

**DESENHO DE UM PEPTÍDEO SINTÉTICO BASEADO NO γ -CORE
DA DEFENSINA DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata* L.
Walp.) E O ESTUDO DA INTERAÇÃO DESSE PEPTÍDEO COM
PROMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis***

GÉSSIKA SILVA SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL/2018

**DESENHO DE UM PEPTÍDEO SINTÉTICO BASEADO NO γ -CORE
DA DEFENSINA DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata* L.
Walp.) E O ESTUDO DA INTERAÇÃO DESSE PEPTÍDEO COM
PROMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis***

GÉSSIKA SILVA SOUZA

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

Orientador: Prof. André de Oliveira Carvalho

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

CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ

ABRIL/2018

**DESENHO DE UM PEPTÍDEO SINTÉTICO BASEADO NO γ -CORE
DA DEFENSINA DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata* L.
Walp.) E O ESTUDO DA INTERAÇÃO DESSE PEPTÍDEO COM
PROMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis***

GÉSSIKA SILVA SOUZA

Aprovada em 26 de abril de 2018.

Comissão examinadora:

Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UENF

Prof^ª. Dr. Victor Martin Quintana Flores (Doutor em Biociências e Biotecnologia) –
UENF

Prof^ª. Dr^ª. Desiely Silva Gusmão (Doutora em Biociências e Biotecnologia) – IFF

Prof. Dr. André de Oliveira Carvalho (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UENF

Orientador

Agradecimentos

À Deus por me sustentar em todos os momentos difíceis e por todas as graças recebidas.

Ao professor André de Oliveira Carvalho pela orientação, pelos conselhos e por toda paciência.

Aos membros da banca por aceitarem participar da minha defesa de tese.

Ao professor Edésio José Tenório de Melo pela colaboração ao longo desses anos na realização dos testes com protozoários e por todos os conselhos.

Ao Dr^a Gabriel Bonan Taveira por ter aceitado ser o revisor da minha tese.

À doutoranda Laís Pessanha de Carvalho pela colaboração na realização dos testes com protozoários.

Aos colegas e amigos do grupo Valdirene/André por toda ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos técnicos Luís, Noil e Valéria por toda a ajuda e pela manutenção do laboratório.

A todos os alunos, professores e funcionários do LFBM.

Aos amigos Flávia Camila, Maria Eliza, Julia Fardin, Larinne, Eliones, Roberta e Frederico pela amizade, por toda a ajuda prestada durante todo esse tempo, pelos momentos de descontração, pelos conselhos, pelas orações e por todo incentivo! Sou grata por vocês em minha vida.

Aos amigos dos Jovens Sarados e da Canção Nova por todo apoio e pelos momentos de descontração.

Aos meus pais, Bernadete e José Antônio, por toda compreensão, pelo apoio e por todo o incentivo durante a graduação, mestrado e doutorado. Obrigado por me amarem incondicionalmente! Amo vocês!

Ao meu irmão, João Otávio que mesmo distante fisicamente se fez tão presente, me dando forças e me incentivando para terminar o doutorado. Obrigado irmão! Te amo!

Índice

Agradecimentos.....	I
Índice.....	III
Lista de figuras.....	VI
Lista de quadros.....	VIII
Lista de abreviaturas.....	IX
Resumo.....	XI
Abstract.....	XIII
1. Introdução.....	1
1.1. Defesa de plantas.....	1
1.2. Defensina de plantas.....	3
1.2.1. Superfamília das defensinas.....	3
1.2.2. Aspectos gerais das defensinas de plantas.....	4
1.2.3. Aspectos estruturais das defensinas.....	5
1.2.4. Atividade biológica das defensinas de plantas.....	8
1.2.5. Mecanismo de ação sobre a inibição de micro-organismos.....	12
1.3. Leishmaniose.....	19

2. Objetivo.....	22
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. Material e métodos.....	23
3.1. Cultura de células.....	23
3.2. Obtenção da <i>Vu-Defr</i>	23
3.3. Modelagem da <i>Vu-Defr</i>	23
3.4. Peptídeo sintético.....	23
3.5. Determinação da atividade biológica do peptídeo sintético através do ensaio de inibição do crescimento da cultura de promastigota de <i>L. amazonensis</i>	24
3.6. Ensaio de inibição do crescimento da cultura de <i>L. amazonensis</i> em diferentes concentrações do peptídeo sintético.....	24
3.7. Ensaio de reversibilidade.....	24
3.8. Ensaio de inibição do crescimento da cultura de promastigota de <i>L. amazonensis</i> com o peptídeo sintético em diferentes tempos.....	25
3.9. Sincronização de células de <i>L. amazonensis</i> através de 1 mM de hidroxíureia.....	25
3.10. Análise ultraestrutural de promastigota de <i>L. amazonensis</i> na presença do peptídeo sintético.....	25
3.11. Determinação da fragmentação nuclear de células de <i>L. amazonensis</i> tratado com peptídeo sintético através do corante brometo de etídio.....	26

3.12. Determinação do potencial de membrana da mitocôndria em células de <i>L. amazonensis</i> tratado com peptídeo sintético através do marcador rodamina 123.....	26
3.13. Determinação de acidificação vesicular de células de <i>L. amazonensis</i> tratada com peptídeo sintético através do corante laranja de acridina	26
3.14. Estudo da temperatura sobre a ação biológica do peptídeo sintético em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	27
3.14.1. Ensaio de inibição do crescimento da cultura de <i>L. amazonensis</i> com o peptídeo sintético aquecido a 100 °C.....	27
3.14.2. Ensaio de inibição do crescimento da cultura de <i>L. amazonensis</i> a 4 °C.....	27
4. Resultados.....	28
4.1. Desenho do peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu-Def$	28
4.2. Bioatividade do peptídeo $\gamma_{32-46}Vu-Def$	32
4.3. Alterações ultraestruturais dos promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> na presença do $\gamma_{32-46}Vu-Def$	37
4.4. Fragmentação do DNA de células tratadas com $\gamma_{32-46}Vu-Def$	39
4.5. Despolarização da membrana mitocondrial de células de <i>Leishmania amazonensis</i>	40
4.6. Acidificação vesicular de células de <i>Leishmania amazonensis</i>	42
4.7. Efeito da temperatura na bioatividade do $\gamma_{32-46}Vu-Def$ em promastigota de <i>Leishmania</i>	44
5. Discussão.....	47
5.1. Peptídeo sintético.....	47
5.2. Bioatividade do peptídeo $\gamma_{32-46}Vu-Def$	48
5.3. Alterações ultraestruturais dos promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> na	51

presença do $\gamma_{32-46}Vu$ -Def.....	
5.4. Despolarização da membrana mitocondrial de células de <i>Leishmania amazonensis</i>	52
5.5. Acidificação vesicular de células de <i>Leishmania amazonensis</i>	53
5.6. Efeito da temperatura na bioatividade do $\gamma_{32-46}Vu$ -Def em promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i>	54
6. Conclusão	57
7. Referencias bibliografia	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Arranjo estrutural das <i>cis</i> -defensinas e das <i>trans</i> -defensinas sendo destacado em azul, amarelo e vermelho o arcabouço central conservado que caracteriza as defensinas em <i>cis</i> e <i>trans</i>	4
Figura 2. Estruturas terciária e primária da defensina <i>NaD1</i> de <i>Nicotiana glauca</i>	6
Figura 3. Estruturas terciária e primária da defensina <i>MsDef₁</i> de <i>Melicope satureioides</i>	7
Figura 4. Classes de defensinas de plantas, classe I (A) e classe II (B), com seus precursores.....	8
Figura 5. Mecanismos de ação da <i>DmAMP₁</i> (A) e da <i>RsAFP₂</i> (B) em células fúngicas.....	14

Figura 6. Mecanismos de ação de <i>PsD</i> ₁ (A), <i>MsDef</i> ₁ (B) e <i>MtDef</i> ₄ (C) em células fúngicas.....	16
Figura 7. Mecanismo de ação da defensina <i>NaD</i> ₁	18
Figura 8. A. Alinhamento da estrutura primária da <i>Vu-Defr</i> e da defensina <i>Vigna radiata</i> 2. B. Estrutura tridimensional da <i>Vu-Defr</i> modelada com Modeller com base na estrutura de <i>VrD2</i> . C. Passos do design do peptídeo sintético. D. O mesmo que descrito em B) com o peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu-Def$ indicado em roxo. E. Características bioquímicas do peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu-Def$	30
Figura 9. A. Visualização gráfica do <i>plot</i> de Ramachandran mostrando a posição dos aminoácidos do modelo da <i>Vu-Defr</i> em regiões favoráveis, permitidas e desfavoráveis. B. Tabela com a descrição estatística do Ramachandran.	31
Figura 10. Inibição do crescimento da cultura de <i>Leishmania amazonensis</i> na ausência (controle) e presença de <i>Vu-Defr</i> e do peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu-Def$	32
Figura 11. Inibição do crescimento da cultura de <i>Leishmania amazonensis</i> na ausência (controle) e presença do peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu-Def$, após 24 e 48 h de incubação.....	33
Figura 12. Reversibilidade da cultura de <i>Leishmania amazonensis</i> oriundas do ensaio de inibição depois de 48 h de incubação na presença do peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu-Def$	34
Figura 13. A. Inibição do crescimento da cultura de <i>Leishmania amazonensis</i> em diferentes tempos. B. Inibição do crescimento da cultura <i>Leishmania amazonensis</i> com células sincronizadas com 1 mM de hidroxíureia.....	36
Figura 14. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> tratados com 74 μ M de $\gamma_{32-46}Vu-Def$ por 8 h.....	38
Figura 15. Imagem das células de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com 74 μ M de $\gamma_{32-46}Vu-Def$ por 8 h e incubadas com o corante brometo de etídio.....	40
Figura 16. Imagem de células de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com 74 μ M de $\gamma_{32-46}Vu-Def$ por 4 h e incubadas com o marcador fluorescente rodamina 123.....	41
Figura 17. Imagem de células de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com 74 μ M de $\gamma_{32-46}Vu-Def$ por 4 h e incubadas com o marcador fluorescente laranja de acridina.....	43
Figura 18. Inibição do crescimento da cultura de <i>Leishmania amazonensis</i> na ausência (controle) e presença de 74 μ M do peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu-Def$ previamente aquecido a	

100 °C por 1 h.....	44
Figura 19. Inibição do crescimento da cultura de <i>Leishmania amazonensis</i> a 4 °C na ausência (controle) e presença de 74 µM de peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu$ -Def. O crescimento foi observado após 4 h de incubação a 4 °C e após outras 4 h a 28 °C.....	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Atividades biológicas de algumas defensinas de plantas com a indicação das espécies de onde as defensinas foram isoladas.....	10
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPs - Peptídeos antimicrobianos (do inglês, *Antimicrobial Peptides*)

ApDef₁ - Defensina de *Adenantha pavonina* (do inglês, *Adenantha pavonina Defensin one*)

CTPP - Propeptídeo C-terminal ácido (do inglês, *C-Terminal Pro-Peptide*)

CSαβ - Domínio αβ estabilizado por cisteínas (do inglês, *Cysteine-Stabilized α-helix β-sheet*)

CWI - Via de integridade da parede celular (do inglês, *Cell Wall Integrity*)

DmAMP₁ - Defensina de semente de *Dahlia merckii* (do inglês, *Dahlia merckii Antimicrobial Peptide one*)

DMSO - Dimetil sulfoxido (do inglês, *Dimethyl Sulfoxide*)

ETI - Imunidade desencadeada por efetores (do inglês, *Effector-Triggered Immunity*)

FBS - Soro bovino fetal (do inglês, *Foetal Bovine Serum*)

GlcCer - Glicosilceramida (do inglês, *Glucosylceramide*)

GP63 - Metaloprotease glicoproteína 63 (leishmanolisina)

HOG - Via de alta osmolaridade do glicerol (do inglês, *High Osmolarity/Glycerol*)

HU - Hidroxiureia

LPG - Lipofosfoglicano (do inglês, *Lipophosphoglycan*)

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógenos (do inglês, *Mitogen Activated Protein Kinase*)

MET - Microscópio Eletrônico de Transmissão

M(IP)₂C - Manosildiinositol fosforilceramida (do inglês, *Mannosyldiinositol Phosphorylceramide*)

- MsDef*₁ - Defensina de *Medicago sativa* (do inglês, *Medicago sativa Defensin one*)
- MtDef*₄ - Defensina de *Medicago trunculata* (do inglês, *Medicago trunculata Defensin four*)
- NaD*₁ - Defensina de *Nicotiana glauca* (do inglês, *Nicotiana glauca Defensin one*)
- PA - Ácido fosfatídico (do inglês, *Phosphatidic Acid*)
- PI(4,5)P₂ - Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (do inglês, *Phosphatidylinositol 4,5 Bisphosphate*)
- PR - Proteínas relacionadas a patogêneses (do inglês, *Pathogenesis-Related*)
- Proteína Avr - Proteína de avirulência (do inglês, *Avirulence*)
- Proteína R - Proteína de resistência (do inglês, *Resistance*)
- PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões (do inglês *Pattern Recognition Receptors*)
- PvD*₁ - Defensina de *Pisum sativum* (do inglês, *Pisum sativum Defensin one*)
- PTI - Imunidade desencadeada por padrão (do inglês, *Pattern-Triggered Immunity*)
- PTH₁ - Defensina de batata (*Solanum tuberosum*) (do inglês, *Pseudothionin*)
- PvD*₁ - Defensina de *Phaseolus vulgaris* (do inglês, *Phaseolus vulgaris Defensin one*)
- ROS - Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*)
- RvAFP*₂ – Defensina de *Raphanus sativa* (do inglês, *Raphanus sativa Antifungal Peptide two*)
- VrD*₂ - Defensina de *Vigna radiata* 2 (do inglês, *Vigna radiata Defensin two*)
- Vu-Defr* - Defensina recombinante de *Vigna unguiculata* (do inglês, *Vigna unguiculata Defensin Recombinant*)

Resumo

Estudos sobre relações estrutura-atividade de peptídeos antimicrobianos mostraram que os peptídeos são estabilizados por ligações dissulfeto e têm um elemento estrutural chamado γ -core, repositório da atividade antimicrobiana dos peptídeos. Nas defensinas das plantas, este elemento engloba a região de volta que liga a segunda folha β (β_2) à terceira folha β (β_3). Com base nessa informação, associada ao fato de que *Vu-Defr*, uma defensina de *Vigna unguiculata*, mostrou atividade contra *Leishmania amazonensis*, o objetivo deste trabalho foi realizar a síntese química da região do γ -core da *Vu-Defr* e usá-la para desvendar o mecanismo de ação das defensinas das plantas sobre microorganismos, usando o protozoário *L. amazonensis* como nosso alvo de estudo. Nossos resultados demonstraram que o peptídeo sintético baseado γ -core da *Vu-Def*, também chamado γ_{32-46} *Vu-Def*, mostrou atividade biológica semelhante à defensina *Vu-Defr* e a uma concentração de 74 μ M foi capaz de eliminar 97% de células de promastigotas de *L. amazonensis* na cultura. O efeito do peptídeo sobre o crescimento da cultura parasitária foi irreversível. Através de análises ultraestruturais, foi possível observar que, após 8 h de exposição ao peptídeo, ocorreram várias alterações ultraestruturais nas células parasitárias, como alterações de forma, tornando as células mais arredondadas, granulação do citoplasma, núcleos com cromatina desorganizada, nucléolo reduzido e distorcido e condensação de cromatina na periferia nuclear. As células tratadas também apresentaram mitocôndrias inchadas e cinetoplasto fragmentado, que também era mais eletrondenso. A marcação fluorescente com laranja de acridina, rodamina 123 e brometo de etídio corroborou os dados sobre a alteração de organelas observada por microscopia eletrônica. Mostramos ainda que a atividade do γ_{32-46} *Vu-Def* foi independente de sua conformação estrutural e que a 4 ° C o parasita se torna mais suscetível à ação peptídica.

Esses recursos sugerem que a interação γ_{32-46} *Vu-Def-L. amazonensis* resulta na eliminação do parasita através da ativação de uma via de morte celular apoptótica.

Abstract

Studies on structure-activity relationships of antimicrobial peptides have shown that peptides these are stabilized by disulfide bonds and have a structural motif called γ -core, repository of the peptide antimicrobial activity. In plant defensins this motif encompasses the loop region connecting the second β sheet ($\beta 2$) to the third β sheet ($\beta 3$). Based on this piece of information, associated by the fact that *Vu-Defr*, a defensin from *Vigna unguiculata*, has shown activity against *Leishmania amazonensis*, the purpose of this work was to perform the chemical synthesis of the *Vu-Defr* γ -core region and use it in order to unravel the mechanism of action of plant defensins over microorganisms, using the protozoan *L. amazonensis* as our target. Our results demonstrated that the synthetic peptide based on the *Vu-Def* γ -core, also called γ_{32-46} *Vu-Def*, showed biological activity similar to the defensin *Vu-Defr* and at concentration of 74 μM was capable of eliminating 97% of *L. amazonensis* promastigote in cell culture. The effect of the peptide on parasite culture growth was irreversible. By ultrastructural analyses, it was possible to observe that after 8 h of exposure to the peptide several ultrastructural changes occurred in the parasite cells, such as shape alterations rendering rounded cells, cytoplasm granulation, nuclei with disorganized chromatin, reduced and distorted nucleolus and condensation of chromatin in the nuclear periphery. Treated cells also presented swollen mitochondria and splited kinetoplast which was also more electro dense. Fluorescent labeling with acridine orange, rhodamine 123 and ethidium bromide corroborated the data on the organelles alteration observed by electron microscopy. We further show that the activity of the γ_{32-46} *Vu-Def* was independent of its structural conformation and that at 4 °C the parasite become more susceptible to the peptide action. These features altogether suggest that γ_{32-46} *Vu-Def-L. amazonensis*

interaction results in parasite elimination through activation of an apoptotic-like cell death pathway.

1. Introdução

1.1. Defesa de plantas

Vírus, bactérias, fungos, e protozoários estão entre os agentes biológicos causadores de várias doenças em plantas e animais, podendo ser letais. (Pennisi, 2010; Scorza *et al.*, 2017). Em contrapartida, ao longo da evolução dos hospedeiros foram selecionadas estratégias de defesa para revidar o ataque desses agentes patogênicos. As plantas, por exemplo, utilizam um mecanismo de proteção que inclui barreiras constitutivas e respostas induzidas (Nürnberger e Lipka, 2005). As barreiras constitutivas, ditas pré-formadas, podem ser físicas como as camadas de cera e as paredes celulares rígidas, ou químicas, como os metabolitos secundários antimicrobianos, como exemplo, as fitoanticipinas. Essas barreiras pré-formadas servem como uma primeira camada de proteção da planta, podendo bloquear a invasão do patógeno (Nürnberger e Lipka, 2005; Miller *et al.*, 2017).

A primeira linha de defesa do sistema imune inato das plantas ocorre quando os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*) da superfície transmembranar reconhecem os padrões moleculares dos patógenos. Tais padrões geralmente são exclusivos dos patógenos ou estão inacessíveis nos hospedeiros. Há também moléculas que são produtos de degradação geradas em ferimentos ou infecções, denominadas de padrões moleculares associadas ao dano e portanto, estes padrões quando são reconhecidas pelos PRRs desencadeiam uma série de respostas fisiológicas e celulares que contribuem para a defesa contra um amplo espectro de agentes patogênicos, coletivamente denominada de imunidade desencadeada por padrão (PTI, do inglês *pattern-triggered immunity*) (Miller *et al.*, 2017; Musidlak *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2017). Nesta linha de defesa do sistema imune inato a ativação dos PRRs resulta em uma sinalização intracelular e modulação da expressão de genes do hospedeiro que desencadeiam em respostas de defesa que restringem a ação microbiana no hospedeiro. Portanto, PTI é considerada responsável pela resistência não específica do hospedeiro (Miller *et al.*, 2017).

A segunda linha de defesa do sistema imune, denominada imunidade desencadeada por efetores (ETI, do inglês *effector-triggered immunity*), é baseada na utilização de proteínas de resistências da planta (R, do inglês *resistance*) contra proteínas de avirulência do patógenos (Avr, do inglês *avirulence*). Os patógenos

carregam diferentes tipos de efetores Avr e durante a infecção estes são liberados nas células das plantas. As plantas se defendem dos patógenos através das proteínas R, as quais podem detectar as Avr e induzir respostas de defesa. As Avr agem como eliciadores específicos da defesa de plantas. (Miller *et al.*, 2017; Musidlak *et al.*, 2017). As respostas de defesa induzidas por PTI e ETI são semelhantes, no entanto, a ETI gera uma resposta mais rápida e acelerada e geralmente leva a uma morte celular programada localizada, a qual está ligada a resposta de hipersensibilidade que em poucas horas levam as plantas a produzirem diferentes proteínas relacionadas à patogênese (PR, do inglês *pathogenesis-related*) (Musidlak *et al.*, 2017). Essas proteínas são divididas em 17 famílias e podem dar resistências as plantas a vários agentes patogênicos incluindo vírus, bactérias, oomicetos, fungos e insetos. Por definição, proteínas PRs são proteínas codificadas pelas plantas, mas que são induzidas especificamente em situações patológicas ou relacionadas à patogênese. Portanto, para uma proteína ser incluída como uma nova família de PR ela deve possuir alguns critérios como ser induzida por um agente patogênico em tecidos que normalmente não as expressam e a expressão da indução deve ocorrer em pelo menos duas combinações diferentes de patógenos vegetais, ou a expressão da proteína mediante a interação de uma única combinação de patógeno deve ser confirmada em diferentes laboratórios (van Loon, 1997; van Loon e van Strien, 1999).

Entre as proteínas classificadas como PRs, as PR-12, PR-13 e PR-14, compreendem as famílias das defensinas de plantas, tioninas e proteínas transportadoras de lipídeos, respectivamente. Estas famílias de PRs pertencem a um grupo específico de moléculas de defesa de plantas denominados de peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*). Estes AMPs são proteínas pequenas com massa molecular abaixo de 10 kDa, codificadas por um único gene, ricas em resíduos de aminoácidos carregados positivamente, o que os conferem carga líquida positiva em pH neutro, e em geral, são ricas em resíduos de cisteínas que se ligam em pares formando pontes dissulfeto. Estas pontes dissulfeto conferem estabilidade estrutural aos AMPs tornando-os resistentes a solventes ácidos e orgânicos e a altas temperaturas. Uma outra característica comum apresentada pelos AMPs é uma ampla variedade de atividades biológicas com destaque para a atividade antimicrobiana (Benko-Iseppon *et al.*, 2010).

Os AMPs de plantas de acordo com similaridade da sequência, número de resíduos de cisteínas, padrão de ligação das pontes dissulfeto e o arranjo da estrutura

terciária são divididos em famílias sendo as principais: proteínas transportadoras de lipídios, esnaquinas, peptídeos semelhantes à heveína, tioninas, peptídeos semelhantes à kinotina, α -hairpinin e defensas de plantas (Tam *et al.*, 2015).

