6$ células/larva.

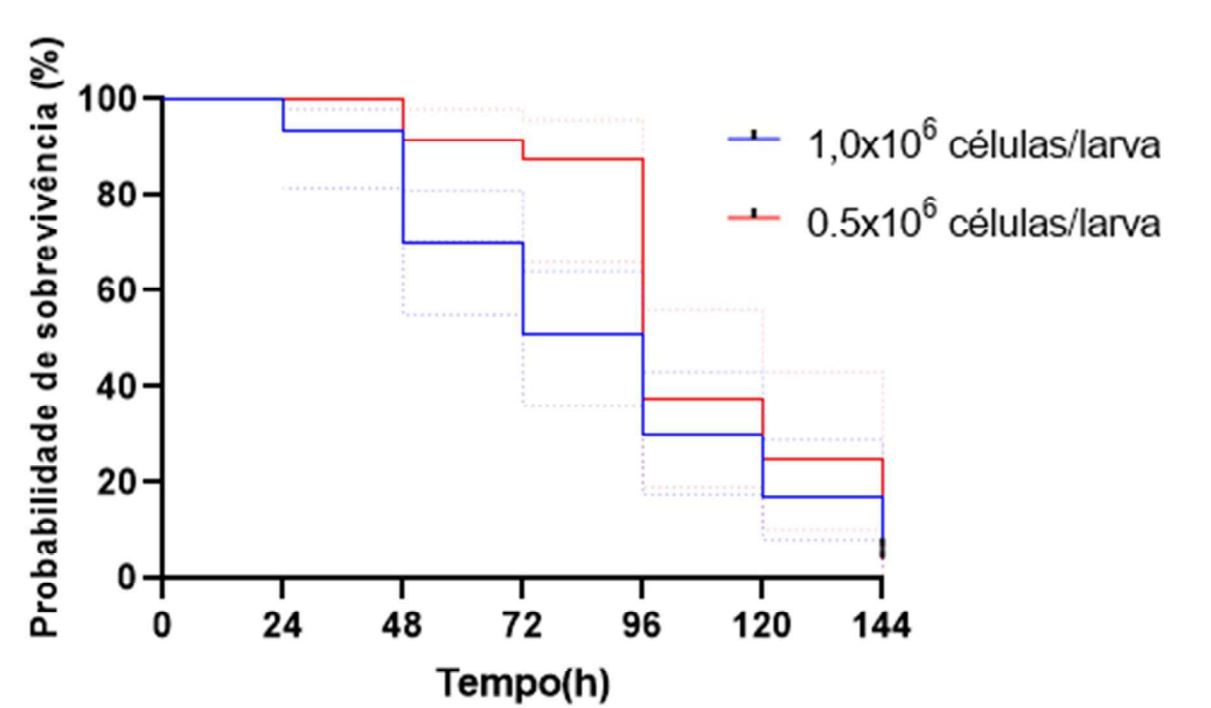


Tabela S1: Valores médios de IS para a categoria “Resposta ao toque” a cada 24 h para cada uma das concentrações testadas. Significância de: (a) $p < 0,0001$ e (ns) não significativos entre si, Two-way ANOVA teste de Turkey.

Células/larva	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
$2,0 \times 10^6$ ^a	0,25	0,08	0,04	0,00	0,00	0,00
$1,0 \times 10^6$ ^{a, ns}	1,81	1,08	0,69	0,50	0,33	0,00
$0,5 \times 10^6$ ^{a, ns}	2,86	1,75	1,08	0,71	0,71	0,00
PBS ^a	3,00	3,00	3,00	3,00	2,88	2,88

Tabela S2: Valores médios de IS para a categoria “Melanização” a cada 24 h para cada uma das concentrações testadas. Significância de: (a) $p < 0,0001$, (ns) não significativos entre si, Two-way ANOVA teste de Turkey.

Células/larva	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
$2,0 \times 10^6$ ^a	0,13	0,13	0,13	0,00	0,00	0,00
$1,0 \times 10^6$ ^{a, ns}	1,97	0,64	0,33	0,04	0,11	0,00
$0,5 \times 10^6$ ^{a, ns}	2,87	0,58	0,58	0,04	0,04	0,04
PBS ^a	4,00	4,00	4,00	4,00	3,88	3,83

Tabela S3: Valores médios de IS para a categoria “Casulo” a cada 24 h para cada uma das concentrações testadas. Significância de: (a) $p < 0,01$, (b) $p < 0,1$ e (ns) não significativos entre si, Two-way ANOVA teste de Turkey.

Células/larva	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
$2,0 \times 10^6$ ^a	0,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
$1,0 \times 10^6$ ^{b, ns}	0,44	0,01	0,01	0,06	0,01	0,00
$0,5 \times 10^6$ ^{b, ns}	0,64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PBS ^{a, b}	0,00	0,85	0,81	0,73	0,81	0,79

Tabela S4: Valores médios de IS para a categoria “Sobrevivência” a cada 24 h para cada uma das concentrações testadas. Significância de: (a) $p < 0,0001$, (b) $p < 0,01$ (c) $p < 0,1$ e (ns) não significativos entre si, Two-way ANOVA teste de Turkey.

Células/larva	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
$2,0 \times 10^6$ ^a	0,25	0,17	0,08	0,00	0,00	0,00
$1,0 \times 10^6$ ^{b, ns}	1,83	1,28	0,89	0,67	0,44	0,00
$0,5 \times 10^6$ ^{c, ns}	2,00	1,83	1,75	1,17	0,50	0,00
PBS ^{a, b, c}	2,00	2,00	2,00	2,00	1,92	1,92

Tabela S5: Valores médios de IS total a cada 24 h para cada uma das concentrações testadas. Significância de: (a) $p < 0,0001$, (b) $p < 0,01$ (c) $p < 0,1$ e (ns) não significativos entre si, Two-way ANOVA teste de Turkey.