1.2. Defensas de plantas

1.2.1. Superfamília das defensas

A família das defensas de plantas pertence à superfamília das defensas que além das plantas estão presentes em invertebrados e vertebrados fazendo parte dos seus mecanismos de defesa. Entre as famílias das defensas algumas características são bem conservadas, como pequeno tamanho (menos de 10 kDa), catiônicas, com carga líquida variando de +1 a +5 e ricas em resíduos de cisteínas o que permite a formação de três a seis pontes dissulfeto (Cools *et al.*, 2017; Parisi *et al.*, 2017; Shafee *et al.*, 2017). De uma maneira geral, as defensas compartilham estrutura terciária semelhante, apresentando como elementos da estrutura secundária, duas ou três folhas β antiparalelas e nenhuma ou uma α -hélice, e estes elementos da estrutura secundária são ligados entre si por pontes dissulfeto (Shafee *et al.*, 2017). Apesar das defensas inicialmente serem classificadas em uma superfamília, Shafee *et al.* (2016), através de análise das estruturas primárias, secundárias e terciárias da superfamília das defensas, revelaram a existência de duas superfamílias independentes, as *cis*-defensas e as *trans*-defensas. Apesar de uma similaridade estrutural entre as duas superfamílias, não é possível fazer o alinhamento estrutural devido a diferença na ordem e orientação dos elementos da estrutura secundária (Shafee *et al.*, 2016). A organização das pontes dissulfeto das *cis*-defensas ocorrem no mesmo sentido, um par de cisteínas presente na folha β_3 interage com um outro par de cisteína presente na α -hélice, formando um arranjo estrutural conservado entre as *cis*-defensas (Figura 1). Já as *trans*-defensas possuem uma organização em sentido diferente, uma das cisteínas do par presente na folha β_3 interage com uma cisteína da α -hélice e a outra interage com uma cisteína presente em uma região de volta (Figura 1). Portanto, formando um arranjo estrutural com padrão de pontes dissulfeto diferente das *cis*-defensas. As *trans*-defensas estão presentes em vertebrados e em crustáceos nas grandes defensas de insetos. Enquanto as *cis*-defensas estão presentes na maioria dos invertebrados, fungos e plantas (Shafee *et al.*, 2016, 2017; Parisi *et al.*, 2017).

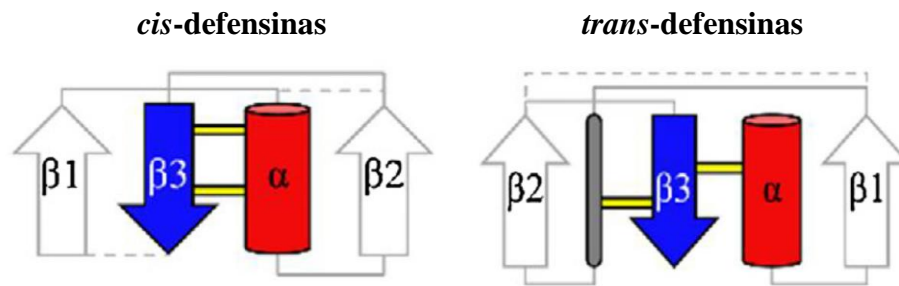


Figura 1. Arranjo estrutural das *cis*-defensinas e das *trans*-defensinas sendo destacado em azul, amarelo e vermelho o arcabouço central conservado que caracteriza as defensinas em *cis* e *trans* (Adaptado de Parisi *et al.* 2017). (α) α -hélice; ($\beta 1$) folha $\beta 1$; ($\beta 2$) folha $\beta 2$; ($\beta 3$) folha $\beta 3$; em amarelo as pontes dissulfeto mais conservada entre as superfamílias das defensinas; em azul e vermelho os elementos estruturais que formam o arcabouço central conservado; em cinza elemento estrutural de volta que conecta a $\beta 1$ a $\beta 2$; linhas cinzas correspondem a pontes dissulfeto menos conservadas; linhas cinzas tracejadas correspondem a pontes dissulfeto não conservadas.

1.2.2. Aspectos gerais das defensinas de plantas

As defensinas de plantas são peptídeos básicos com massa molecular de aproximadamente 6 kDa que fazem parte do sistema imune inato das plantas e que apresentam várias atividades biológicas (Cools *et al.*, 2017; Parisi *et al.*, 2017) entre elas a atividade antimicrobiana em concentrações micromolares (Carvalho e Gomes, 2011).

Inicialmente as defensinas de plantas foram isoladas do endosperma de cevada (*Hordeum vulgare*) (Mendez *et al.*, 1990) e de trigo (*Triticum turgidum*) (Colilla *et al.*, 1990). Baseados na similaridade da massa molecular, na sequência de aminoácidos e no seu número de resíduos de cisteína elas foram caracterizadas como um novo membro da família das tioninas, sendo classificadas como γ -tioninas (Carrasco *et al.*, 1981; Thomma *et al.*, 2002). Mas sua conformação estrutural disposta em três fitas β antiparalelas e uma α -hélice estabilizada por quatro pontes dissulfeto, as diferenciavam estruturalmente das tioninas, assim como o pareamento dos resíduos de cisteínas (Bruix *et al.*, 1993). Alguns anos depois, devido a sua similaridade estrutural com defensinas

de mamíferos (Ganz *et al.*, 1985) e insetos (Lambert *et al.*, 1989), as γ -tioninas foram renomeadas como defensinas de plantas (Terras *et al.*, 1995). Além das sementes de trigo e cevada, as defensinas de plantas já foram isoladas de diversas espécies e de diferentes órgãos, sendo encontradas principalmente na camada periférica dos tecidos vegetais, reforçando o papel destes peptídeos na defesa hospedeira, por ser este o local de primeiro contato do patógeno com a planta. Nas sementes, por exemplo, são encontradas na parede celular e no espaço extracelular (Terras *et al.*, 1995; Almeida *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002; Carvalho e Moreira Gomes, 2011).

1.2.3. Aspectos estruturais das defensinas

Defensinas de plantas abrangem de 45 a 54 resíduos de aminoácidos e são caracterizadas por possuírem uma estrutura terciária globular composta por três fitas β antiparalelas e uma α -hélice (Fant *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2011) (Figura 2). Esta estrutura terciária é estabilizada por quatro pontes dissulfeto com o seguinte padrão de formação de pares de cisteínas (C₁-C₈, C₂-C₅, C₃-C₆, C₄-C₇) (Wilmes *et al.*, 2011; Shafee *et al.*, 2016) que conferem a molécula uma alta estabilidade na presença de proteases e em pH e temperatura extremos (Wong e Ng, 2005a; b; de Beer e Vivier, 2008). Duas destas pontes dissulfeto contribuem para a formação do domínio conservado das *cis*-defensinas, denominado domínio $\alpha\beta$ estabilizado por cisteínas (CS $\alpha\beta$, do inglês *cysteine-stabilized α -helix β -sheet*). Esse domínio é formado por um par de cisteínas localizado na α -hélice que se liga a um segundo par de cisteínas localizado na folha β 3 (C₃-C₆ e C₄-C₇) (Figura 2) (Thomma, 2002).

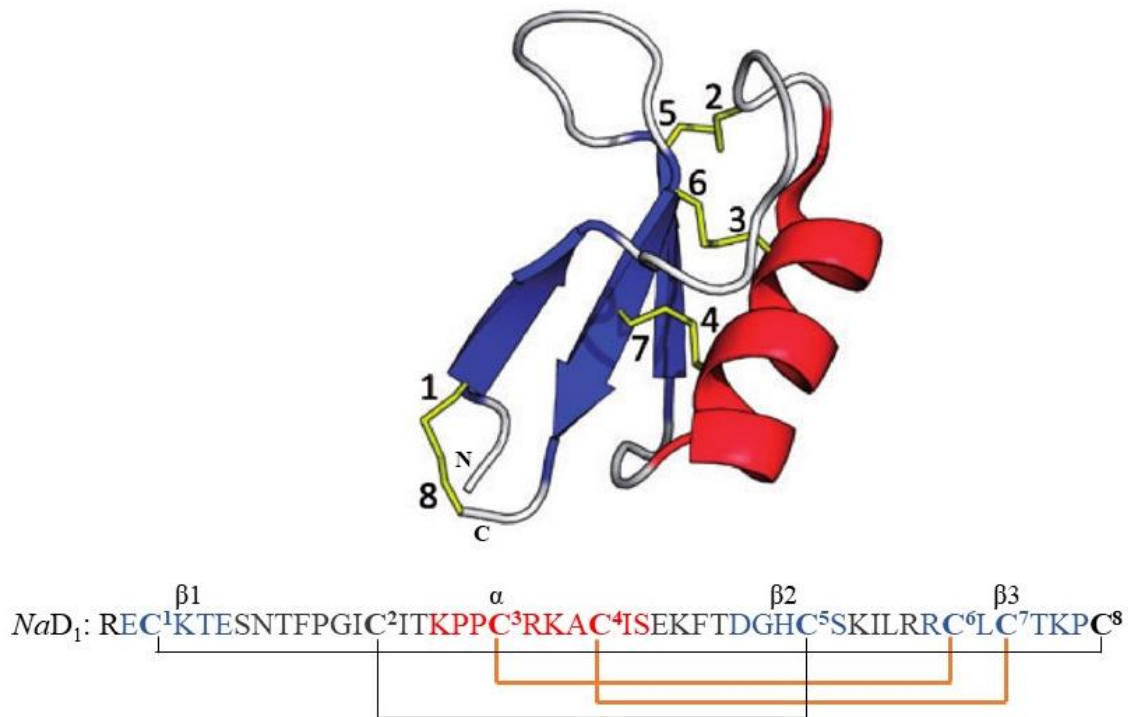


Figura 2. Estruturas terciária e primária da defensina *NaD1* de *Nicotiana alata* (Adaptado de Shafee *et al.*, 2016). Para as duas estruturas são mostrados em vermelho a α -hélice, em azul as folhas β , em amarelo as pontes dissulfeto onde os números indicam os resíduos de cisteínas que as formam e em cinza as voltas. As linhas abaixo dos resíduos de cisteínas (destacados em negrito) na estrutura primária indicam as pontes dissulfeto. As linhas destacadas em amarelo escuro indicam o domínio $CS\alpha\beta$. C e N indicam o C-terminal e o N-terminal, respectivamente.

Outros dois elementos formados são o elemento estrutural α -core e o γ -core. O α -core é formado pela região de volta que conecta a primeira folha β ($\beta 1$) a α -hélice. E o γ -core é formado pela região de volta que conecta a segunda folha β ($\beta 2$) a terceira folha β ($\beta 3$) (Figura 3) (Yount e Yeaman, 2004; Lacerda *et al.*, 2014), sendo este último descrito como responsável pela atividade antimicrobiana de algumas defensinas (Schaaper *et al.*, 2001; Sagaram *et al.*, 2011).

de precursores maiores, que além da sequência sinal do retículo endoplasmático e da defensina madura também possui um propeptídeo C-terminal ácido (CTPP, do inglês *C-terminal pro-peptide*) que após o direcionamento para o vacúolo é proteoliticamente removido durante a maturação. E a maioria das defensinas classe II são encontradas em tecidos florais e frutas de espécies de solanáceas (Lay e Anderson, 2005; Cools *et al.*, 2017; Parisi *et al.*, 2017).

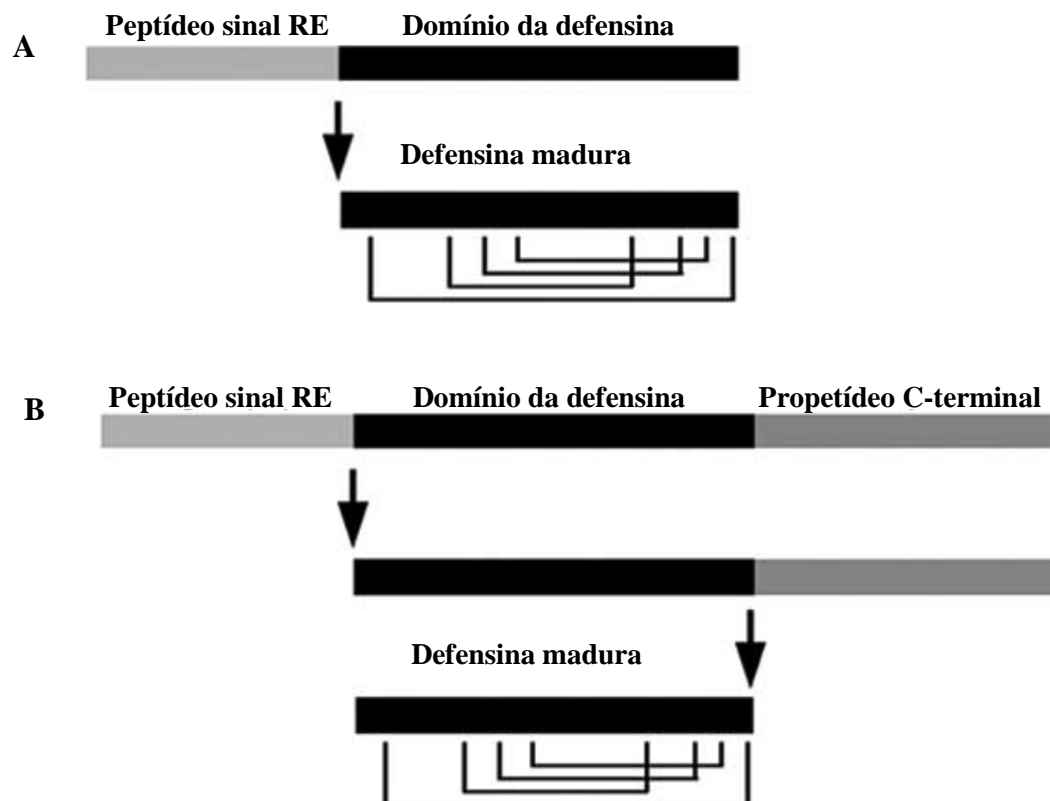


Figura 4. Classes de defensinas de plantas, classe I (A) e classe II (B), com seus precursores (Adaptado de Lay e Anderson, 2005). As linhas abaixo das defensinas maduras indicam as pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteínas.

1.2.4. Atividade biológica das defensinas de plantas

Como já descrito anteriormente a grande variação nas sequências de aminoácidos entre as cisteínas conservadas confere diferentes atividades biológicas às diferentes defensinas de plantas. Entre as atividades biológicas já descritas estão: a inibição da síntese de proteína através da interação com ácidos nucleicos (Colilla *et al.*,

1990; Mendez *et al.*, 1990; Terras *et al.*, 1995), a inibição de α -amilase e tripsina a qual interfere na digestão dos insetos (Wijaya *et al.*, 2000; Pelegrini *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010), papel na tolerância a metais pesados (Mirouze *et al.*, 2006), a inibição do crescimento da raiz de plantas (Allen *et al.*, 2008), na reprodução sexual (Stotz *et al.*, 2009) e na inibição dos canais de íons em células de mamíferos e plantas (Spelbrink, 2004), atividade mitogênica (Ye e Ng, 2001; Wong *et al.*, 2006), atividade contra células cancerígenas (Poon *et al.*, 2014; Figueira *et al.*, 2017), atividade inibitória sobre *Leishmania* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2013; do Nascimento *et al.*, 2015), atividade antibacteriana descrita por algumas poucas defensinas de plantas (Osborn *et al.*, 1995; Franco *et al.*, 2006) e atividade antifúngica que é descrita para maioria das defensinas de plantas (Terras *et al.*, 1995; Ye e Ng, 2001; Wong e Ng, 2005b; de Beer e Vivier, 2008). Segue no quadro 1 as atividades que já foram descritas para algumas defensinas.

As defensinas de plantas também são conhecidas por seu papel na defesa de plantas, trabalhos como Terras *et al.* (1995) e Kanzaki *et al.* (2002) corroboram essa ideia. Terras *et al.* (1995) demonstraram que as defensinas podem contribuir na proteção das sementes durante a germinação. Colocando uma semente de rabanete (*Raphanus sativa*) para germinar em um meio de cultura contendo o fungo *Pyrenophora tritici-repentis* eles observaram a liberação da defenina *RsAFP₂* (*Raphanus sativa antifungal peptide two*) no meio o que gera a inibição do fungo. Também demonstraram que as defensinas podem ser induzidas em resposta a presença do patógeno. Folhas de rabanete que foram infectadas com o fungo *Alternaria brassicola* passaram a expressar duas defensinas, *RsAFP₃* e *RsAFP₄*, com homologia a defenina *RsAPP₂*. E para validar o papel da defenina *RsAFP₂* na defesa de plantas eles expressaram constitutivamente a defenina em plantas de tabaco sendo constatado que as plantas transgênicas eram mais resistentes ao fungo foliar *Alternaria longipes*. Kanzaki *et al.* (2002) também comprovam esse papel de defesa da defenina de plantas. Através da superexpressão do gene da defenina de wasabi (*Wasabi japonica*) em arroz (*Oryza sativa* cv. Sasanishiki) Kanzaki *et al.* (2002) demonstraram que a planta transgênica era mais resistente ao fungo *Maganaporthe grisea*, causador da brunose em arroz, do que a planta selvagem.

Quadro 1. Atividades biológicas de algumas defensinas de plantas com a indicação das espécies de onde as defensinas foram isoladas (Adaptada de Carvalho e Gomes, 2011).

Atividade Biológica	Nome da defensina e espécies de planta	Referências
Atividade inibitória da tradução protéica	RBAFP (<i>Adzuckia angularia</i>); γ -hordotionina e ω -hordotionina (<i>Hordeum vulgare</i>); PBAFP e WCBAFP (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Méndez <i>et al.</i> , 1996; Ye and Ng, 2001; Wong <i>et al.</i> , 2006
Efeito inibitório sobre transcriptase reversa do HIV	RBAFP (<i>Adzuckia angularia</i>); gymnima (<i>Gymnocladus chinensis</i>); PBAFP e WCBAFP (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Ye and Ng, 2001; Wong and Ng, 2003; Wong <i>et al.</i> , 2006
Atividade mitogênica	RBAFP (<i>Adzuckia angularia</i>); PBAFP e WCBAFP (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Ye and Ng, 2001; Wong <i>et al.</i> , 2006
Antibacteriana	Ah-AMPI(<i>Aesculus hippocastanum</i>); Br-AMP ₂ (<i>Brassica rapa</i>); Ct-AMP ₁ (<i>Clitoria ternatae</i>); Dm-AMP ₁ (<i>Dhalia merckii</i>); SPD ₁ (<i>Ipomoea batatas</i>)	Terras <i>et al.</i> , 1993; Osborn <i>et al.</i> , 1995; Huang <i>et al.</i> , 2008
Tolerância a metal pesado	Ah-PDF1.1 (<i>Arabidopsis halleri</i>)	Mirouze <i>et al.</i> , 2006
Antifúngica	RBAFP (<i>Adzuckia angularia</i>); Ah-AMP ₁ (<i>Aesculus hippocastanum</i>); Ah-PDF1.1 (<i>Arabidopsis halleri</i>) PDF 1.1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>); AX ₁ e AX ₂ (<i>Beta vulgaris</i>); BSD1 (<i>Brassica campestris</i>); Bn-AMP ₁ e Bn-AMP ₂ (<i>Brassica napus</i>); Br-AMP ₁ e Br-AMP ₂ (<i>Brassica rapa</i>); CADEF ₁ e J1 (<i>Capsicum annuum</i>); γ -tionina (<i>Capsicum chinense</i>); Ct-AMP ₁ (<i>Clitoria ternatae</i>); Dm-AMP ₁ e Dm-AMP ₂ (<i>Dhalia merckii</i>); Ec-AMP-D ₁ e Ec-AMP-D ₂ (<i>Echinocloa crusgalli</i>); gymnima (<i>Gymnocladus chinensis</i>); Hs-AMP ₁ (<i>Heuchera sanguinea</i>); SPD ₁ (<i>Ipomoea batatas</i>); MsDEF ₁ (<i>Medicago sativa</i>); NaD ₁ (<i>Nicotiana alata</i>); PhD ₁ e PhD ₂ (<i>Petunia hybrida</i>); PvD ₁ (<i>Phaseolus vulgaris</i>); PsD ₁ e PsD ₂ (<i>Pisum sativum</i>); Rs-AFP ₁ e Rs-AFP ₂ (<i>Raphanus sativus</i>); Vu-Def (<i>Vigna unguiculata</i>); ApDef ₁ (<i>Adenonthera pavonina</i>)	Terras <i>et al.</i> , 1992, 1993; Osborn <i>et al.</i> , 1995; Kragh <i>et al.</i> , 1995; Meyer <i>et al.</i> , 1996; Penninckx <i>et al.</i> , 1996; Almeida <i>et al.</i> , 2000; Gao <i>et al.</i> , 2000; Ye and Ng, 2001; Park <i>et al.</i> , 2002; Wong and Ng, 2003; Lay <i>et al.</i> , 2003; Do <i>et al.</i> , 2004; Anaya-López <i>et al.</i> , 2006; Carvalho <i>et al.</i> ,

		2006; Odintsova <i>et al.</i> , 2008; Games <i>et al.</i> , 2008; Huang <i>et al.</i> , 2008; Marquès <i>et al.</i> , 2009; Li and Li, 2009; Soares <i>et al.</i> , 2017
Auto incompatibilidade	PCP-A ₁ (<i>Brassica oleracea</i>)	Doughty <i>et al.</i> , 1998
Atividade inibitória sobre tripsina	5459 (<i>Cassia fistula</i>); SPD ₁ (<i>Ipomoea batatas</i>)	Wijaya <i>et al.</i> , 2000; Huang <i>et al.</i> , 2008
Atividade inibitória sobre células cancerígenas	Ct-AMP ₁ (<i>Capsicum chinense</i>); gymnima (<i>Gymnocladus chinensis</i>); NaD ₁ (<i>Nicotiana glauca</i>), PvD ₁ (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Wong and Ng, 2003; Anaya-López <i>et al.</i> , 2006; Poon <i>et al.</i> , 2014; Baxter <i>et al.</i> , 2015; Figueira <i>et al.</i> , 2017
Atividade inibitória sobre α -amilase	ω -hordotionina (<i>Hordeum vulgare</i>); Vu-Def (<i>Vigna unguiculata</i>)	Mendez <i>et al.</i> , 1990; Santos <i>et al.</i> , 2010
Atividade redutase dehidro-e monodehidroascorbato	SPD ₁ (<i>Ipomoea batatas</i>)	Huang <i>et al.</i> , 2008
Atividade inibitória sobre oomiceto	Lm-def (<i>Lepidium meyenii</i>)	Solis <i>et al.</i> , 2007
Bloqueios de canais de cálcio tipo-L de mamíferos	MsDef ₁ (<i>Medicago sativa</i>)	Spelbrink, 2004
Atividade inibitória sobre o crescimento de raiz de planta	MsDef ₁ (<i>Medicago sativa</i>)	Gao <i>et al.</i> , 2000; Allen <i>et al.</i> , 2008
Atividade inibitória sobre <i>Leishmania</i>	PTH ₁ (<i>Solanum tuberosum</i>); Vu-Def (<i>Vigna unguiculata</i>); PvD ₁ (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Berrocal-Lobo <i>et al.</i> , 2009; Souza <i>et al.</i> , 2013; do Nascimento <i>et</i>

		<i>al.</i> , 2015
Bloqueio de canal de sódio	γ_1 -zeationina e γ_2 -zeationina (<i>Zea mays</i>)	Kushmerick <i>et al.</i> , 1998; Kant <i>et al.</i> , 2009

1.2.5. Mecanismo de ação sobre a inibição de micro-organismos

Apesar das defensinas de plantas apresentarem múltiplas atividades biológicas pouco se sabe quanto ao seu mecanismo de ação. O mecanismo mais estudado é o da sua ação antifúngica, no entanto até esse mecanismo não foi totalmente elucidado (Lacerda *et al.*, 2014; Vriens *et al.*, 2014; Cools *et al.*, 2017; Parisi *et al.*, 2017). Muitos esforços têm sido realizados para desvendar o mecanismo de ação, com enfoque na identificação de seus alvos microbianos, na elucidação da interação defensina-alvo em um nível molecular, e na caracterização das vias e processos de sinalização que levam à morte das células microbianas ou inibição do crescimento celular (Thevissen *et al.*, 2000, 2003a; Wilmes *et al.*, 2011; Poon *et al.*, 2014). O que tem sido demonstrado é que as defensinas fazem ligações lipídicas com componentes da membrana de fungos, e que a especificidade dessa ligação é muitas vezes mediada pela região do γ -core (Sagaram *et al.*, 2011; Wilmes *et al.*, 2011; Parisi *et al.*, 2017). Alguns dos componentes lipídicos descritos são: os esfingolipídeos manosildiinositol fosforilceramida (M(IP)₂C, do inglês *mannosyl-diinositol phosphorylceramide*) (Thevissen *et al.*, 2003a) e glicosilceramida (GlcCer, do inglês *glucosylceramide*) (Thevissen *et al.*, 2003b) de fungos, o ácido fosfatídico (PA, do inglês *phosphatidic acid*) (Payne *et al.*, 2016) e o fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PI(4,5)P₂, do inglês *phosphatidylinositol 4,5 biphosphate*) (Poon *et al.*, 2014; Baxter *et al.*, 2015).

Um dos primeiros sítios lipídicos de ligação em fungos foi demonstrado na interação da defensina de semente de dália, *DmAMP*₁ (*Dahlia merckii antimicrobial peptide one*,) com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, onde a *DmAMP*₁ marcada com enxofre radioativo foi incubada com fungos geneticamente modificados. Dessa forma foi possível identificar que o sítio de ligação para *DmAMP*₁ na membrana da levedura *S. cerevisiae* é o esfingolipídeo M(IP)₂C e observou-se a importância desse alvo, quando avaliado o crescimento de uma cepa mutante da levedura, deficiente em M(IP)₂C. Viu-se que essa levedura mutante, quando incubada com a defensina, apresentou resistência à defensina, diferentemente da cepa selvagem que era suscetível

(Thevissen *et al.*, 2003a, 2004). Esfingolipídeos como o M(IP)₂C e GlcCer, combinado a esteróis, formam *rafts* de membrana (*rafts* lipídicos) que estão presentes em domínios específicos da camada externa das membranas plasmáticas fúngicas. Portanto, *DmAMP*₁ pode interagir com esfingolipídeos que estão concentrados nesses *rafts* lipídicos (Thevissen *et al.*, 2003a; b). A interação entre *DmAMP*₁ e M(IP)₂C leva ao aumento do número de respostas rápidas na membrana fúngica, como o aumento do efluxo de K⁺ e do influxo de Ca²⁺, a mudança no potencial de membrana e a permeabilização da membrana (Thevissen *et al.*, 1996, 1999). Com a ação de compostos antifúngicos os fungos induzem mecanismos para ajudá-los a lidar com efeitos causados pelo composto antifúngico (Cools *et al.*, 2017). Os fungos na presença de *DmAMP*₁, por exemplo, resistem aos efeitos causados pela defensina ativando a via de integridade da parede celular (CWI, do inglês *cell wall integrity*) (Figura 5A).

A defensina de semente de rabanete *RsAFP*₂ assim como a *DmAMP*₁ produz respostas rápidas na membrana fúngica como a captação de Ca²⁺ e efluxo de K⁺ e alterações no potencial de membrana (Thevissen *et al.*, 1996). Essas respostas são induzidas a partir da interação de *RsAFP*₂ com o esfingolipídeo GlcCer presente na membrana dos fungos, esse estudo foi realizado em *Candida albicans*, *Pichia pastoris* e *Neurospora crassa* (Thevissen *et al.*, 2003b). O sítio de ligação exato da *RsAFP*₂ com a GlcCer ainda não é conhecido, mas sugere-se que a região que engloba a volta da folha β₂ e β₃ desempenhe um papel na ligação à membrana antifúngica visto que peptídeos derivados dessa sequência mantiveram sua atividade antifúngica (De Samblanx *et al.*, 1997; Schaaper *et al.*, 2001). Essa interação entre *RsAFP*₂ e GlcCer também induz espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) em *C. albicans* e atua como forma de defesa para o fungo cascatas de sinalização da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK, do inglês *mitogen activated protein kinase*) via CWI em *Fusarium graminearum* a qual é ativada por dano da parede celular (Aerts *et al.*, 2007; Ramamoorthy *et al.*, 2007). Em leveduras as cascatas de MAPK estão envolvidas na resposta do crescimento filamentoso, na CWI e na resposta de alta osmolaridade do glicerol (HOG, do inglês *high osmolarity/glycerol*). Também já foi descrito que *RsAFP*₂ induz a morte celular programada ou apoptose em *C. albicans* envolvendo metacaspases, mas independente da metacaspase CaMca1p (Aerts *et al.*, 2009) (Figura 5B).

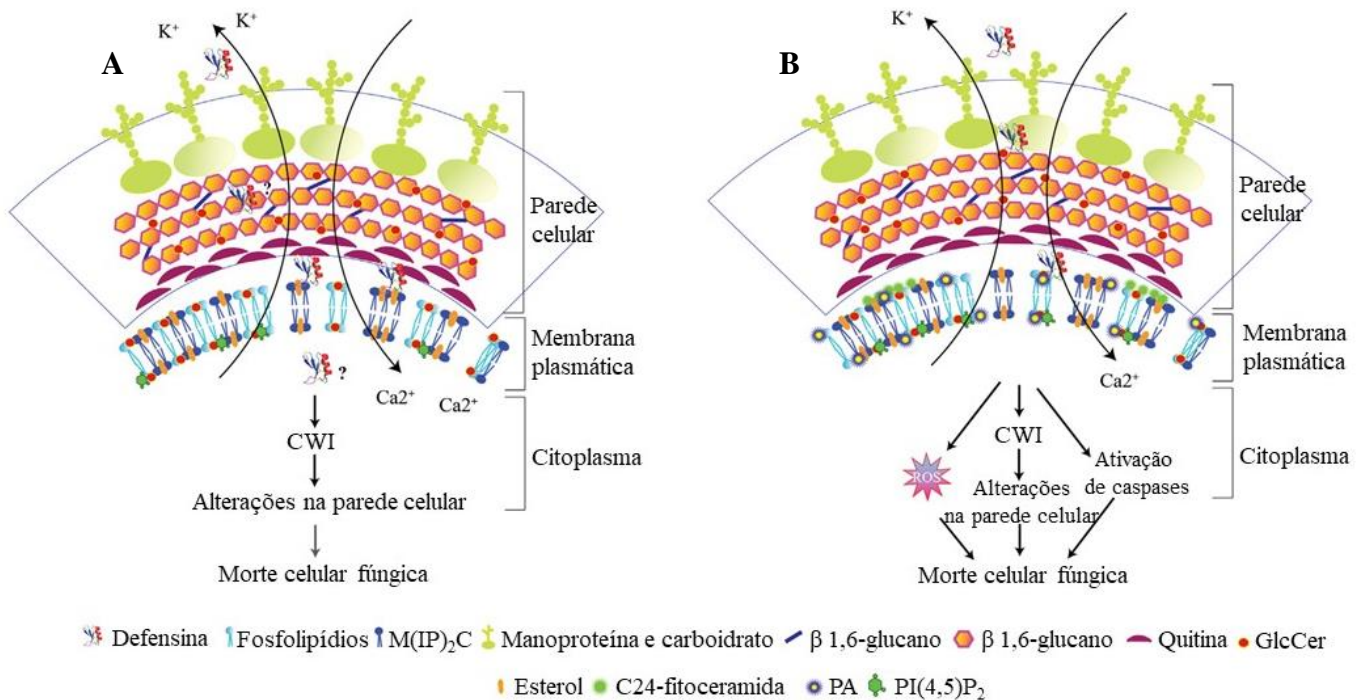


Figura 5. Mecanismos de ação da *DmAMP*₁ (A) e da *RsAFP*₂ (B) em células fúngicas (Adaptado de Parisi *et al.*, 2017). (A) *DmAMP*₁ interage com esfingolípido na parede celular e da camada externa da membrana plasmática. Essa interação resulta na permeabilização da membrana plasmática e no efluxo de potássio e influxo de cálcio. Em resposta a *DmAMP*₁ a via CWI é ativada no fungo. (B) *RsAFP*₂ interage com o esfingolípido GlcCer na parede celular e na membrana plasmática que leva ao efluxo do potássio e ao influxo de cálcio assim como a permeabilização da membrana. A interação entre *RsAFP*₂ e GlcCer também leva ao aumento da produção de ROS, ativação da CWI e da via de caspase que contribuem para a morte celular.

Assim como observado em *DmAMP*₁ e *RsAFP*₂ as defensinas de plantas *MsDef*₁ (*Medicago sativa defensin one*) e *PsD*₁ (*Pisum sativum defensin one*) também se ligam a esfingolípídeos da membrana de fungos (Ramamoorthy *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2012). *MsDef*₁, uma defensina de semente de alfafa, interage com o esfingolípido GlcCer e age no fungo interrompendo a sinalização e o gradiente de Ca²⁺ nas pontas das hifas levando a uma hiper-ramificação característica de defensinas morfogênicas (Spelbrink, 2004). Assim como descrito para *RsAFP*₂ acredita-se que a região que engloba α-hélice até folha β3 seja importante para a atividade antifúngica de *MsDef*₁

(Spelbrink, 2004; Sagaram *et al.*, 2011). Em resposta a presença da defensina o fungo *F. graminearum* ativa a via de MAPK (Figura 6B).

A defensina *PsD*₁ apesar de se ligar também ao esfingolípido GlcCer difere quanto a região de ligação com a membrana fúngica e de importância para atividade antifúngica, essa região corresponde a sequência de aminoácidos que engloba a folha β 1 e a α -hélice (de Medeiros *et al.*, 2010). Além disso foi visto que essa defensina tem ligações bem específicas sendo capaz de interagir com GlcCer e ergosterol produzida pelo *Fusarium solani*, mas não ao GlcCer produzida por plantas e animais (de Medeiros *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2012). Também já foi visto que essa defensina possui um alvo intracelular que foi identificado através de um sistema duplo híbrido para estudar interações proteína-proteína entre o peptídeo *PsD*₁ e as proteínas fúngicas. A proteína alvo foi analisada dentro de uma biblioteca de cDNA do fungo *Neurospora crassa* (Lobo *et al.*, 2007). Um clone apresentou sequência similar à ciclina F, que é uma proteína que está envolvida no ciclo celular. Análises por microscopia de fluorescência de *PsD*₁ conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, *fluorescein isothiocyanate*) e da coloração do fungo com 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, *4,6-diamidino-2-phenylindole*), mostraram a colocalização, *in vitro*, de *Psd1* no núcleo. Indicando, portanto, que o mecanismo de ação de defensina envolve alvos nucleares (Lobo *et al.*, 2007) (Figura 6A).

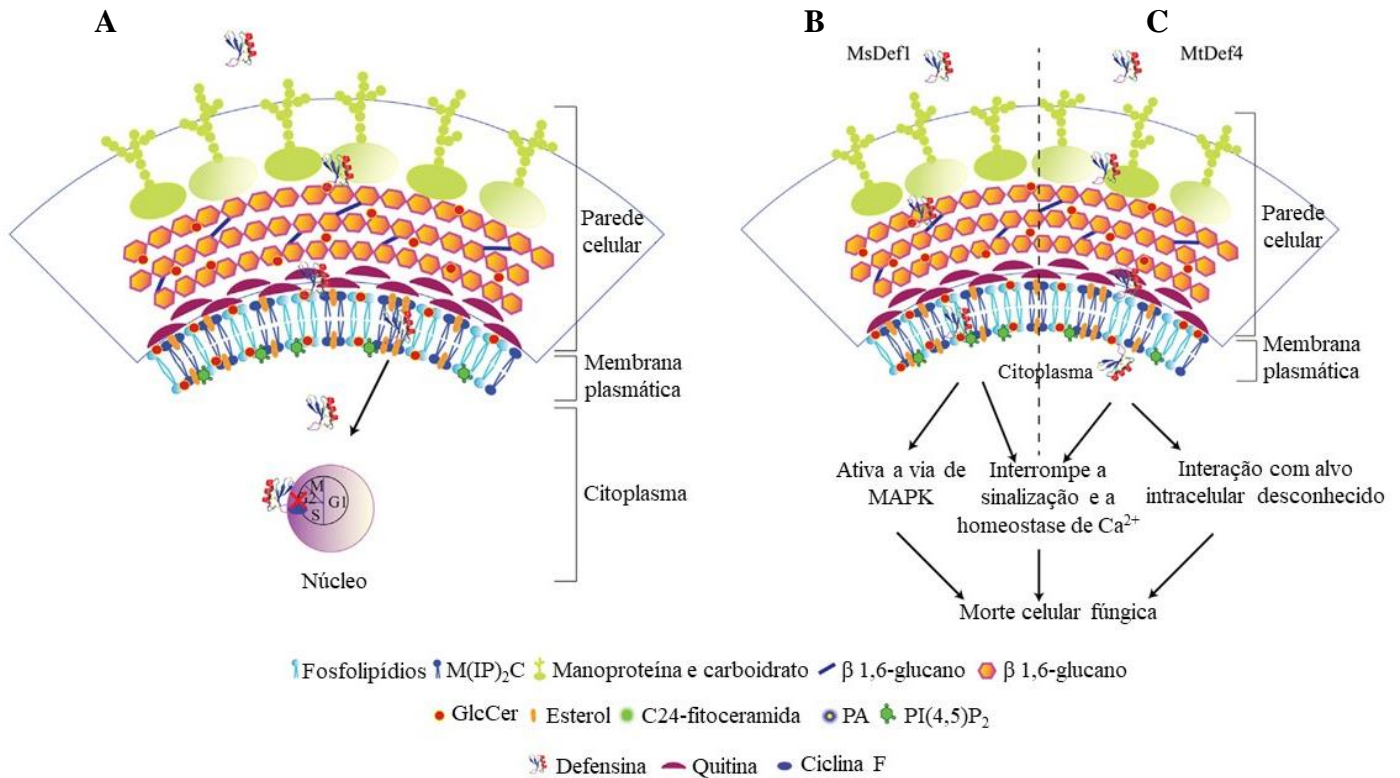


Figura 6. Mecanismos de ação de *PsD*₁ (A), *MsDef*₁ (B) e *MtDef*₄ (C) em células fúngicas (Adaptado de Parisi *et al.*, 2017). (A) *PsD*₁ interage com o esfingolipídeo GlcCer e com ergosterol, posteriormente se move para o citoplasma e interage com a ciclina F presente no núcleo levando o fungo a morte. (B) *MsDef*₁ interage com GlcCer e interrompe a sinalização e a homeostase de cálcio, e ativa a via de MAPK contribuindo para a morte do fungo. (C) *MtDef*₄ interage com PA e interrompe a sinalização e a homeostase de cálcio. Após a interação a *MtDef*₄ entra no fungo e acredita-se que interaja com um alvo intracelular.

As defensinas de planta *NaD*₁ (*Nicotiana alata defensin one*) e *MtDef*₄ (*Medicago trunculata defensin four*) também apresentam sítios de ligação descritos, no entanto elas diferem das outras defensinas citadas acima, pois *NaD*₁ e *MtDef*₄ tem a capacidade de interagir com fosfolipídios (Sagaram *et al.*, 2013; Poon *et al.*, 2014). A *NaD*₁, por exemplo, se liga preferencialmente ao PI(4,5)P₂ localizado na camada interna da membrana plasmática, mas também é capaz de se ligar ao fosfatidilinositol monofosfato e outros bifosfatos (Payne *et al.*, 2016). Enquanto a *MtDef*₄ se liga preferencialmente ao PA (Sagaram *et al.*, 2013). O mecanismo de ação da *NaD*₁ passa pela formação de oligômeros. Inicialmente a defensina *NaD*₁ forma dímeros que se ligam fortemente ao PI(4,5)P₂ que posteriormente se ligam a outros dímeros ligados ao

PI(4,5)P₂ e formam uma oligômero com 14 NaD₁. Essa oligomerização é importante para permeabilização da membrana e lise das células fúngicas e células tumorais (Poon *et al.*, 2014). Também já foi descrito que NaD₁ é capaz de entrar no citoplasma do fungo *Fusarium oxysporum* onde a interação com alvos intracelulares leva à produção de ROS e óxido nítrico (NO do inglês nitric oxide), permeabilização da membrana plasmática, granulação do citoplasma e morte celular (van der Weerden *et al.*, 2008, 2010) (Figura 7). Acredita-se que um dos possíveis alvos internos seja a mitocôndria, visto que em um trabalho de Hayes *et al.* (2013) eles inativaram a atividade respiratória mitocondrial em leveduras *S. cerevisiae* e viram que essas leveduras eram mais resistentes à ação da NaD₁. Posteriormente, Bleackley *et al.* (2014) realizaram um ensaio com leveduras *S. cerevisiae* com deleção de genes mitocondriais não essenciais e viram novamente que as leveduras mutantes possuíam resistência a NaD₁. No entanto, ainda não está bem definido como a NaD₁ se move através da parede celular e entra na célula. Um trabalho recente mostra que a NaD₁ chega ao citoplasma do fungo através de endocitose. Através de microscópio confocal e de inibidores Hayes *et al.* (2018) viram que o processo de entrada da defensina no citoplasma era dependente de energia e para confirmar se a entrada era via endocitose eles trataram a levedura com latrunculina A, um bloqueador de polimerização de actina em filamentos o qual é um passo essencial para a endocitose em levedura. Após este tratamento estes autores mostraram que a defensina continuava se aglomerando na superfície das células, mas a sua entrada era comprometida (Hayes *et al.*, 2018). Portanto, Hayes *et al.* (2018) propõem que após NaD₁ atravessar a parede celular, a mesma se acumula na superfície celular e em seguida é endocitada para o citoplasma através da membrana plasmática. Em resposta à ação da defensina NaD₁ um mecanismo utilizado para a proteção da *C. albicans* é a ativação da via HOG, diferente do que é observado em RsAFP₂ e DmAMP₁, a NaD₁ não ativa a via CWI (Hayes *et al.*, 2013).

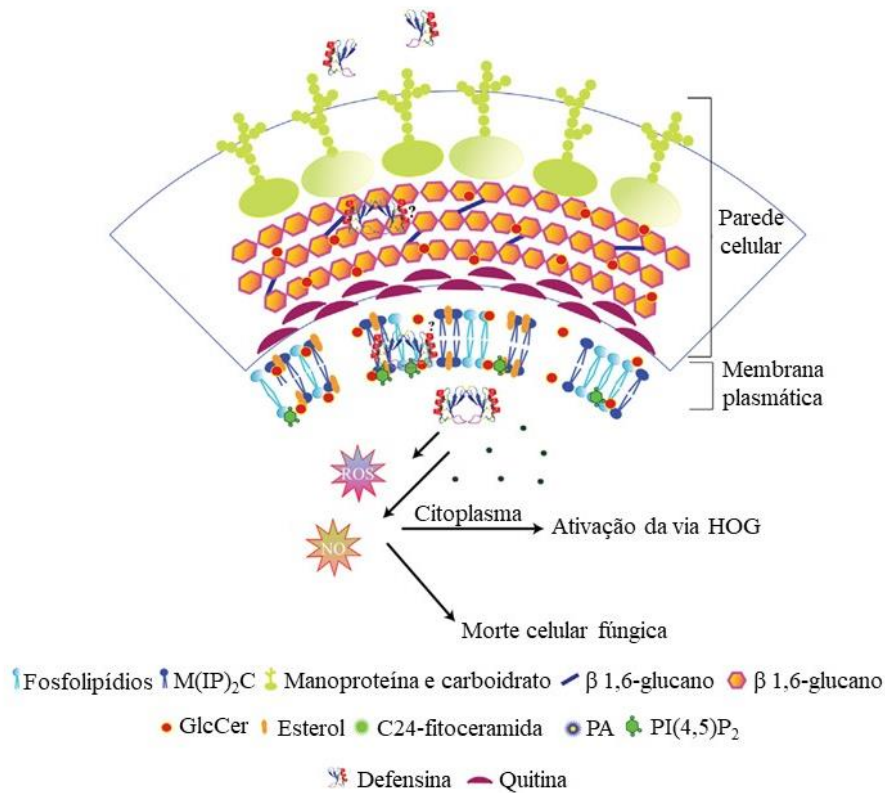


Figura 7. Mecanismo de ação da defensina *NaD*₁ (Adaptado de Parisi *et al.*, 2017). *NaD*₁ interage com a parede celular onde pode formar dímeros que após a entrada no citoplasma se ligaram ao PI(4,5)P₂ formando oligômeros na camada interna da membrana plasmática. A presença da *NaD*₁ no citoplasma leva à produção de ROS, NO, permeabilização da membrana plasmática, granulação do citoplasma e morte celular. Na presença da defensina a via HOG também é ativada.