Células/larva	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
$2,0 \times 10^6$ ^a	1,04	0,38	0,25	0,00	0,00	0,00
$1,0 \times 10^6$ ^{a, ns}	6,06	3,01	1,93	1,27	0,90	0,00
$0,5 \times 10^6$ ^{a, ns}	8,37	4,17	3,42	1,88	1,25	0,04
PBS ^a	9,00	9,85	9,81	9,73	9,48	9,42

Tabela S6: Valores médios de IS para a categoria “Resposta ao toque” a cada 24 h para cada um dos tratamentos. As letras representam a significância de: (a) não significativo quando comparado ao tratamento com PBS; (b) $p < 0,0001$ em relação ao inoculado com *C. albicans*; (c) não significativo em relação ao inoculado com *C. albicans*; (d) $p < 0,001$ em relação ao tratamento *C. albicans* + WR e (e) $p < 0,01$ em relação ao tratamento *C. albicans* + WR, segundo o Two-way ANOVA teste de Turkey.

Tratamento	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
PBS	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
WR ^a	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
FCZ ^a	3,00	3,00	2,87	2,80	2,80	2,80
<i>C. albicans</i>	2,67	1,33	0,83	0,67	0,67	0,00
<i>C. albicans</i> + FCZ ^{c, e}	2,73	2,33	1,33	1,27	1,00	0,80
<i>C. albicans</i> + WR ^{a, b}	2,90	2,75	2,75	2,15	2,15	2,10

Tabela S7: Valores médios de IS para a categoria “Melanização” a cada 24 h para cada um dos tratamentos. As letras representam a significância de: (a) não significativo quando comparado ao tratamento com PBS; (b) $p < 0,0001$ em relação ao inoculado com *C. albicans*; (c) não significativo em relação ao inoculado com *C. albicans*; (d) $p < 0,001$ em relação ao tratamento *C. albicans* + WR e (e) $p < 0,01$ em relação ao tratamento *C. albicans* + WR, segundo o Two-way ANOVA teste de Turkey.

Tratamento	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
PBS	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
WR ^a	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
FCZ ^a	4,00	4,00	3,73	3,73	3,73	3,73
<i>C. albicans</i> ^d	1,67	1,50	1,50	1,50	1,50	1,00
<i>C. albicans</i> + FCZ ^{c, d}	2,73	2,60	1,33	1,27	0,53	0,27
<i>C. albicans</i> + WR ^a	2,95	2,50	2,55	2,25	2,15	1,70

Tabela S8: Valores médios de IS para a categoria “Casulo” a cada 24 h para cada um dos tratamentos. As letras representam a significância de: (a) não significativo quando comparado ao tratamento com PBS; (b) $p < 0,0001$ em relação ao inoculado com *C. albicans*; (c) não significativo em relação ao inoculado com *C. albicans*; (d) $p < 0,001$ em relação ao tratamento *C. albicans* + WR e (e) $p < 0,01$ em relação ao tratamento *C. albicans* + WR, segundo o Two-way ANOVA teste de Turkey.

Tratamento	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
PBS	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
WR ^a	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
FCZ	0,87	0,77	0,80	0,00	0,00	0,00
<i>C. albicans</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>C. albicans</i> + FCZ ^c	0,40	0,20	0,20	0,17	0,20	0,13
<i>C. albicans</i> + WR ^a	0,68	0,28	0,35	0,30	0,25	0,05

Tabela S9: Valores médios de IS para a categoria “Sobrevivência” a cada 24 h para cada um dos tratamentos. As letras representam a significância de: (a) não significativo quando comparado ao tratamento com PBS; (b) $p < 0,0001$ em relação ao inoculado com *C. albicans*; (c) não significativo em relação ao inoculado com *C. albicans*; (d) $p < 0,001$ em relação ao tratamento *C. albicans* + WR e (e) $p < 0,01$ em relação ao tratamento *C. albicans* + WR, segundo o Two-way ANOVA teste de Turkey.

Tratamento	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
PBS	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
WR ^a	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
FCZ ^a	2,00	2,00	2,00	1,87	1,87	1,87
<i>C. albicans</i> ^e	2,00	1,87	1,73	1,33	0,53	0,00
<i>C. albicans</i> + FCZ ^{c, e}	2,00	2,00	0,93	0,67	0,67	0,67
<i>C. albicans</i> + WR ^a	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00

Tabela S10: Valores médios de IS total a cada 24 h para cada um dos tratamentos. As letras representam a significância de: (a) não significativo quando comparado ao tratamento com PBS; (b) $p < 0,0001$ em relação ao inoculado com *C. albicans*; (c) não significativo em relação ao inoculado com *C. albicans* e (d) $p < 0,001$ em relação ao tratamento *C. albicans* + WR, segundo o Two-way ANOVA teste de Turkey.

Tratamento	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
PBS	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
WR ^a	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
FCZ ^a	9,87	9,77	9,40	8,40	8,40	8,40
<i>C. albicans</i>	6,33	4,70	4,07	3,50	2,70	1,00
<i>C. albicans</i> + FCZ ^{c, d}	7,87	7,13	3,80	3,37	2,40	1,87
<i>C. albicans</i> + WR ^{a, b}	8,53	7,53	7,65	6,70	6,55	5,85