A defensina *MtDef*₄ assim com *MsDef*₁ também interrompe a sinalização e a homeostase de Ca²⁺ levando a inibição do crescimento e da fusão das hifas, mas não se sabe se o mecanismo utilizado pelas duas defensinas é o mesmo (Spelbrink, 2004; Muñoz *et al.*, 2014). Assim como *NaD*₁, a *MtDef*₄ também é capaz de permeabilizar a membrana plasmática e de chegar ao citoplasma (Sagaram *et al.*, 2011, 2013) (Figura 6C). No entanto, sugere-se que a *MtDef*₄ possua mecanismo diferentes entre os fungos. El-Mounadi *et al.* (2016) mostraram as diferenças no mecanismo de ação da *MtDef*₄ entre os fungos *Neurospora crassa* e *F. graminearum*. Em *N. crassa* a *MtDef*₄ em concentrações mínimas inibitórias (MIC, do inglês *minimal inhibitory concentration*)

não permeabiliza membrana plasmática do fungo. A defensina é internalizada pelo fungo através de corpos vesiculares e sua internalização é dependente de energia. Já em *F. graminearum*, a MIC da *MtDef₄* permeabiliza a membrana plasmática, a sua internalização não é realizada por corpos vesiculares e a sua internalização é parcialmente dependente de energia (Sagaram *et al.*, 2013; El-Mounadi *et al.*, 2016). Assim como *R_sAFP₂* e *M_sDef₁*, *MtDef₄* também possui a região γ -core como a responsável pela atividade antifúngica e também é responsável pela interação da *MtDef₄* com PA e pela entrada da defensina no fungo (Sagaram *et al.*, 2011, 2013).

Como descrito acima, já se conhece parte do mecanismo de ação de algumas defensinas de plantas sobre fungos. Mas pouco se sabe sobre esse mecanismo em outros micro-organismos como protozoários. Até o presente estudo o que se conhece é que a defensina de semente de feijão-comum *PvD1* (*Phaseolus vulgaris defensin one*) é capaz de entrar no protozoário *Leishmania amazonensis* e de causar a fragmentação do citoplasma, perda do material citoplasmático e permeabilização da membrana plasmática (do Nascimento *et al.*, 2015). Além disso também já foi visto que a defensina recombinante de semente de feijão-de-corda *Vu-Defr* (*Vigna unguiculata defensin recombinant*) causa permeabilização da membrana, perda do potencial de membrana mitocondrial e estimula a produção de ROS em *L. amazonensis* (Souza *et al.*, 2018). Dessa forma há necessidade de se desenvolver mais estudos nessa área.

1.3. Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença causada quando um mamífero é infectado pelos protozoários *Leishmania spp.*, espécies pertencentes à ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae (Rodrigues *et al.*, 2014). Essa família possui algumas características como a presença de um único flagelo, a existência de uma estrutura denominada cinetoplasto, contido em uma mitocôndria única que se estende ao longo da célula, presença de um citoesqueleto e a alternância de diferentes estágios evolutivos durante o seu ciclo de vida (Barros, 2013; Rodrigues *et al.*, 2014).

O ciclo de vida das *Leishmania spp.* contém duas formas distintas, a promastigota e a amastigota. Promastigota é a forma flagelada do protozoário, que reside extracelularmente no vetor do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* que é passado para o macrófago de mamíferos após a picada do inseto. A forma amastigota é uma fase intracelular, aflagelada que ocorre dentro do hospedeiro vertebrado (Lynn *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012). A diferenciação entre essas duas formas inclui mudanças nas

moléculas de superfícies tais como na lipofosfoglicana (LPG) e na metaloprotease glicoproteína 63 (GP63) refletindo em diferentes suscetibilidades à drogas dependendo do estágio de vida do protozoário. A doença leishmaniose ocorre quando acontece a replicação e a disseminação incontrolada do parasita dentro de macrófagos cutâneos e viscerais, gerando a leishmaniose cutânea, visceral e mucocutânea (Marr *et al.*, 2012).

A leishmaniose cutânea, que é a forma mais comum, resulta da infecção de macrófagos dérmicos causando ulcerações únicas ou múltiplas de desenvolvimento lento, que podem ser difundidas de forma metastática em alguns casos. E os agentes causadores são: as *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (L.) major* e *Leishmania (L.) tropica* (Scorza *et al.*, 2017).

Algumas espécies de *Leishmania* causam a doença visceral sistêmica, por meio da infecção de macrófagos reticuloendoteliais e da medula óssea, sendo a mais prevalente e grave entre indivíduos e crianças imunocomprometidos, e é fatal se não for tratada. A leishmaniose mucocutânea é resultado da infecção de macrófagos na mucosa nasal e oral levando a lesões agressivas e desfigurativas (Marr *et al.*, 2012; Scorza *et al.*, 2017).

Por décadas, antimoniais pentavalente, como Pentostan (estibogluconato de sódio) e Glucantime (antimoniato de N-metil glucamina) tem feito parte da primeira linha de drogas para o tratamento de leishmaniose cutânea e visceral. Quando não ocorre uma resposta satisfatória com o tratamento com os antimoniais, são utilizados antibióticos como a anfotericina B e suas formulações lipossomais (anfotericina-B-lipossomal e anfotericina-B-dispersão coloidal), e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina) (Pérez-Cordero *et al.*, 2011; Sardar *et al.*, 2015; Ponte-Sucre *et al.*, 2017).

Apesar da existência de tratamentos contra leishmaniose, as drogas utilizadas são tóxicas, requerem cuidados com o monitoramento de pacientes por causarem efeitos adversos, e sua ineficácia está aumentando devido à resistência dos parasitas (Marr *et al.*, 2012; Sardar *et al.*, 2015; Ponte-Sucre *et al.*, 2017). Além disso, a existência de parasitas resistentes tem feito com que se utilizem drogas mais tóxicas (Cobb e Denny, 2010). Com esse cenário há uma necessidade do desenvolvimento de novas drogas com menos efeitos colaterais e de baixo custo.

Os AMPs possuem atividade inibitória sobre vírus envelopados, fungos, bactérias Gram negativas e positivas (Guaní-Guerra *et al.*, 2010). Também já foi visto que AMPs de anfíbios, mamíferos, crustáceos, insetos e plantas possuem ação inibitória sobre protozoários (McGwire e Kulkarni, 2010; Marr *et al.*, 2012; Sardar *et al.*, 2015). Já foi

relatado que para alguns AMPs o mecanismo de ação utilizado para levar a morte de protozoários, como *Leishmania*, através da ruptura da membrana plasmática, interação com alvos intracelulares depois da interação com o parasita, indução de apoptose e/ou através da imunomodulação do hospedeiro infectado (Marr *et al.*, 2012).

Apesar de se conhecer que alguns peptídeos possuem atividade inibitória sobre protozoários, poucos estudos foram feitos nessa área. Dentre as famílias de AMPs já descrita em plantas, por exemplo, apenas seis AMPs foram testados e quatro deles apresentaram atividade sendo eles a tionina de trigo, a defensina de batata (PTH-1) (Berrocal-Lobo *et al.*, 2009; McGwire e Kulkarni, 2010), defensina PvD₁ (do Nascimento *et al.*, 2015) e Vu-Defr (Souza *et al.*, 2013, 2018). Portanto, há uma necessidade de mais estudos nessa área para que seja possível um melhor entendimento do mecanismo de ação desses peptídeos, pois não se sabe quais são os seus alvos celulares e nem todos os efeitos que o peptídeo pode causar na célula do protozoário.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Objetivo geral deste trabalho foi desenhar um peptídeo baseado na defensina de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp.), avaliar sua atividade antimicrobiana e analisar seu mecanismo de ação sobre o protozoário *Leishmania amazonensis* na forma promastigota.

2.2. Objetivos Específicos

- Desenhar e fazer a síntese química de um peptídeo baseado no γ -core da Vu-Def;
- Analisar se o peptídeo sintetizado é biologicamente ativo como a defensina Vu-Def;
- Determinar a concentração tóxica do peptídeo sintético sobre promastigotas de *L. amazonensis*;
- Determinar o tempo em que o peptídeo sintético causa a morte de promastigotas de *L. amazonensis*;
- Determinar parte do mecanismo de toxicidade do peptídeo sintético sobre promastigotas de *L. amazonensis* através de análises da ultraestrutura celular, integridade nuclear, potencial da membrana mitocondrial e acidificação vacuolar;
- Determinar os efeitos da temperatura na ação do peptídeo sintético sobre promastigotas de *L. amazonensis*.

3. Material e Métodos

3.1. Cultura de células

Células da cepa LV 79 de *Leishmania amazonensis*, na forma promastigota, foram mantidas em 5 mL de meio Warren's (90% de caldo infusão cérebro coração, Fluka, enriquecido com 10% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *foetal bovine serum*, Gibco), 0,4% de hemina (Sigma-Aldrich) e 0,001% de ácido fólico (Sigma-Aldrich) à 28 °C por três dias. A cada três dias uma nova cultura foi estabelecida. As células da cepa LV 79 de *L. amazonensis* foram fornecidas pelo Laboratório de Biologia Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

3.2. Obtenção da *Vu-Defr*

A defensina recombinante de *Vigna unguiculata* (*Vu-Defr*) foi obtida como previamente descrito por Souza *et al.*, (2013).

3.3. Modelagem da *Vu-Defr*

Para a modelagem da estrutura tridimensional da *Vu-Defr* foi utilizado o programa Modeller. Para o uso desse programa é necessário ter uma proteína molde (uma proteína com estrutura conhecida) para prever a estrutura terciária da proteína desejada. Para obter a proteína molde a sequência de aminoácidos da *Vu-Defr* foi utilizada para realizar uma pesquisa no banco de dados de sequência de proteínas (Blastp) (Altschul *et al.*, 1990). E a sequência com a maior similaridade com a *Vu-Defr* e com estrutura tridimensional descrita foi utilizada como molde. Após a obtenção da estrutura terciária da *Vu-Defr*, sua qualidade estereoquímica foi checada através do programa Procheck e Profile 3D disponível na PARMODEL web server (Laskowski *et al.*, 1993; Uchôa *et al.*, 2004).

3.4. Peptídeo Sintético

As defensinas de planta possuem uma região que tem sido associada com sua atividade biológica denominada de γ -core (Schaaper *et al.*, 2001; Yount e Yeaman, 2004; Sagaram *et al.*, 2011). Baseado nesses conhecimentos e na estrutura terciária da *Vu-Defr*, como determinado no item **3.3. Modelagem da *Vu-Defr***, uma sequência de aminoácidos que abrange o γ -core e parte das folhas β_2 e β_3 foi selecionado para ser

sintetizado. O peptídeo sintetizado compreende uma sequência de 15 aminoácidos contendo três resíduos de cisteína os quais foram substituídos por resíduos de alanina. O peptídeo sintético foi diluído em água ultrapura na concentração de 1,1 M. A massa molecular e ponto isoelétrico do peptídeo sintético foi determinado pelo ExPASy Compute pI/Mw tool (Bjellqvist *et al.*, 1993, 1994; Gasteiger *et al.*, 2005). A síntese foi realizada pela empresa *GenOne Biotechnologies*.

3.5. Determinação da atividade biológica do peptídeo sintético através do ensaio de inibição do crescimento da cultura de promastigota de *L. amazonensis*

Para o ensaio de inibição do crescimento, uma alíquota da cultura de *L. amazonensis* foi contada em uma câmara de Neubauer e o número de células do protozoário foi ajustado para $1,5 \times 10^6$ /mL. Inicialmente, a cultura de células foi incubada com o peptídeo sintético na concentração de 18,5 μ M e com a mesma concentração de *Vu-Defr* por 24 h. Os peptídeos foram diluídos em água ultrapura e esterilizados por filtração (Millex-GV 0,22 μ m, Millipore), depois foram diluídos em meio RPMI 1640 (enriquecido com 10% FBS) com 1,5% de dimetil sulfoxido (DMSO, do inglês *dimethyl sulfoxide*). No ensaio, o controle consiste de 4,5 μ L de DMSO (1,5% do volume final do ensaio) com 145,5 μ L de meio e 150 μ L de meio com parasitas. As amostras tratadas consistem de 4,5 μ L de DMSO, peptídeos na concentração de 18,5 μ M com meio em um volume máximo de 150 μ L e 150 μ L de meio com parasitas. O volume final do ensaio foi de 300 μ L e foi incubado a 28 °C. O número de parasitas foi contado em câmara de Neubauer após 24 h de incubação.

3.6. Ensaio de inibição do crescimento da cultura de *L. amazonensis* em diferentes concentrações do peptídeo sintético

O ensaio foi realizado como descrito no item 3.5. com as seguintes diferenças: a concentração do peptídeo sintético utilizada foi de 18,5 e 74 μ M, o meio foi Warren's e o número de parasitas foi contado em 24 e 48 h.

3.7. Ensaio de reversibilidade

Após o tempo de 48 h do ensaio de inibição do crescimento da cultura como descrito no item 3.6. as células de *L. amazonensis* do controle e tratado foram coletadas por centrifugação (10 min, 1.700 rpm, 21 °C). Em seguida, essas células foram lavadas em meio Warren e incubadas com um novo meio Warren a 28 °C por 24 h, sem a

presença do peptídeo. O número de parasitas foi determinado como descrito no item 3.5.

3.8. Ensaio de inibição do crescimento da cultura de promastigota de *L. amazonensis* com o peptídeo sintético em diferentes tempos

O ensaio foi realizado como descrito no item 3.6. com as seguintes diferenças: a concentração utilizada foi 74 μM e os tempos de contagem foram 0, 4, 8, 16, 24, 32 e 48 h.

3.9. Sincronização de células de *L. amazonensis* através de 1 mM de hidroxiureia

Para esse ensaio, inicialmente foi determinada a concentração de hidroxiureia (HU) necessária para a sincronização celular. A HU bloqueia a síntese de desoxinucleotídeos, que inibe a síntese de DNA e induz a sincronização ou a morte celular na fase S. Para determinar a concentração de HU, uma alíquota da cultura celular de *L. amazonensis* foi contada em câmara de Neubauer e o número de células do protozoário foi ajustada para $1,5 \times 10^6/\text{mL}$. Posteriormente, a cultura celular foi incubada com HU nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM por 12 h. A HU foi diluída em meio Warren e esterilizada por filtração (Millex-GV 0,22 μm , Millipore). Em seguida, as células tratadas com HU foram lavadas e incubadas com meio Warren novo por 48 h a 28 °C. O controle consiste de meio Warren com parasita. O volume final do ensaio foi de 300 μL .

Após a determinação da concentração de HU, o ensaio foi repetido com a concentração de HU escolhida com as seguintes modificações: as células tratadas com HU após lavadas foram incubadas com 74 μM do peptídeo sintético por 48 h. O número de parasitas foi contado através da câmara de Neubauer nos tempos de 0, 8, 24 e 48 h.

3.10. Análise ultraestrutural de promastigota de *L. amazonensis* na presença do peptídeo sintético

A cultura celular de promastigota de *L. amazonensis* foi tratada como descrita no item 3.6. com as seguintes diferenças: as células foram incubadas por 8 h a 28 °C na ausência (controle) e presença (tratado) de 74 μM do peptídeo sintético. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e fixadas com solução contendo 1% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 5 mM de cloreto de cálcio (CaCl_2) e 5% de sacarose em 0,1 M de tampão cacodilato pH 7. Posteriormente as amostras foram pós-

fixadas por 1h em 2% de solução de tetróxido de ósmio (OsO_4), 0,8% de ferrocianeto de potássio e 5 mM de CaCl_2 em 0,1 M de tampão cacodilato pH 7. Em seguida as amostras foram lavadas em 0,1 M de tampão cacodilato pH 7,2, desidratadas em acetona e infiltradas em resina (PolyBed). Após o corte das amostras, estas foram contrastadas com acetato de uracila e citrato de chumbo e observadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEOL 1400) com aceleração de 60 kV (Carvalho *et al.*, 2010).

3.11. Determinação da fragmentação nuclear de células de *L. amazonensis* tratado com peptídeo sintético através do corante brometo de etídio

A cultura celular de promastigota de *L. amazonensis* foi tratada como descrito no item 3.6. com as seguintes diferenças: as células foram incubadas por 8 h a 28 °C na ausência (controle) e presença (tratado) de 74 μM do peptídeo sintético. Após a incubação as células foram tratadas com 100 μM do corante brometo de etídio por 20 min. Esse corante intercala fitas duplas de DNA e RNA se tornando fluorescente. As células foram observadas no microscópio óptico Axioplan (Zeiss) acoplado com uma câmera digital DP72 (Olympus) usando o filtro de detecção de 546 nm (Baskić *et al.*, 2006).

3.12. Determinação do potencial de membrana da mitocôndria em células de *L. amazonensis* tratado com peptídeo sintético através do marcador rodamina 123

A cultura celular de promastigota de *L. amazonensis* foi tratado como descrito no item 3.6. com as seguintes diferenças: *L. amazonensis* foram incubadas por 4 h a 28 °C na ausência (controle) e presença (tratado) de 74 μM do peptídeo sintético. Com o intuito de observar se o peptídeo sintético causa algum efeito no potencial de membrana mitocondrial, após o tempo de incubação foi adicionado 20 μM de rodamina 123 às células como descrito por Souza *et al.* (2018). Para esse ensaio, as células foram observadas no microscópio óptico Axioplan (Zeiss) acoplada a uma câmera digital DP72 (Olympus) usando filtros de detecção (excitação: 503 nm; emissão: 527 nm).

3.13. Determinação de acidificação vesicular de células de *L. amazonensis* tratada com peptídeo sintético através do corante laranja de acridina

A cultura celular de promastigota de *L. amazonensis* foi tratado como descrito no item 3.6. com as seguintes diferenças: *L. amazonensis* foram incubadas por 4 h a 28 °C na ausência (controle) e presença (tratado) de 74 μM do peptídeo sintético. Após o

tratamento as células foram incubadas com a solução de laranja de acridina a 5 µg/mL (Sigma-Aldrich) por 20 min na ausência da luz. Laranja de acridina é um corante permeável que emite fluorescência verde quando se liga a DNA (excitação: 502 nm; emissão: 525 nm). Esse corante também entra em compartimentos ácidos tais como lisossomos, onde se torna protonado e sequestrado, e em condições como pH baixo, o corante laranja de acridina emite fluorescência laranja (emissão: 590 nm) quando excitado com luz azul (475 nm) (manual químico da Caynam). Para esse ensaio, as células foram observadas no microscópio óptico Axioplan (Zeiss) acoplada a uma câmera digital DP72 (Olympus) usando filtros de detecção (excitação: 450-490 nm; emissão: 500 nm) (Carvalho *et al.*, 2010).

3.14. Estudo da temperatura sobre a ação biológica do peptídeo sintético em promastigotas de *L. amazonensis*

3.14.1. Ensaio de inibição do crescimento da cultura de *L. amazonensis* com o peptídeo sintético aquecido a 100 °C

O ensaio foi realizado como descrito no item 3.6. com as seguintes diferenças: antes das células serem incubadas com o peptídeo sintético, o peptídeo foi aquecido a 100 °C por 1 h. A cultura celular foi incubada com peptídeo sintético na concentração de 74 µM por 4 h.

3.14.2. Ensaio de inibição do crescimento da cultura de *L. amazonensis* a 4 °C

O ensaio foi realizado como descrito no item 3.6. com as seguintes diferenças: a cultura celular foi incubada por 4 h a 4 °C e posteriormente essa mesma cultura foi incubado por mais 4 h a 28 °C. O número de parasitas foi contado através da câmara de Neubauer nos tempos de 4 e 8 h.

4. Resultados

4.1. Desenho do peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu$ -Def

Para a síntese do peptídeo, inicialmente foi necessário obter a estrutura terciária da *Vu*-Defr e, para isso, a defensina de *Vigna radiata* 2 (*VrD*₂, PDB: 2GL1) foi selecionada pelo Blast como a defensina de maior similaridade com *Vu*-Defr e com estrutura conhecida para ser utilizada como molde. As duas defensinas possuem 92% de similaridade entre os seus 47 resíduos de aminoácidos, sendo diferente em apenas quatro posições, sendo estas diferenças na posição 8 (Ala_{*Vu*-Defr} para Asn_{*VrD*₂}), 9 (Asp_{*Vu*-Defr} para Ala_{*VrD*₂}), 32 (Leu_{*Vu*-Defr} para Arg_{*VrD*₂}) e 40 (Val_{*Vu*-Defr} para Phe_{*VrD*₂}), sendo a contagem feita a partir da *Vu*-Defr. Nós usamos a sequência da *Vu*-Def recombinante e por este motivo a sequência apresenta 48 resíduos de aminoácidos, e este resíduo adicional é uma metionina acrescentada no início da sequência da *Vu*-Defr como um requerimento para a clonagem no vetor de expressão pET-32 EK/LIC (Figura 8A). Na Figura 8A podemos visualizar a sequência de aminoácidos completa de *Vu*-Defr, sendo destacado em negrito os resíduos de cisteína e as linhas abaixo destas indicam os arranjos das pontes dissulfeto. Também na sequência da *Vu*-Defr destacado em azul se encontra os resíduos de aminoácidos da região do γ -core e destacados em uma caixa os resíduos da região de volta que conecta a folha β_2 com a folha β_3 . A partir da seleção de *VrD*₂ como molde, foi feita a determinação da estrutura tridimensional da *Vu*-Defr. Na Figura 8B se encontra a representação esquemática da estrutura terciária de *Vu*-Defr com uma α -hélice e três folhas β antiparalelas. E destacado em azul escuro a região do γ -core. Essa região, junto aos resíduos de Leu₃₂ e Ser₃₃ da região N-terminal e com os resíduos Trp₄₃, Cys₄₄, Thr₄₅ e Arg₄₆ da região C-terminal, foi selecionada para a síntese química dando origem ao peptídeo sintético (Figura 8C). Portanto, a região selecionada para síntese compreende a Leu₃₂ a Arg₄₆ englobando a região do γ -core, parte da folha β_2 e parte da folha β_3 . Na sequência selecionada, as três cisteínas foram substituídos por alaninas, dando origem ao peptídeo LSGRARDDVRAWATR (Figura 8C) que foi sintetizado. Na figura 8D é possível observar, destacado em roxo, a região selecionada para síntese dentro da estrutura da *Vu*-Defr, no entanto, em solução essa conformação não se mantém. Este peptídeo sintético foi chamado $\gamma_{32-46}Vu$ -Def e suas características bioquímicas são mostradas na Figura 8E.

As análises dos valores do Ramachandran validam a estrutura da *Vu*-Defr. O modelo apresentava 85,7% de aminoácidos em regiões favoráveis, 11,9% de

aminoácidos em regiões permitidas, 2,4% aminoácidos em regiões menos favoráveis e nenhum aminoácido na região não permitida (Figura 9).

Após a síntese ensaios biológicos foram realizados para confirmar a atividade de $\gamma^{32-46}Vu-Def$ sobre *Leishmania amazonensis*.

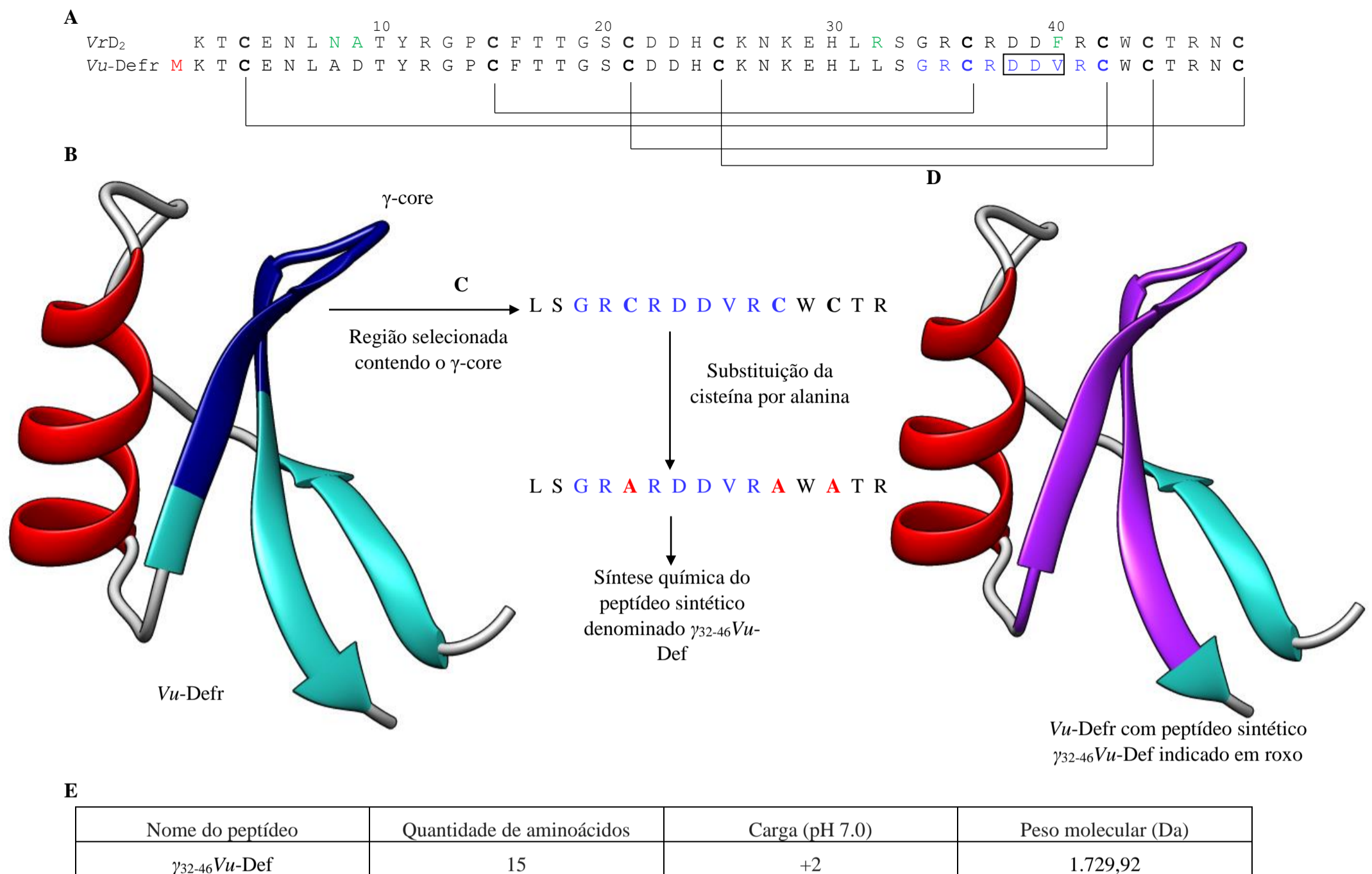
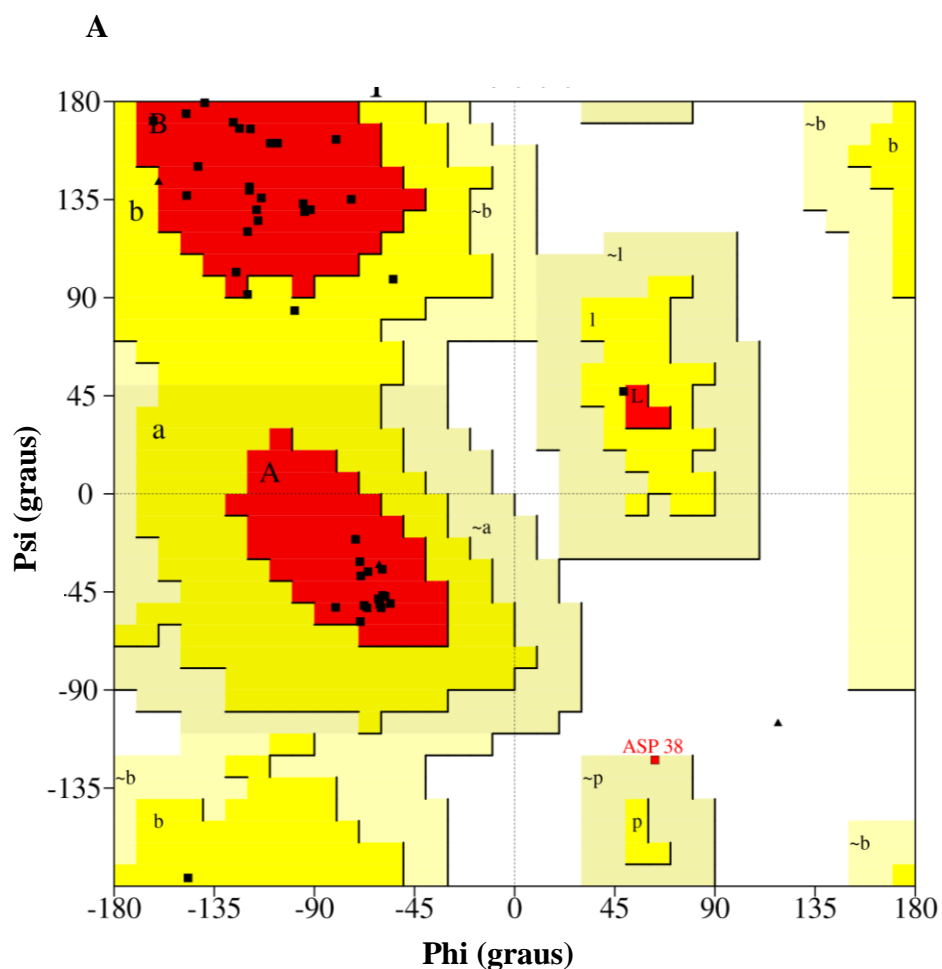


Figura 8. A. Alinhamento da estrutura primária da *Vu-Defr* e da defensina *Vigna radiata* 2 (PDB ID: 2GL1). As linhas abaixo dos resíduos de Cys (destacado em negrito) em *Vu-Defr* indica as pontes dissulfeto entre os resíduos. Os quatro resíduos de aminoácidos que diferem entre as duas estruturas primárias estão marcados em verde na sequência da VrD2 e também um resíduo de metionina adicional incluído na estrutura primária de *Vu-Defr* como requisito da clonagem é marcada em vermelho. Os resíduos de aminoácidos marcados em azul correspondem a região do γ -core como determinado por Yount and Yeaman (2004). Os resíduos de aminoácidos indicados na caixa correspondem a região de loop. Os números acima da sequência indicam o tamanho do peptídeo em aminoácidos. **B.** Estrutura tridimensional da *Vu-Defr* modelada com Modeller com base na estrutura de VrD2. Em cinza estão representados os elementos não estruturais, em vermelho representada α -hélice, azul claro representam folhas β , e em azul escuro representa a região do γ -core. **C.** Passos do design do peptídeo sintético. **D.** O mesmo que descrito em B) com o peptídeo sintético γ_{32-46} Vu-Def indicado em roxo. **E.** Características bioquímicas do peptídeo sintético γ_{32-46} Vu-Def.



Parcela estatística do Ramachandran		
Resíduos na região mais favorável (A,B,L)	36	87,7%
Resíduos na região permitida (a, b, l, p)	5	11,9%
Resíduos na região menos favorável (~a,~b,~l,~p)	1	2,4%
Resíduos na região não permitida	0	0%
Número de resíduos que não são prolina e nem glicina	42	100%
Número de resíduos finais (excl.. glicina e prolina)	2	
Número de resíduos de glicina (triângulo)	3	
Número de resíduos de prolina	1	
Número total de resíduos	48	

Figura 9. A. Visualização gráfica do *plot* de Ramachandran mostrando a posição dos aminoácidos do modelo da *Vu-Defr* em regiões favoráveis, permitidas e desfavoráveis. **B.** Tabela com a descrição estatística do Ramachandran.

4.2. Bioatividade do peptídeo $\gamma_{32-46}Vu$ -Def

Inicialmente, um ensaio de inibição do crescimento da cultura de *L. amazonensis* foi realizado comparando a atividade de 18,5 μ M de $\gamma_{32-46}Vu$ -Def e 18,5 μ M da defensina recombinante *Vu*-Defr em 24 h (Figura 10). A *Vu*-Defr foi utilizada como controle, resultados anteriores mostraram que 18,5 μ M deste peptídeo possui atividade biológica sobre *L. amazonensis* (Souza *et al.*, 2013). O peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu$ -Def foi capaz de inibir 41% da cultura de *L. amazonensis* em relação ao controle e *Vu*-Defr foi capaz de inibir 51%. A diferença observada entre a inibição do $\gamma_{32-46}Vu$ -Def e *Vu*-Defr não é estatisticamente significativa de acordo com o teste de Tukey. Portanto, $\gamma_{32-46}Vu$ -Def detém atividade biológica como a *Vu*-Defr. Depois de confirmar a atividade biológica, todos os outros experimentos foram realizados apenas com o peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu$ -Def.

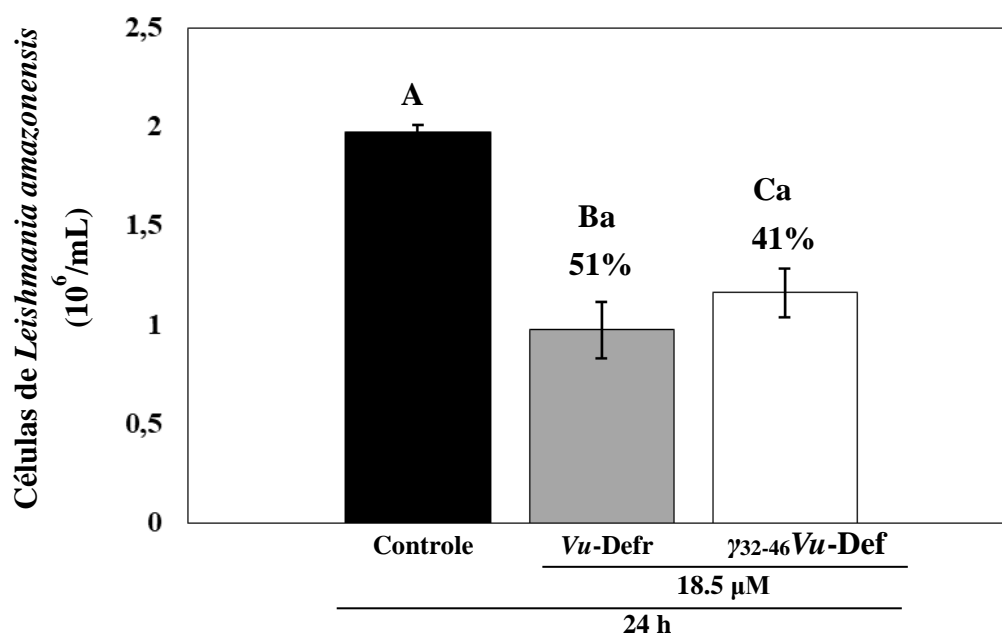


Figura 10. Inibição do crescimento da cultura de *Leishmania amazonensis* na ausência (controle) e presença de *Vu*-Defr e do peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu$ -Def. A porcentagem de eliminação do protozoário em relação ao controle é mostrado acima da barra. Letras maiúsculas diferentes indicam que as diferenças entre experimentos e controle são significativas através do teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras minúsculas iguais indicam que as diferenças entre *Vu*-Defr e $\gamma_{32-46}Vu$ -Def não são significativas através do teste de Tukey ($P < 0.05$). Esse resultado indica que $\gamma_{32-46}Vu$ -Def é biologicamente ativo.

Para descobrir a concentração tóxica de $\gamma_{32-46}Vu$ -Def para as células de *L. amazonensis*, foi realizado um novo ensaio de inibição com concentrações de 18,5 e 74

μM por 48 h (Figura 11). Após 24 h de incubação observou-se que as concentrações de 18,5 e 74 μM de $\gamma_{32-46}\text{Vu-Def}$ conseguiram inibir 40 e 80% da cultura de *L. amazonensis*, respectivamente, em relação ao controle. Além disso, após 48 h de incubação $\gamma_{32-46}\text{Vu-Def}$, nas mesmas concentrações, conseguiu inibir 65 e 93%, respectivamente.

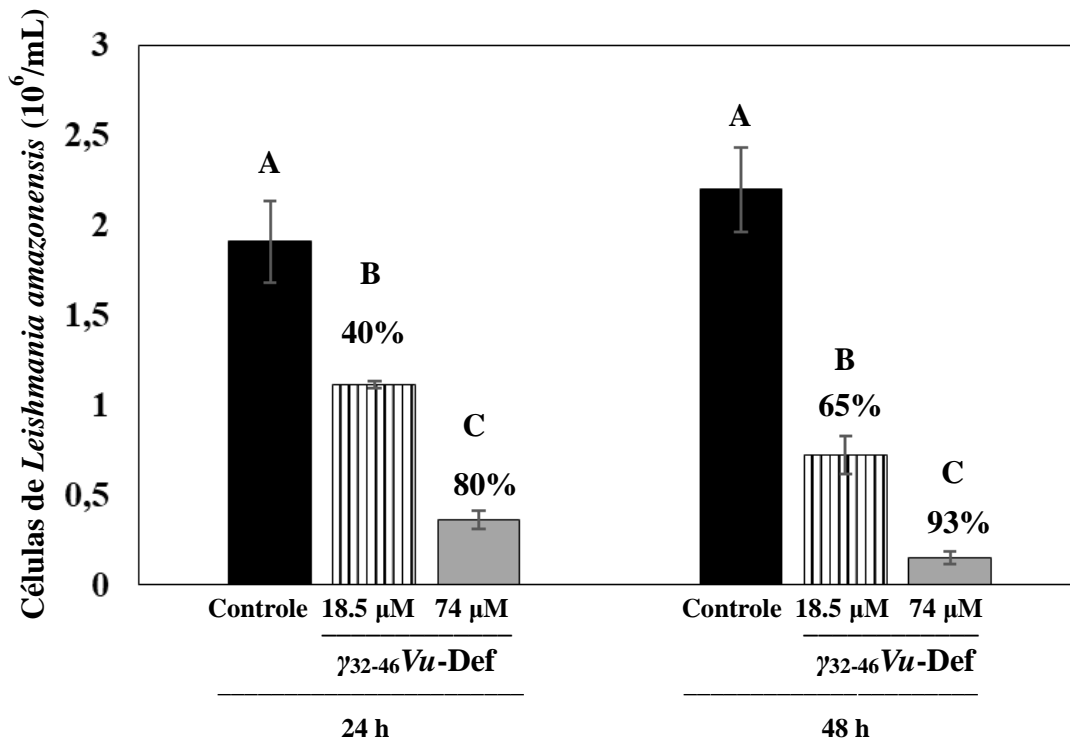


Figura 11. Inibição do crescimento da cultura de *Leishmania amazonensis* na ausência (controle) e presença do peptídeo sintético $\gamma_{32-46}\text{Vu-Def}$, após 24 e 48 h de incubação. A porcentagem de eliminação em relação aos seus respectivos controles são mostradas acima das barras. Letras maiúsculas diferentes indicam que as diferenças entre experimentos e seus respectivos controles são significativas de acordo com teste de Tukey ($P < 0.05$).

Após o ensaio de inibição do crescimento da cultura, um ensaio de reversibilidade do crescimento da cultura também foi realizado. Na Figura 12 é possível observar que as células restantes do tratamento com 18,5 μM do $\gamma_{32-46}\text{Vu-Def}$ conseguiram restabelecer o crescimento da cultura, saindo de uma inibição de 65% em 48 h (Figura 10) para 12% (crescimento de 87,5%) quando transferidas para um novo

meio sem $\gamma_{32-46}Vu$ -Def (Figura 12). As células restantes do tratamento com $74 \mu\text{M}$ do $\gamma_{32-46}Vu$ -Def, saindo de uma inibição de 93% em 48 h (Figura 11), não são capazes de retomar o crescimento da cultura quando transferidas para um novo meio sem o peptídeo (Figura 12). Portanto, nas condições testadas, $74 \mu\text{M}$ é uma concentração letal para o parasita e a inibição do crescimento da cultura é devido à eliminação da população de células do protozoário presente no ensaio. A partir desses resultados, os próximos experimentos foram realizados com a concentração mais tóxica para entender os mecanismos envolvidos na morte celular do parasita.

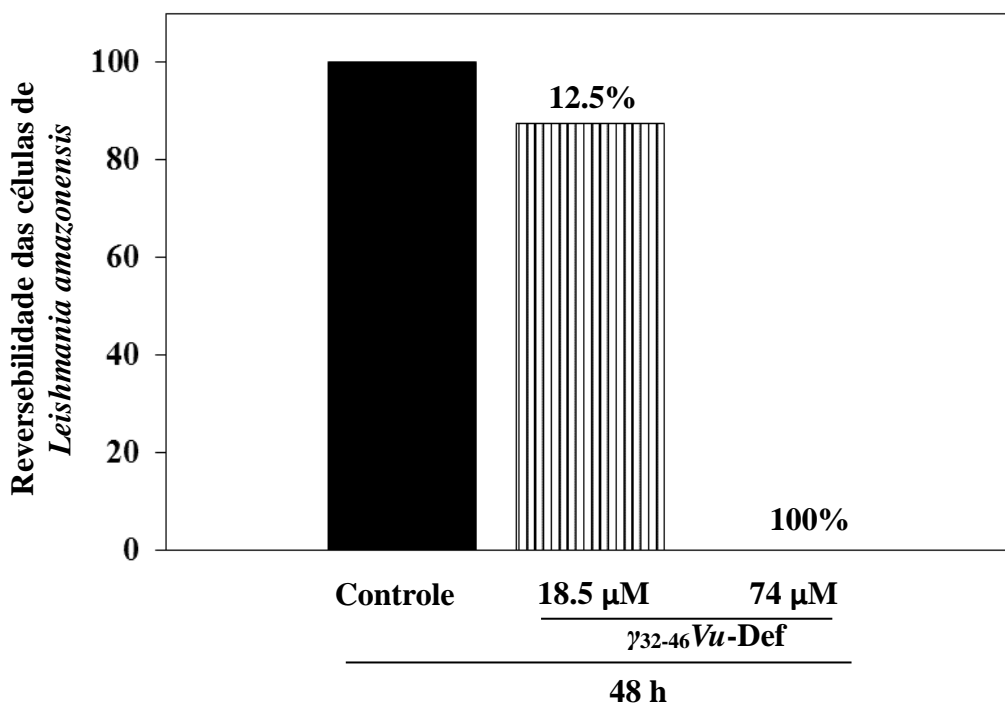


Figura 12. Reversibilidade da cultura de *Leishmania amazonensis* oriundas do ensaio de inibição depois de 48 h de incubação na presença do peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu$ -Def. A porcentagem de eliminação do protozoário em relação ao controle está demonstrado acima das barras.

Para entender melhor o processo de eliminação de *L. amazonensis* na presença de $74 \mu\text{M}$ de $\gamma_{32-46}Vu$ -Def foi realizado um ensaio em que o crescimento da cultura foi avaliado em diferentes tempos (Figura 13A). O ensaio mostrou que, no tempo zero, não houve eliminação dos protozoários, mas nos tempos de 4, 8, 16, 32 40 e 48 h do

tratamento com γ_{32-46} Vu-Def levaram a uma inibição da cultura de 30, 45, 70, 73, 79,7, 80 e 97%, respectivamente, quando comparados ao controle. Este ensaio mostra que a inibição da cultura é devido a uma eliminação dos protozoários, já que no tempo de 4 h em diante, é possível observar uma queda de 30% do número de protozoários na cultura. O mesmo é observado para os outros tempos. E este dado corrobora com o dado de perda total da viabilidade (Figura 12). Por estes motivos será feita referência ao efeito de γ_{32-46} Vu-Def como eliminação dos protozoários da cultura. Com este ensaio foi possível observar que a eliminação do parasita ocorre principalmente de forma gradual, ocorrendo no ponto de 8-16 h uma eliminação do número de parasitas 2,3 vezes maior, comparado a eliminação observada em 4 h. Nas nossas condições de ensaio, *L. amazonensis* leva aproximadamente 8 h para fazer a divisão celular. Estes dados nos indicam que a eliminação do parasita pode estar relacionada a algum alvo celular que é exposto apenas em uma determinada fase do ciclo celular.

Para verificar se o ciclo celular estava relacionado ou não à eliminação do protozoário foi realizado a sincronização da cultura de *L. amazonensis* com 1 mM de HU (Figura 13B). Foi possível observar que após 8 h de incubação, o peptídeo, comparado ao controle, conseguiu inibir 19% do crescimento da cultura. Em 24 e 48 h, o peptídeo eliminou 58 e 97%, respectivamente. Para a cultura não sincronizada estes dados foram: 8 h, 45.71%, para 24 h, 73% e para 48 h, 97%. Estes resultados sugerem que a ação do peptídeo nas primeiras 24 h é 2,3 vezes menos expressiva na cultura sincronizada, no entanto, no tempo de 48 h, as células protozoárias sincronizadas são eliminadas na mesma proporção das células da cultura não sincronizada. Esta diferença da taxa de inibição da cultura entre os protozoários sincronizados e não sincronizados indica que alguma etapa do processo de eliminação do protozoário pode estar relacionada com o ciclo celular, no entanto, outros ensaios precisam ser feitos para confirmar esta relação do ciclo celular com a morte do protozoário.

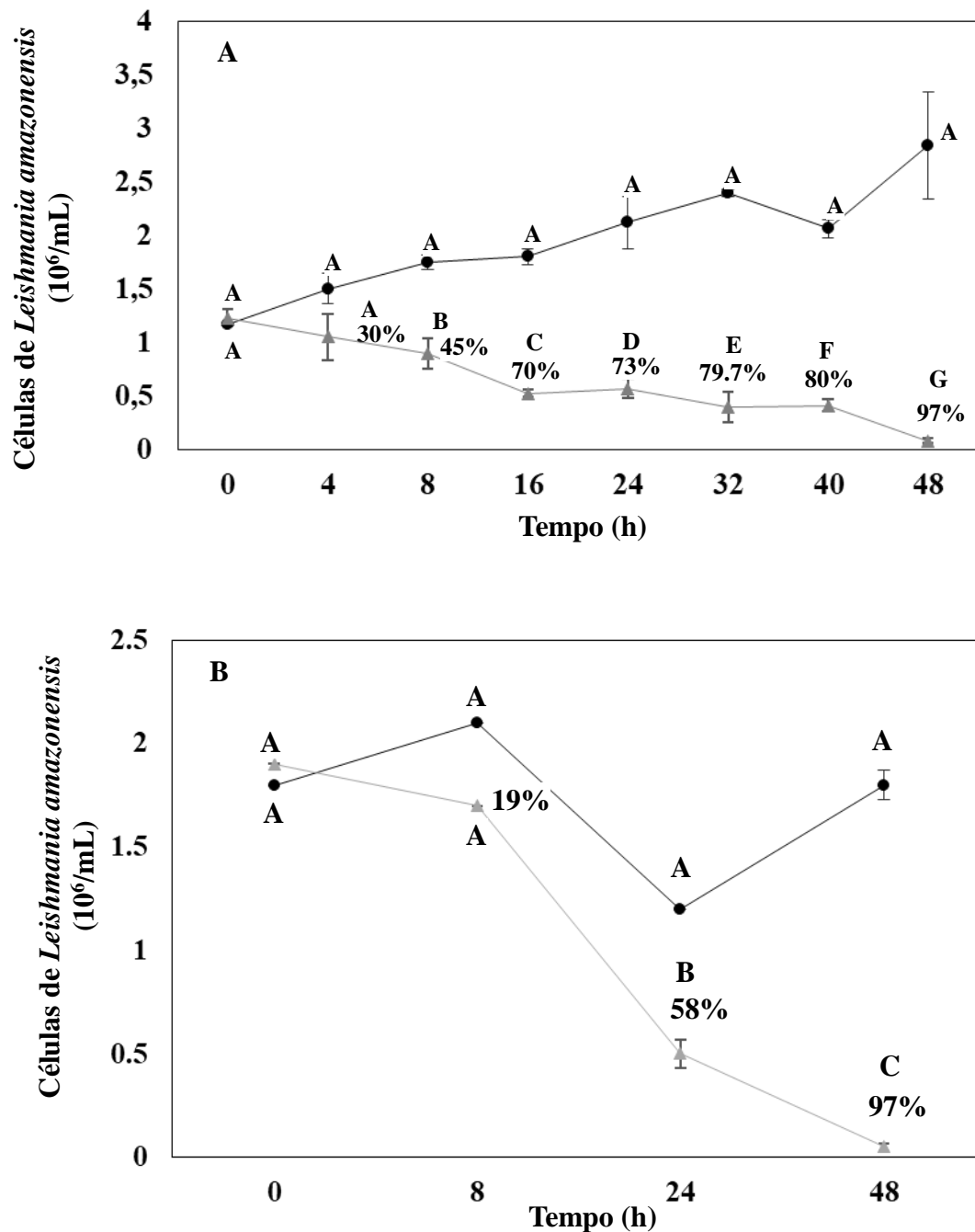


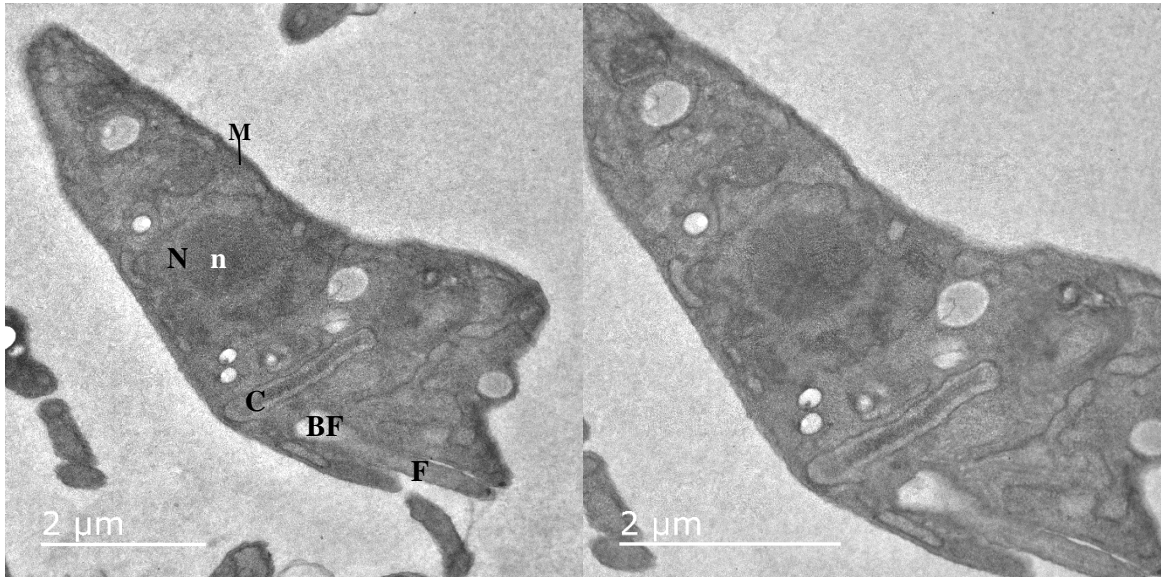
Figura 13. A. Inibição do crescimento da cultura de *Leishmania amazonensis* em diferentes tempos. **B.** Inibição do crescimento da cultura *Leishmania amazonensis* com células sincronizadas com 1 mM de hidroxiureia. O controle (ausência do $\gamma_{32-46}Vu-Def$) é indicado pelo marcador (-●-) e a presença de 74 μM do peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu-Def$ (-▲-). A porcentagem de eliminação em relação aos seus respectivos controles é demonstrada acima do -▲-. Letras maiúsculas diferentes indicam que as diferenças

entre experimentos e seus respectivos controles são significativas de acordo com o teste de Sidak ($P < 0.05$).

4.3. Alterações ultraestruturais dos promastigotas de *Leishmania amazonensis* na presença do $\gamma_{32-46}Vu$ -Def

Para avaliar o efeito tóxico do $\gamma_{32-46}Vu$ -Def sobre a célula de *L. amazonensis* foi feita a análise das estruturas celulares do parasita através de MET (Figura 14) após 8 h de incubação a 28 °C na presença de 74 μ M (tratado) e na ausência (controle) do $\gamma_{32-46}Vu$ -Def. No controle, as células são levemente delgadas e apresentam um citoplasma organizado com organelas como núcleo (N), mitocôndria (M), cinetoplasto (C) e bolsa flagelar (BF) bem caracterizados. Os núcleos apresentam um nucléolo (n) grande localizado centralmente e a cromatina (CMC) uniformemente distribuída ao longo da membrana nuclear. Analisando as células tratadas é possível observar uma alteração na forma do parasita, que se torna mais arredondado, o citoplasma se torna granuloso, menos eletrondenso (★) e vacuolizado (VC). Os núcleos passam a apresentar uma cromatina desorganizada, nucléolos reduzidos e distorcidos e condensação da cromatina na periferia nuclear. Outras organelas celulares também apresentaram alterações ultraestruturais como as mitocôndrias e cinetoplastos. As mitocôndrias tornam-se inchadas e fragmentadas e os cinetoplastos tornam-se mais eletrondensos e em alguns parasitas apresentam-se divididos. No entanto, a membrana plasmática parece permanecer intacta (Figura 14).

Controle



γ_{32-46} Vu-Def

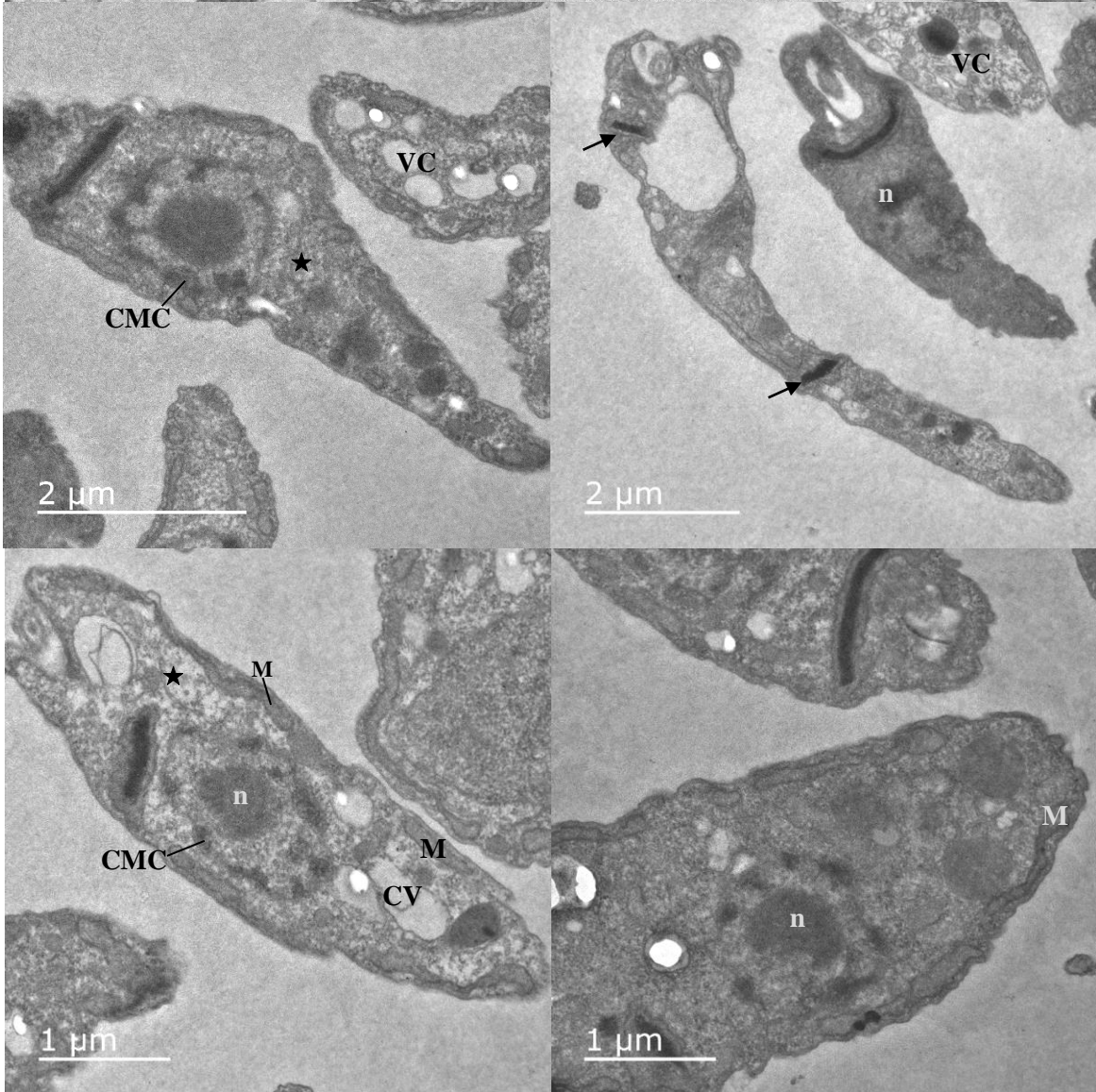


Figura 14. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratados com 74 μM de $\gamma_{32-46}\text{Vu-Def}$ por 8 h. Os protozoários tratados mostram uma morfologia ultraestrutural alterada com alteração na forma em que as células se tornam mais arredondadas, o citoplasma é granuloso, menos eletrondenso e vacuolado. Os núcleos apresentam uma cromatina desorganizada, nucléolos reduzidos e distorcidos e condensação de cromatina na periferia nuclear. A mitocôndria é inchada e o cinetoplasto mais eletrondenso e ambos os casos, fragmentado. A membrana plasmática parece estar intacta. N, núcleo; n, nucléolos, M, mitocôndria; C, cinetoplasto; F, flagelo; BF, bolso flagelar; CMC, cromatina condensada na periferia do núcleo; ★, citoplasma menos eletrondenso; ➡, cinetoplasto fragmentado; VC, citoplasma vacuolado.

4.4. Fragmentação do DNA de células tratadas com $\gamma_{32-46}\text{Vu-Def}$

Após observar os efeitos causados no núcleo e no cinetoplasto das células de *L. amazonensis* por $\gamma_{32-46}\text{Vu-Def}$ após 8 h de incubação por MET, um ensaio de microscopia óptica de fluorescência na presença de brometo de etídio foi realizado (Figura 15). As amostras do controle mostram uma marcação pontual em relação ao núcleo e cinetoplasto, diferente do observado no tratamento para alguns parasitas, que apresenta uma marcação difusa. Este padrão de marcação sugere fragmentação do DNA e desorganização do núcleo e corroboram com as imagens vistas por MET.

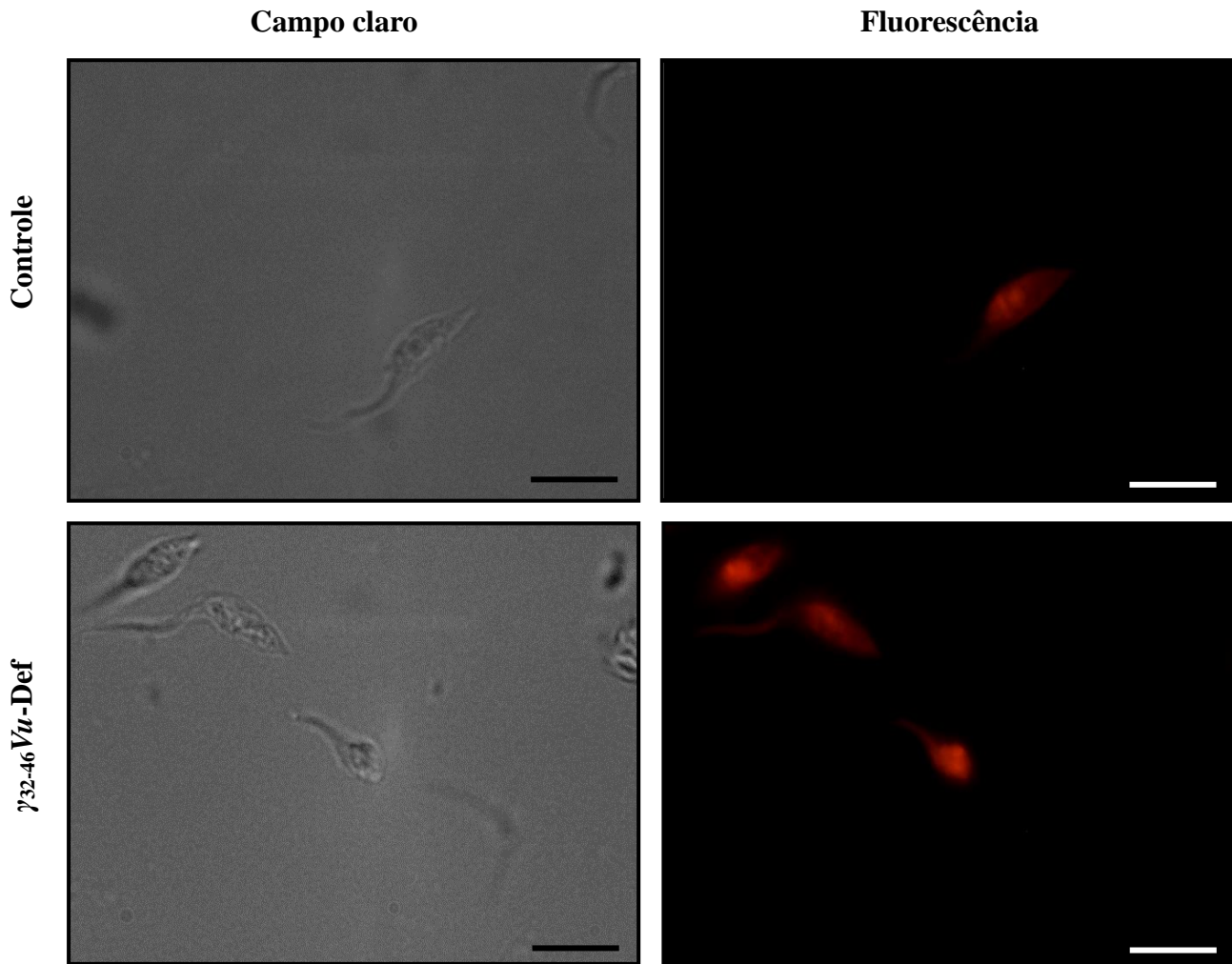


Figura 15. Imagem das células de *Leishmania amazonensis* tratadas com 74 μ M de γ_{32-46} Vu-Def por 8 h e incubadas com o corante brometo de etídio. Note a marcação difusa das amostras tratadas. Barras = 20 μ m.

4.5. Despolarização da membrana mitocondrial de células de *Leishmania amazonensis*

Um ensaio de microscopia óptica de fluorescência na presença do marcador rodamina 123 foi realizado com intuito de se observar se já em 4 h ocorria alguma alteração na funcionalidade mitocondrial. Na Figura 16 é possível observar que as células de controle apresentaram marcações pontuais do corante ao longo do citoplasma celular indicando que a mitocôndria está funcional. Na presença do γ_{32-46} Vu-Def essas marcações pontuais não são observadas e, em vez disso, observa-se uma marcação difusa ao longo do citoplasma celular. Este resultado indica que as mitocôndrias foram

despolarizadas e que o potencial de membrana de outras organelas ou vesículas pode estar estimulado, já que este corante se acumula em locais que o potencial eletroquímico é alto. É possível observar também a presença de vesículas nas células tratadas corroborando com as observações feitas no MET.

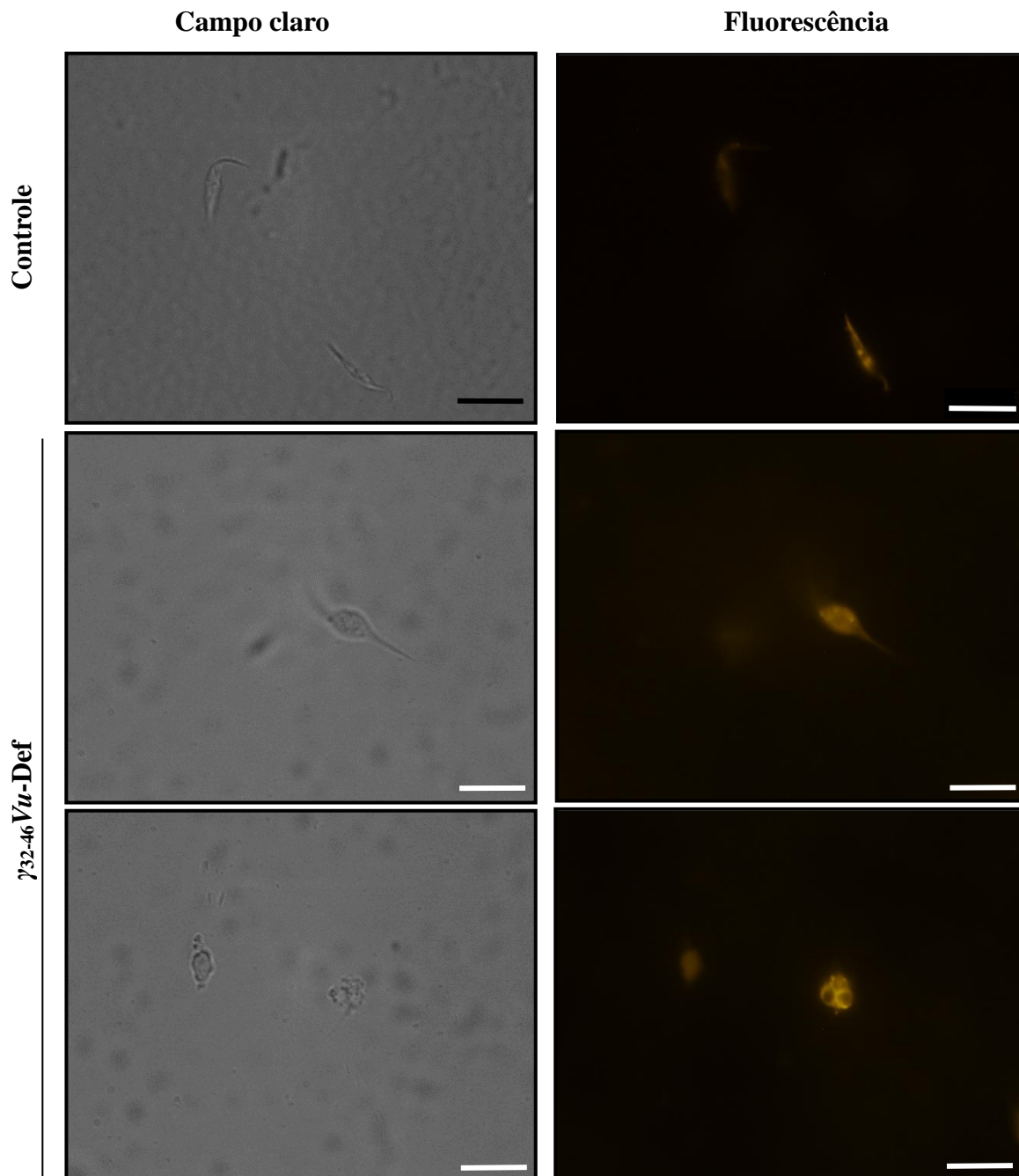


Figura 16. Imagem de células de *Leishmania amazonensis* tratadas com 74 μ M de $\gamma_{32-46}Vu-Def$ por 4 h e incubadas com o marcador fluorescente rodamina 123. Barras = 20 μ m.

4.6. Acidificação vesicular de células de *Leishmania amazonensis*

Diante da despolarização da membrana mitocondrial e uma possível compensação deste efeito no citoplasma pode estar ocorrendo, se tornando mais ácido, já que a marcação da rodamina 123 foi mais forte no citoplasma das células tratadas. Para verificarmos se o citoplasma das células tratadas está acidificado, um ensaio de microscopia óptica de fluorescência foi realizado após 4 h de incubação com $\gamma_{32-46}Vu$ -Def na presença do corante laranja de acridina (Figura 17). Quando excitado a 475 nm o corante laranja de acridina emite fluorescência vermelho-alaranjado na presença de compartimentos ácidos o que foi possível observar nas células tratadas com $\gamma_{32-46}Vu$ -Def. Diferentemente do que é observado no controle que apresenta fluorescência vermelha e marcação pontual no núcleo e marcação difusa no citoplasma com algumas regiões não marcadas. Este resultado indica que o citoplasma e/ou vesículas citoplasmáticas estavam acidificadas dando suporte ao resultado visto da marcação com rodamina 123. Esse corante também emite fluorescência verde quando excitado a 546 nm quando se liga a DNA fita dupla, nessas condições as células do controle apresentam uma marcação onde é possível visualizar claramente o núcleo e o cinetoplasto inteiros, no entanto, as células tratadas apresentam uma marcação do núcleo e cinetoplasto com alterações morfológicas, e alteração na marcação do citoplasma que se tornou difusa e mais intensa. Esses resultados são compatíveis com os resultados observados pela marcação do brometo de etídio.

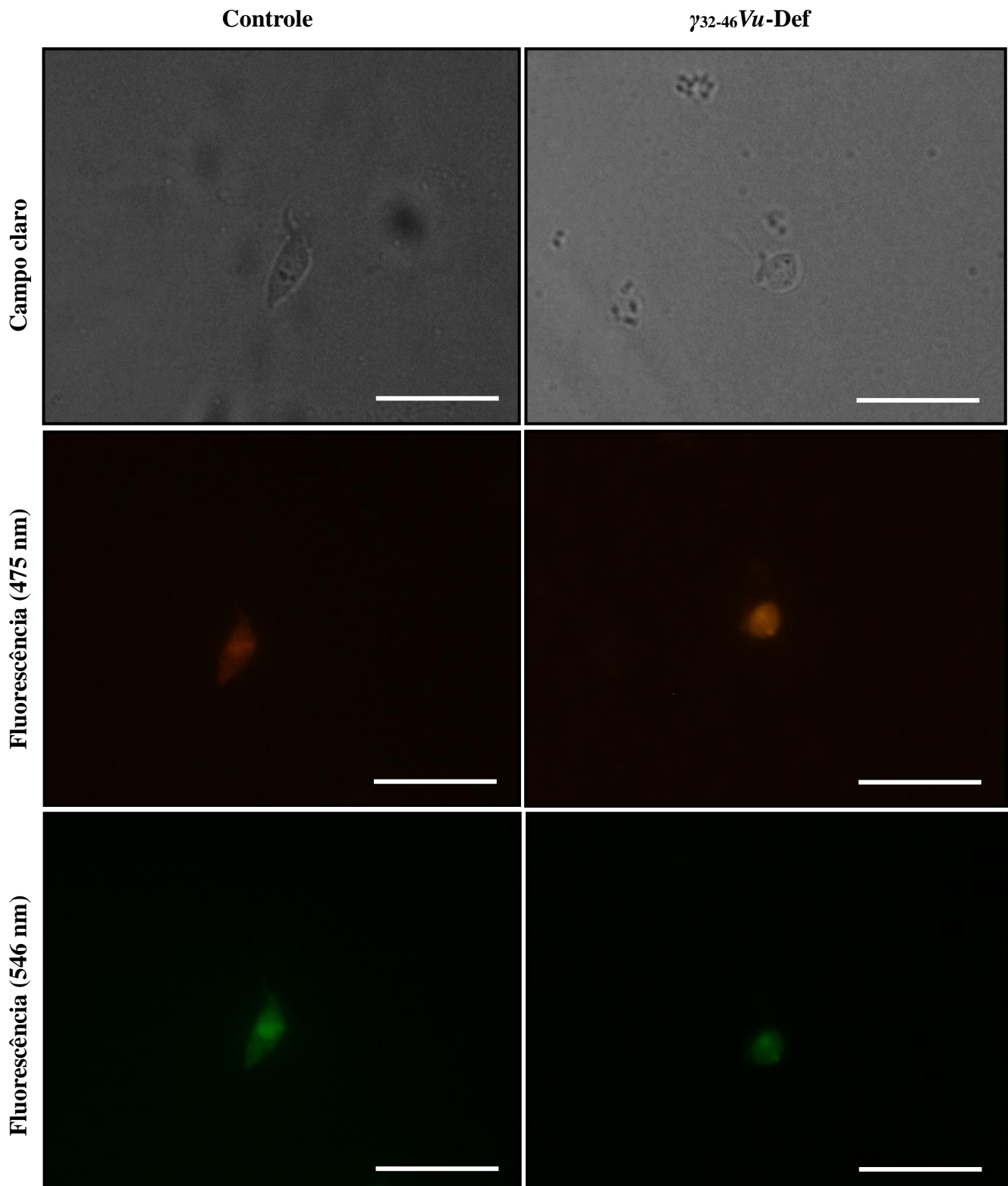


Figura 17. Imagem de células de *Leishmania amazonensis* tratadas com 74 μM de $\gamma_{32-46}Vu-Def$ por 4 h e incubadas com o marcador fluorescente laranja de acridina. Barras = 20 μm .

4.7. Efeito da temperatura na bioatividade do $\gamma_{32-46}Vu$ -Def em promastigota de *Leishmania amazonensis*

Como mostrado na figura 8D, $\gamma_{32-46}Vu$ -Def compreende na estrutura da *Vu*-Def a folha β_2 , a volta entre as folhas β_2 e β_3 e parte da folha β_3 e que em solução esta estrutura não se mantém e, portanto, sua atividade biológica não depende de conformação. Para confirmar se o peptídeo $\gamma_{32-46}Vu$ -Def possui uma conformação estrutural e se a sua atividade biológica é dependente desta conformação, $\gamma_{32-46}Vu$ -Def foi aquecido por 1 h a 100 °C com intuito de desnaturá-lo. O ensaio de inibição do crescimento da cultura realizado com o peptídeo aquecido demonstrou um índice de inibição, 37 %, semelhante ao apresentado pelo peptídeo não aquecido, 30% (Figura 18). O teste estatístico indica que a diferença da inibição entre o peptídeo aquecido e não aquecido não é significativa. Esses resultados são um indicativo de que a ação do peptídeo $\gamma_{32-46}Vu$ -Def é independente da sua conformação.

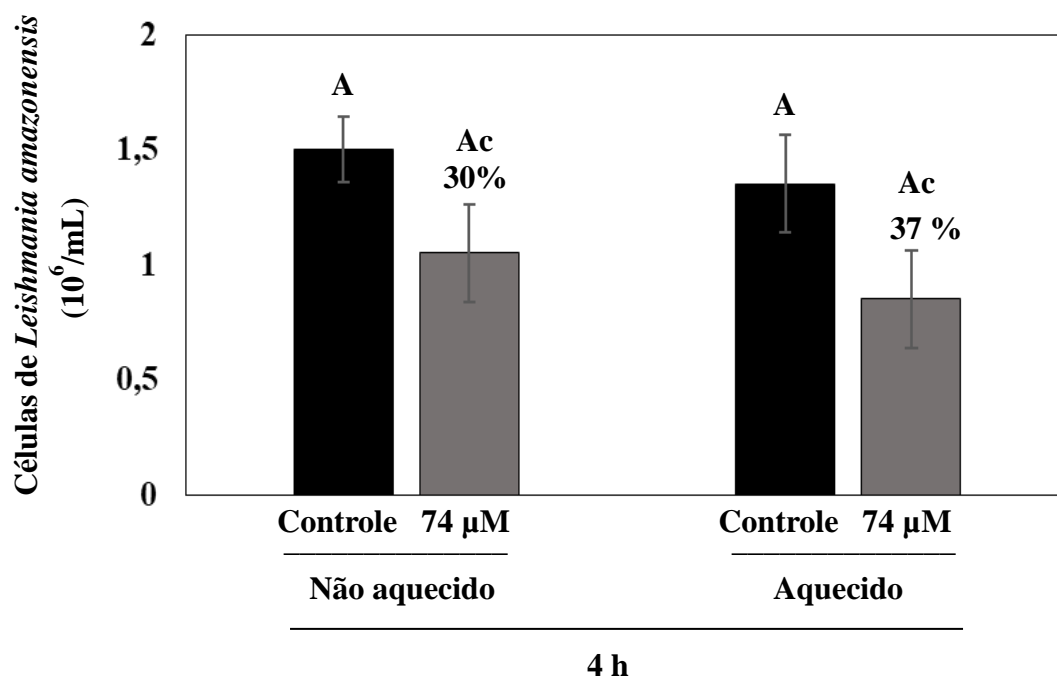


Figura 18. Inibição do crescimento da cultura de *Leishmania amazonensis* na ausência (controle) e presença de 74 μ M do peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu$ -Def previamente aquecido a 100 °C por 1 h. A porcentagem de eliminação do protozoário em relação ao seu controle é demonstrado acima das barras. Letras maiúsculas iguais indicam que as diferenças entre tratado e controle não são significativas de acordo com o teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras minúsculas iguais indicam que as diferenças entre o $\gamma_{32-46}Vu$ -Def não

aquecido e o $\gamma_{32-46}Vu$ -Def aquecido não são significativas através do teste de Tukey ($P < 0.05$). Os dados do $\gamma_{32-46}Vu$ -Def não aquecido foram retirados da Figura 11.

Com intuito de determinar se a atividade biológica do $\gamma_{32-46}Vu$ -Def seria afetada a baixa temperatura um novo ensaio de inibição foi realizado incubando o parasita durante 4 h a 4 °C na presença de $\gamma_{32-46}Vu$ -Def (Figura 19). É possível observar que quando as células são incubadas a 4 °C, $\gamma_{32-46}Vu$ -Def é capaz de eliminar 48% dos parasitas em 4 h e quando as células foram transferidas para 28 °C por mais 4 h (tempo total de incubação 8 h), o $\gamma_{32-46}Vu$ -Def é capaz de eliminar 100% do crescimento da cultura do protozoário. Portanto, a 4 °C os parasitas são mais suscetíveis a ação do $\gamma_{32-46}Vu$ -Def sendo eliminados por completo em 8 h.

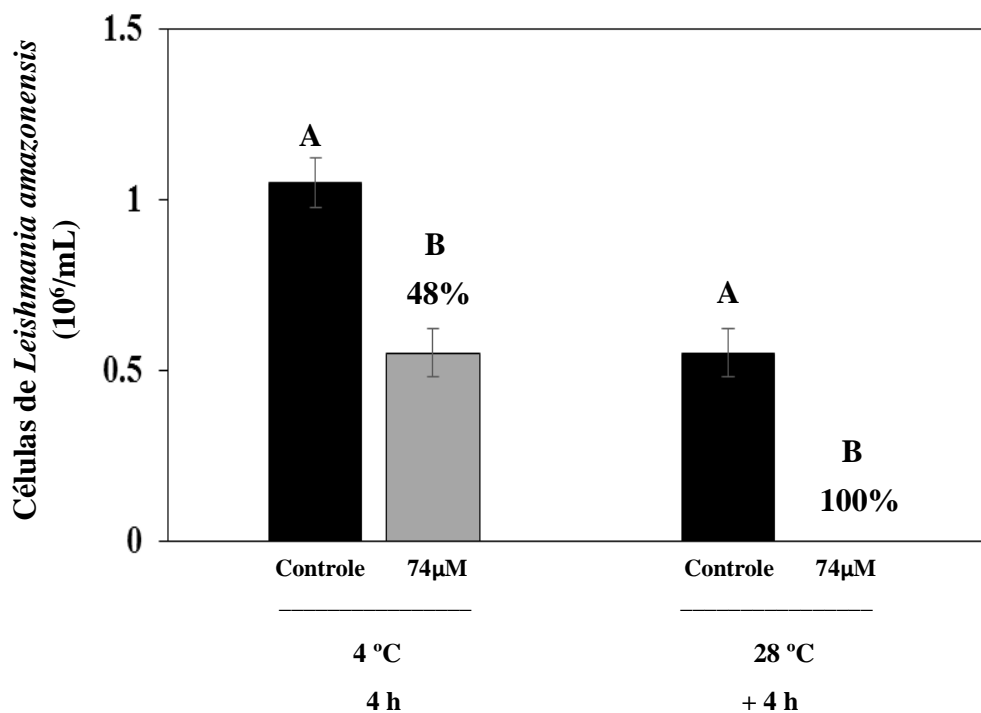


Figura 19. Inibição do crescimento da cultura de *Leishmania amazonensis* a 4 °C na ausência (controle) e presença de 74 µM de peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu$ -Def. O crescimento foi observado após 4 h de incubação a 4 °C e após outras 4 h a 28 °C. A porcentagem de inibição do protozoário em relação aos seus respectivos controles é demonstrado acima das barras de testes. Letras maiúsculas diferentes indicam que as

diferenças entre tratado e seu respectivo controle são significativas de acordo com o teste de Tukey ($P < 0.05$).

5. Discussão

5.1. Peptídeo sintético

A estratégia de identificar e usar peptídeos cada vez menores que retêm atividade biológica dos peptídeos inteiros originais tem algumas vantagens. Uma delas é a identificação do próprio peptídeo o qual está correlacionado com a menor estrutura responsável pela atividade biológica e a outra é que sequências menores ativas biologicamente tem um menor custo para síntese química e menor probabilidade de reação imune em comparação com os peptídeos inteiros o que os permitiria serem usados com fins farmacêuticos (Schaaper *et al.*, 2001).

Diante desses dados, alguns trabalhos sobre estrutura-atividade biológica foram realizados com defensinas de plantas e eles determinaram que a atividade antimicrobiana desses peptídeos está relacionada a uma sequência de aminoácido localizada entre as folhas β_2 e β_3 (Schaaper *et al.*, 2001; Sagaram *et al.*, 2011). Esta região também foi identificada em outros peptídeos da família das defensinas, como por exemplo, na defensina MGD1 (*Mytilus galloprovincialis defensin one*) do mexilhão do mediterrâneo (*M. galloprovincialis*) (Romestand *et al.*, 2003). Posteriormente Yount e Yeaman (2004) identificaram um elemento estrutural comum, compreendido entre duas folhas β e a volta que as conecta, em AMPs de diferentes famílias e demonstraram que este elemento estrutural era responsável pela atividade biológica destes AMPs. Este elemento estrutural conservado entre os peptídeos com atividades antimicrobianas foi denominado de γ -core, e é a mesma região previamente determinada nas defensinas de plantas. Diante disso neste trabalho realizamos a síntese dessa região da defensina de *V. unguiculata* (Figura 8C).

No entanto, para sintetizar a região de interesse inicialmente foi necessário obter a estrutura terciária de *Vu-Defr* e para isso a proteína molde selecionada foi *VrD₂*, por possuir 92% de similaridade com *Vu-Defr* (Figura 9A). Todavia, este resultado difere do que já tinha sido descrito por Santos *et al.* (2010). Aqueles autores também utilizaram a *VrD₂* como proteína molde para modelagem da *Vu-Defr*, entretanto, obtiveram 93% de similaridade entre *VrD₂* e *Vu-Defr*. Acreditamos que essa diferença aconteça porque no trabalho de Santos *et al.* (2010) eles não levam em consideração a Met₁ no início da sequência. Esta Met₁ foi incluída na estrutura primária de *Vu-Defr* como um requisito para a clonagem utilizando o vetor pET-32 EK/LIC como descrito na seção de material e método. Por essa mesma razão também observamos diferenças nos valores do

Ramachandran, Santos *et al.* (2010) apresentam valores como 92,7% de aminoácidos em regiões favoráveis, 7,3% de aminoácidos em regiões permitidas e nenhum aminoácido em regiões menos favoráveis enquanto nossa análise apresenta 85,7% de aminoácidos em regiões favoráveis, 11,9% de aminoácidos em regiões permitidas, 2,4% aminoácidos em regiões menos favoráveis e nenhum aminoácido na região não permitida (Figura 9). Apesar de valores diferentes, nossa análise também valida a estrutura da *Vu-Defr*. E a sua estrutura também apresenta uma α -hélice e três folhas β antiparalelas assim como observadas em outras defensinas de planta (Figura 8B e 8D) (Thomma *et al.*, 2002; Carvalho e Gomes, 2011).

Após a obtenção da estrutura terciária de *Vu-Defr* a região de síntese foi selecionada compreendendo a Leu₃₂ a Arg₄₆ (Figura 8C). Na sequência selecionada, os três resíduos de cisteínas foram substituídos por alaninas, dando origem ao peptídeo LSGRARDDVRAWATR denominado γ_{32-46} *Vu-Def*. A troca dos resíduos de Cys por Ala foi feito para evitar que as cisteínas interajam entre si para formar pontes dissulfeto que não existem no peptídeo natural e para evitar ter resíduos livres de cisteínas. Outros autores para resolver este mesmo problema substituíram os resíduos de cisteínas por ácido α -aminobutírico, um aminoácido não proteico (Schaaper *et al.*, 2001). O peptídeo γ_{32-46} *Vu-Def* abrange o γ -core (Gly₃₄ a Ala₄₂) assim definido por Yount e Yeaman (2004), os resíduos Leu₃₂ e Ser₃₃ da folha β_2 e os resíduos Trp₄₃, Cys₄₄, Thr₄₅ e Arg₄₆ da folha β_3 . Nós optamos por sintetizar esses seis resíduos a mais que o γ -core, pois trabalhos como os de Schaaper *et al.* (2001) demonstram que o tamanho do peptídeo influencia sua atividade antifúngica. Esses autores demonstraram através da síntese de vários peptídeos de tamanhos diferentes, abrangendo de 13 a 20 resíduos de aminoácidos, com base na estrutura primária da defensina *RsAFP*₂ que diminuindo o tamanho do peptídeo também diminuiu a sua atividade antifúngica e que os peptídeos que apresentavam maior atividade antifúngica abrangiam, além da região do γ -core, alguns aminoácidos das folhas β_2 e β_3 . Sagaram *et al.* (2011) também demonstraram que a síntese de peptídeos maiores do que γ -core melhora a atividade antifúngica, eles demonstram através da síntese de alguns peptídeos com base na sequência dos γ -core das defensinas *MsDef*₁ e *MtDef*₄.

5.2. Bioatividade do peptídeo γ_{32-46} *Vu-Def*

Alguns peptídeos de plantas como tioninas de trigo, defensina PTH₁, defensina PvD₁ mostraram atividade contra parasitas (Berrocal-Lobo *et al.*, 2009; McGwire e

Kulkarni, 2010; Torrent *et al.*, 2012; do Nascimento *et al.*, 2015) e entre eles a defensina *Vu-Defr* que com 18,5 μM é capaz de inibir o crescimento da cultura de promastigota de *L. amazonensis* em 54% após 24 h de incubação (Souza *et al.*, 2013). Neste trabalho observamos 51% de inibição do crescimento da cultura em 24 h na presença da *Vu-Defr*, essa diferença não é estatisticamente significativa. A atividade de *Vu-Defr* foi usada como padrão para determinar se o peptídeo $\gamma_{32-46}\text{Vu-Def}$ (Figura 10) possuía atividade biológica e se essa atividade era semelhante ao peptídeo inteiro. Como descrito nos resultados, $\gamma_{32-46}\text{Vu-Def}$ possui atividade semelhante a defensina inteira. Este resultado difere do que foi observado por Sagaram *et al.* (2011) onde eles mostram que os peptídeos GMA1-C e GMA4-C derivados do γ -core da *MsDef1* e *MtDef4*, respectivamente, não exibem a mesma atividade que os peptídeos inteiros. GMA1-C precisa de 14 μM para atingir inibição do crescimento de 50% (IC_{50} , do inglês *inhibition concentration to obtain the half maximum inhibition*) de *F. graminearum* enquanto *MsDef1* necessita de 2 a 4 μM , GMA4-C precisa de 3 μM para atingir o IC_{50} , enquanto o *MtDef4* necessita de 0,75 a 1 μM . Acreditamos que essa perda de atividade descrita por Sagaram *et al.* (2011) aconteça porque os peptídeos GMA1-C e GMA4-C não abrangem os resíduos de aminoácidos da região N-terminal presentes na folha β_2 , que de acordo com Schaaper *et al.* (2001) estes resíduos tem importância para a manutenção da atividade.

Posteriormente realizamos ensaios para determinar a concentração tóxica de $\gamma_{32-46}\text{Vu-Def}$ para os protozoários. Observamos que as concentrações de 18,5 e 74 μM quando incubadas por 48 h eliminam 60 e 93% dos promastigotas de *L. amazonensis*, respectivamente (Figura 11). A viabilidade das células restantes desse ensaio foi avaliada através do ensaio de reversibilidade (Figura 12). Os 40% da população que sobraram da concentração 18,5 μM se mantiveram viáveis ao ponto de conseguir restabelecer o crescimento da cultura, o que sugere que essa concentração não é suficiente para interagir com toda a população de células da cultura, dessa forma eliminando apenas as células que interagiram com $\gamma_{32-46}\text{Vu-Def}$. Já os 7% de células restantes da concentração de 74 μM perdem a viabilidade, sugerindo um efeito letal dessa concentração e indicando que apesar de não se observar uma total eliminação após 48 h as células restantes já haviam sido completamente afetadas ao ponto do efeito tóxico ser irreversível. A utilização da concentração do peptídeo antimicrobiano que é letal para o micro-organismo é de grande importância para estudos que buscam entender os sinais de resposta que levam à morte do micro-organismo, pois dessa forma evitam

que os sinais de morte se misturem com os sinais de resposta que ainda permitem à recuperação dos mesmos (Soares *et al.*, 2017). Esses autores trabalharam com *S. cerevisiae* e *ApDef₁* (*Adenantha pavonina defensin one*) e sugeriram que, na concentração mais baixa de *ApDef₁*, as células de levedura podem montar uma resposta de defesa que reverte a via que leva à morte celular induzida por *ApDef₁* (Soares *et al.*, 2017). Além disso, o uso da concentração letal do agente antimicrobiano é mais desejável porque reduz o risco de desenvolvimento de micro-organismos resistentes em sua utilização como substância terapêutica (Levy e Bonnie, 2004; Vieira *et al.*, 2015).

Um novo ensaio foi realizado na presença de 74 μM do $\gamma_{32-46}\text{Vu-Def}$ com o crescimento da cultura sendo avaliado em diferentes tempos (Figura 13). O ensaio mostrou que apesar da eliminação do parasita ocorrer de forma gradual ao longo de 48 h existem pontos com taxa de eliminação mais acentuada, como em 16 h (eliminação 2,3 vezes maior que o a eliminação de 4 h) e 48 h (eliminação 1,3 vezes maior que a eliminação de 24 h). Analisando a curva também podemos observar que a maior parte da população (70%) foi eliminada nas primeiras 16 h após esse período demorou mais 24 h para eliminar o restante da população (27%). Nessas 32 h restantes (tempo de 16 a 48 h) a curva de crescimento se mantém quase linear do tempo de 16 h a 40 h (total de 24 h) indicando a eliminação de poucos parasitas (10%) nesse período. Somente a partir do tempo de 40 h que a curva apresenta um novo declínio acentuado indicando a eliminação de 15% dos parasitas nesse período. Juntando estes dados da forma de eliminação dos protozoários, com o dado de que nestas condições de cultivo, *L. amazonensis* leve 8 h para se dividir, nos sugere que o ciclo celular pode estar envolvido na eliminação dos protozoários, neste sentido $\gamma_{32-46}\text{Vu-Def}$ pode estar interagindo com algum alvo celular que é exposto apenas em uma determinada fase do ciclo celular. Alguns autores relatam que defensinas de planta podem interagir com alvos intracelulares como é o caso da *NaD₁* (van der Weerden *et al.*, 2008), a *MtDef₄* (El-Mounadi *et al.*, 2016) e a *PsD₁* (Lobo *et al.*, 2007) que conseguem acessar ao citoplasma dos fungos e interagir com alvos intracelulares. E entre os alvos intracelulares que são afetados está o ciclo celular. *PsD₁* por exemplo, entra no citoplasma do fungo *N. crassa* e se liga à ciclina F que é relacionada ao controle do ciclo celular (Lobo *et al.*, 2007). Outra defensina de planta para qual mecanismo de ação está relacionada ao ciclo celular é *ApDef₁* como observado em um trabalho com levedura *S. cerevisiae* (Soares *et al.*, 2017).

Para verificar o envolvimento do ciclo celular na eliminação do protozoário um ensaio com a cultura sincronizada foi realizado (Figura 13). Neste resultado foi observado que ambas as culturas, sincronizadas e não sincronizadas, levam o mesmo tempo para eliminar 97% das células. E nos tempos intermediários, 8 e 24 h, a taxa de eliminação difere da cultura não sincronizada. A sincronizada apresenta 19 e 58% em 8 e 24 h respectivamente, enquanto a não sincronizada apresenta 45,7 e 73% nos mesmos tempos. No entanto, esse resultado não era esperado. Acreditávamos que no tempo de dobra do parasita, em torno de 8 h, a maior parte da cultura sincronizada já estaria eliminada, assim como é observado no trabalho de Soares *et al.* (2017) onde eles descrevem que a completa eliminação das células de *S. cerevisiae* com a defensina *ApDef*₁ que levava 18 h para ocorrer na cultura não sincronizada, passa a acontecer com 3 h na cultura sincronizada. Este tempo de 3 h é o tempo de dobra da levedura nas condições em que foram feitas o ensaio. Dessa forma ligando fortemente a ação tóxica da *ApDef*₁ ao ciclo celular. Como não observarmos uma completa eliminação nos tempos iniciais de contagem como observado por Soares *et al.* (2017), mas observamos uma alteração no tempo de eliminação dos parasitas entre as culturas sincronizadas e não sincronizadas o que ainda indica um envolvimento do ciclo celular, não podemos afirmar que a ação do peptídeo está relacionada ao ciclo celular, para isso mais estudos precisam ser realizados.

5.3. Alterações ultraestruturais dos promastigotas de *Leishmania amazonensis* na presença do γ_{32-46} Vu-Def

A fim entender os efeitos tóxicos iniciais de γ_{32-46} Vu-Def na célula de *L. amazonensis* realizamos a análise das estruturas celulares do parasita após 8 h de incubação (Figura 14). Sendo observado um citoplasma vacuolizado e menos eletrondenso, núcleos com cromatina condensada, desorganizada e na periferia nuclear, nucléolos reduzidos e distorcidos, mitocôndrias inchadas e fragmentadas e cinetoplastos mais eletrondensos e alguns divididos. Rodrigues *et al.* (2014b) também descreve alterações ultraestruturais como inchaço mitocondrial e vacuolização do citoplasma nos promastigotas de *L. infantum* quando tratados com a fração B2, rica em ácidos graxos e esterol, do extrato de *Arrabidaea chica*. Os mesmos autores também conseguiram observar alterações no complexo de Golgi e alguns casos membrana mitocondrial comprometida. Outros autores descrevem um citoplasma menos eletrondenso após incubação de espécies de *Leishmania* com diferentes AMPs de anfíbios, mas associam

essa perda com o comprometimento da membrana plasmática que leva ao extravasamento do material citoplasmático (Guerrero *et al.*, 2004; Mangoni *et al.*, 2005). No entanto, nosso resultado indica que a membrana plasmática parece permanecer intacta. Isso pode ocorrer porque o nosso trabalho busca os efeitos tóxicos iniciais, por isso usamos o tempo de 8 h onde apenas 45% da população foi eliminada, enquanto os autores citados trabalham com a efeitos finais onde se observa a morte de mais de 90% da população. Adicionalmente os AMPs de anfíbios utilizados possui um mecanismo de ação conhecido em outros organismos por levar a morte através da formação de poros nas membranas (Giuliani *et al.*, 2007).

A partir dos resultados observados no núcleo e no cinetoplasto, uma análise com o corante fluorescente brometo de etídeo que marca ácidos nucleicos (Figura 15) nos permitiu observar a fragmentação do DNA e a desorganização do núcleo. Células apoptóticas apresentam algumas ou todas as seguintes características morfológicas: fragmentação de DNA, condensação de cromatina, *blebbing* de membrana, formação de corpos apoptóticos, translocação de fosfatidilserina para o exterior da membrana plasmática, clivagem de proteínas por caspases, perda do potencial de membrana e liberação de proteínas da mitocôndria (Reece *et al.*, 2011; Berghe *et al.*, 2013). Juntando estes dados de apoptose com os nossos resultados das alterações estruturais nos núcleos e o da perda de viabilidade das células tratadas (Figura 12), é possível sugerir que talvez uma via de morte celular por apoptose seja ativada após interação $\gamma_{32-46}Vu$ -Def-*L. amazonensis*.

5.4. Despolarização da membrana mitocondrial de células de *Leishmania amazonensis*

Visto as alterações causadas nas mitocôndrias após 8 h na presença do $\gamma_{32-46}Vu$ -Def e com intuito de observar se o efeito tóxico já era observado nas mitocôndrias nas primeiras horas de ensaio, observamos o potencial de membrana mitocondrial após 4 h de incubação (Figura 16). O resultado esperado era uma diminuição da fluorescência nos parasitas tratados com o peptídeo assim como observado por Souza *et al.* (2018), onde na presença da *Vu*-Defr após 24 h de incubação se observava perda do potencial de membrana através da diminuição da fluorescência do corante rodamina 123. No entanto, o que observamos em nosso trabalho foi a perda da marcação pontual nas células tratadas que passaram a apresentar um citoplasma com marcação difusa (Figura 16). Fardin *et al.* (2016) mostra um resultado semelhante ao nosso, inicialmente eles

observaram a perda da funcionalidade mitocondrial através da diminuição da fluorescência do corante rodamina 123 após incubar as células de *L. amazonensis* por 24 h com uma fração do extrato de *Bertholletia excelsa*. Em seguida após 2 h de incubação observaram um aumento da fluorescência e sugeriram que isso ocorra porque as mitocôndrias combinado a outras organelas ajudam a contrabalancear a desregulação do gradiente eletroquímico gerado pelo comprometimento da membrana plasmática. Diante disso, as alterações na marcação observada nas células tratadas com $\gamma_{32-46}Vu$ -Def podem indicar a despolarização da membrana mitocondrial, e devido ao corante ter a propriedade de se acumular em locais que o potencial eletroquímico da célula é alto, acreditamos que a marcação observada nas células tratadas seja devido a uma alteração no potencial de membrana de outras organelas gerando a marcação difusa que observamos no citoplasma. Esses resultados também são um indicativo de morte celular por apoptose visto que a despolarização da membrana mitocondrial tem sido associada a morte por apoptose em *Leishmania* (Mukherjee *et al.*, 2002).

5.5. Acidificação vesicular de células de *Leishmania amazonensis*

Visto o possível desequilíbrio eletroquímico gerado no citoplasma pela despolarização da membrana mitocondrial, o acionamento de outras organelas para a manutenção das funções fisiológicas na célula e que para a manutenção do potencial de membrana as organelas utilizam bombas de H^+ (Glaser *et al.*, 1988) nós avaliamos através do corante de laranja de acridina se estava ocorrendo acidificação na célula. E o que observamos é que as células tratadas apresentaram marcação vermelho alaranjada difusa ao longo do citoplasma e forte em duas regiões específicas indicando a acidificação de algumas organelas e do citoplasma (Figura 17 - 475 nm). Esse resultado reforça a nossa ideia da despolarização da membrana mitocondrial e a marcação do corante rodamina 123 no citoplasma das células tratadas.

Outro resultado observado a partir do corante laranja de acridina, aproveita a capacidade deste corante para marcar DNA (Figura 17 – 546 nm) e foi possível observar que já em 4 h se visualiza uma redução da marcação nas células tratadas indicando uma alteração morfológica no núcleo e no cinetoplasto. Neto *et al.* (2011) também observa alterações na marcação da fluorescência verde em *L. chagasi* e *L. amazonensis* tratados com lignana de *Ocotea duckei* Vattimo e sugere que isso ocorra devido a danos ou a alterações conformacionais nos ácidos nucleicos. Estes resultados combinados ao de despolarização da membrana (Figura 16) mostram que o núcleo e a mitocôndria são

afetados já em 4 h e que possivelmente são as primeiras organelas a serem afetadas por $\gamma_{32-46}Vu$ -Def.

5.6. Efeito da temperatura na bioatividade do $\gamma_{32-46}Vu$ -Def em promastigota de *Leishmania amazonensis*

Esse novo ensaio foi realizado com intuito de desnaturar o peptídeo e mostrar que a sua atividade é independente da sua conformação (Figura 18). Devido a natureza linear de $\gamma_{32-46}Vu$ -Def e sem a presença de cisteínas, acreditamos que este peptídeo em solução não apresenta nenhuma conformação específica. Ao contrário, nós acreditamos que ele assume uma conformação desordenada e não estruturada e que, portanto, sua atividade biológica não depende de conformação. Nosso resultado indica que ambos os tratamentos, aquecido e não aquecido, possuem a mesma taxa de inibição, indicando que a conformação não interfere na atividade biológica do $\gamma_{32-46}Vu$ -Def. Alguns autores mostram que as defensinas de planta por terem uma estrutura terciária rica em pontes dissulfeto são consideradas peptídeos estáveis, podendo suportar condições físico-químicas extremas, tais como temperaturas variando de 0 a 90 °C por 20 min e pH de 4-10 sem perder a atividade antifúngica (Wong e Ng, 2005a; b; de Beer e Vivier, 2008). No entanto, a conformação do $\gamma_{32-46}Vu$ -Def é desconhecida em condições físico-químicas extremas, uma vez que o peptídeo foi baseado na volta da molécula que é estabilizado por uma ponte dissulfeto formada por dois resíduos de cisteína que foram substituídas por resíduos de alanina. Indicando, portanto, que esse peptídeo não deve ter uma conformação estrutural. O que corrobora com os resultados encontrados (Figura 18).

Visto que a atividade biológica de $\gamma_{32-46}Vu$ -Def se mantém independente da sua conformação um novo ensaio foi realizado, incubando o parasita durante 4 h a 4 °C a fim de observar se a atividade de $\gamma_{32-46}Vu$ -Def seria afetada a essa temperatura. O que observamos é que a 4 °C os parasitas são mais suscetíveis a ação do $\gamma_{32-46}Vu$ -Def sendo eliminados por completo em 8 h (Figura 19). No entanto, esses resultados não eram esperados, esperávamos que a 4 °C as células de *L. amazonensis* fossem protegidas da ação do $\gamma_{32-46}Vu$ -Def. Visto que alguns autores descrevem que a interação peptídeo antimicrobiano-micro-organismo ocorre através do potencial elétrico da membrana plasmática como os peptídeos *ApDef*₁ e histatina 5 (AMP isolado da saliva humana). As células dos micro-organismos quando tratados com CCCP, um agente despolarizante de

membrana, ou incubados a 4 °C têm a sua atividade antimicrobiana inibida (Gyurko *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2017). Tanto o agente despolarizante como a baixa temperatura diminuem o metabolismo da célula (Gyurko *et al.*, 2000). Além disso, outros autores descrevem que a 4 °C o parasita *Trypanosoma cruzi*, pertencente à ordem Kinetoplastida assim como as *Leishmania* spp., possui os processos de endocitose mediada por receptor e pinocitose afetados (de Figueiredo e Soares, 2000). Portanto, impedindo a entrada de nutrientes ou mesmo de peptídeos por essas vias. Estes resultados são indicativos de que o peptídeo não entra no parasita através de transportadores iônicos, que são dependentes do potencial da membrana, ou através da endocitose mediada por receptor e da pinocitose. No entanto, é necessário fazer mais estudos para afirmarmos se o peptídeo entra ou não na célula e se entra qual o mecanismo utilizado para entendermos melhor o resultado observado. Quanto ao efeito de maior susceptibilidade do parasita a ação do γ_{32-46} Vu-Def à 4 °C pode estar associado aos fatores de virulência da *L. amazonensis*. López-Solanilla *et al.* (2003) mostraram que com a bactéria *Listeria monocytogenes* a expressão do gene de regulação do fator de virulência é dependente da temperatura. Nessa bactéria, a 20 °C o gene não é expresso tornando a célula mais virulenta e mais resistente a ação da defensina de batata, e a 37 °C o gene é expresso tornando a célula menos virulenta e mais suscetível a defensina. López-Solanilla *et al.* (2003) também realizaram testes com bactérias mutantes que expressam constantemente o gene de regulação do fator de virulência e demonstra que na ausência do fator de virulência a defensina de batata a 20 °C tem uma maior taxa de inibição da bactéria *L. monocytogenes* do que a 37 °C. O protozoário *L. amazonensis* possui alguns componentes celulares que são indicados como possíveis fatores de virulência, entre eles: LPG, glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs, do inglês glicoinositolphospholipids), proteofosfoglicano (PPG, do inglês proteophosphoglycan) e proteinases (Silva-Almeida *et al.*, 2012). E entre eles está a metaloproteína leishmanolisina (GP63, glicoproteína 63) que é uma das proteinases bem conhecidas e encontradas na superfície do promastigota de *L. amazonensis* (Olivier *et al.*, 2012). A função biológica da GP63 no parasita é agir contra as enzimas do hospedeiro no intestino do inseto vetor e contra o fagolisossoma do macrófago (Silva-Almeida *et al.*, 2012). Para confirmar se GP63 também atua protegendo a célula dos parasitas dos efeitos tóxicos causados por AMPs, Kulkarni *et al.* (2006) realizaram testes com vários peptídeos e observou que na presença da enzima GP63 o parasita é protegido da ação do peptídeo pexiganana (derivado sintético do AMP magainina isolado da pele de sapo) e,

na ausência, o parasita torna-se mais suscetível à ação tóxica do peptídeo. Em vista disso, acreditamos que a 4 °C a proteinase GP63 não é funcional, não sendo capaz de proteger o parasita da ação do $\gamma_{32-46}Vu$ -Def (Figura 19), que fica livre para interagir com as células. No entanto, estudos adicionais precisam ser realizados para entender melhor o mecanismo por trás da susceptibilidade da *L. amazonensis* a $\gamma_{32-46}Vu$ -Def a 4 °C.

6. Conclusão

- Nas condições testadas o peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu$ -Def tem atividade biológica sobre *Leishmania amazonensis* similar à defensina recombinante *Vu*-Defr;
- A concentração de 74 μ M do peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu$ -Def, após 48 h de incubação, é tóxica para as células de *L. amazonensis* causando a morte da população de protozoários da cultura;
- O peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu$ -Def causa mudanças morfológicas nas células de *L. amazonensis* após 8 h de incubação principalmente a vacuolização citoplasmática, fragmentação e inchaço da mitocôndria e condensação da cromatina na periferia nuclear, características estas descritas para morte por apoptose;
- Em 4 h de incubação já se observa alterações na mitocôndria e no núcleo, sendo um indicativo que são as primeiras organelas a serem afetadas;
- Em conjunto esses dados indicam que $\gamma_{32-46}Vu$ -Def induz morte celular semelhante a apoptose em promastigotas de *L. amazonensis*;
- O peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu$ -Def não apresenta conformação definida em solução;
- Incubar as células a 4 °C não as protege contra o peptídeo sintético $\gamma_{32-46}Vu$ -Def, pelo contrário aumenta a ação do peptídeo sobre *L. amazonensis*.

7. Referências bibliográficas

- Aerts, A. M., François, I. E. J. A., Meert, E. M. K., Li, Q. T., Cammue, B. P. A. and Thevissen, K.** (2007). The antifungal activity of *RsAFP₂*, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 13, 243–247.
- Aerts, A. M., Carmona-Gutierrez, D., Lefevre, S., Govaert, G., François, I. E. J. A., Madeo, F., Santos, R., Cammue, B. P. A. and Thevissen, K.** (2009). The antifungal plant defensin *RsAFP₂* from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 583, 2513–2516.
- Allen, A., Snyder, A. K., Preuss, M., Nielsen, E. E., Shah, D. M. and Smith, T. J.** (2008). Plant defensins and virally encoded fungal toxin KP4 inhibit plant root growth. *Planta* 227, 331–339.
- Almeida, M. S., Cabral, K. M. S., Zingali, R. B. and Kurtenbach, E.** (2000). Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 378, 278–286.
- Almeida, M. S., Cabral, K. M. ., Kurtenbach, E., Almeida, F. C. . and Valente, A. P.** (2002). Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. *Journal of Molecular Biology* 315, 749–757.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410.
- Anaya-López, J. L., López-Meza, J. E., Baizabal-Aguirre, V. M., Cano-Camacho, H. and Ochoa-Zarzosa, A.** (2006). Fungicidal and cytotoxic activity of a *Capsicum chinense* defensin expressed by endothelial cells. *Biotechnology Letters* 28, 1101–1108.
- Barros, J. H. da S.** (2013). *Trypanosoma caninum, estudo com isolados de diferentes regiões brasileiras: abordagem molecular e morfológica*. 86 f. Tese (Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Instituto de Pesquisa Evandro Chagas, Rio de Janeiro.

- Baskić, D., Popović, S., Ristić, P. and Arsenijević, N. N.** (2006). Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biology International* 30, 924–932.
- Baxter, A. A., Richter, V., Lay, F. T., Poon, I. K. H., Adda, C. G., Veneer, P. K., Phan, T. K., Bleackley, M. R., Anderson, M. A., Kvensakul, M. and Hulett, M. D.** (2015). The tomato defensin TPP3 binds phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate via a conserved dimeric cationic grip conformation to mediate cell lysis. *Molecular and Cellular Biology* 35, 1964–1978.
- Benko-Iseppon, A. M., Galdino, S. L., Calsa, T., Kido, E. A., Tossi, A., Belarmino, L. C. and Crovella, S.** (2010). Overview on plant antimicrobial peptides. *Current Protein and Peptide Science* 11, 181–188.
- Berghe, T. Vanden, Grootjans, S., Goossens, V., Dondelinger, Y., Krysko, D. V., Takahashi, N. and Vandenabeele, P.** (2013). Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods* 61, 117–129.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., Rodríguez-Palenzuela, P., García-Olmedo, F. and Rivas, L.** (2009). *Leishmania donovani*: thionins, plant antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *Experimental Parasitology* 122, 247–249.
- Bjellqvist, B., Hughes, G. J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J.-C., Frutiger, S. and Hochstrasser, D.** (1993). The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14, 1023–1031.
- Bjellqvist, B., Basse, B., Olsen, E. and Celis, J. E.** (1994). Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis* 15, 529–539.
- Bleackley, M. R., Wiltshire, J. L., Perrine-Walker, F., Vasa, S., Burns, R. L., van der Weerden, N. L. and Anderson, M. A.** (2014). Agp2p, the plasma membrane transregulator of polyamine uptake, regulates the antifungal activities of the plant defensin *NaD₁* and other cationic peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58, 2688–2698.

- Bruix, M., Jiménez, J. M. A., Santoro, J., González, C., Colilla, F. J., Méndez, E. and Rico, M.** (1993). Solution structure of γ 1-H and γ 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by $^1\text{H-NMR}$: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry* 32, 715–724.
- Carrasco, L., Vásquez, D., Hernández-Lucas, C., Carbonero, P. and García-Olmedo, F.** (1981). Thionins: plant peptides that modify membrane permeability in cultured mammalian cells. *European Journal of Biochemistry* 116, 185–189.
- Carvalho, A. de O. and Gomes, V. M.** (2011). Plant defensins and defensin-like peptides - biological activities and biotechnological applications. *Current Pharmaceutical Design* 17, 4270–4293.
- Carvalho, C. S., De Melo, E. J. T., Tenório, R. P. and Góes, A. J. S.** (2010). Antiparasitic action and elimination of intracellular *Toxoplasma gondii* in the presence of novel thiosemicarbazone and its 4-thiazolidinone derivatives. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 43, 139–149.
- Carvalho, A. O., Filho, G. a S., Ferreira, B. S., Branco, A. T., Okorokova-Facanha, A. L. and Gomes, V. M.** (2006). Cloning and characterization of a cDNA encoding a cowpea seed defensin and analysis of its expression. *Protein and Peptide Letters* 13, 1029–1036.
- Chen, K.-C., Lin, C.-Y., Kuan, C.-C., Sung, H.-Y. and Chen, C.-S.** (2002). A novel defensin encoded by a mungbean cDNA exhibits insecticidal activity against bruchid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7258–7263.
- Cobb, S. L. and Denny, P. W.** (2010). Antimicrobial peptides for leishmaniasis. *Current Opinion in Investigational Drugs* 11, 868–875.
- Colilla, F. J., Rocher, A. and Mendez, E.** (1990). γ -Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 270, 191–194.
- Cools, T. L., Struyfs, C., Cammue, B. P. and Thevissen, K.** (2017). Antifungal plant defensins: increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections. *Future Microbiology* 12, 441–454.
- de Beer, A. and Vivier, M. A.** (2008). Vv-AMP₁, a ripening induced peptide from *Vitis*

vinifera shows strong antifungal activity. *BioMed Central Plant Biology* 8, 75.

- de Figueiredo, R. C. B. Q. and Soares, M. J.** (2000). Low temperature blocks fluid-phase pinocytosis and receptor-mediated endocytosis in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology research* 86, 413–418.
- de Medeiros, L. N., Angeli, R., Sarzedas, C. G., Barreto-Bergter, E., Valente, A. P., Kurtenbach, E. and Almeida, F. C. L.** (2010). Backbone dynamics of the antifungal PsD₁ pea defensin and its correlation with membrane interaction by NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1798, 105–113.
- de Samblanx, G. W., Goderis, I. J., Thevissen, K., Raemaekers, R., Fant, F., Borremans, F., Acland, D. P., Osborn, R. W., Patel, S. and Broekaert, W. F.** (1997). Mutational analysis of a plant defensin from radish (*Raphanus sativus* L.) reveals two adjacent sites important for antifungal activity. *Journal of Biological Chemistry* 272, 1171–1179.
- Do, H. M., Lee, S. C., Jung, H. W., Sohn, K. H. and Hwang, B. K.** (2004). Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (CADEF1) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. *Plant Science* 166, 1297–1305.
- do Nascimento, V. V., Mello, E. O., Carvalho, L. P., de Melo, E. J. T., Carvalho, A. O., Fernandes, K. V. S. and Gomes, V. M.** (2015). PvD₁ defensin, a plant antimicrobial peptide with inhibitory activity against *Leishmania amazonensis*. *Bioscience Reports* 35, e00248.
- Doughty, J., Dixon, S., Hiscock, S. J., Willis, A. C., Parkin, I. A. P. and Dickinson, H. G.** (1998). PCP-A1, a defensin-like Brassica pollen coat protein that binds the s locus glycoprotein, is the product of gametophytic gene expression. *Plant Cell* 10, 1333–1347.
- El-Mounadi, K., Islam, K. T., Hernández-Ortiz, P., Read, N. D. and Shah, D. M.** (2016). Antifungal mechanisms of a plant defensin MtDef₄ are not conserved between the ascomycete fungi *Neurospora crassa* and *Fusarium graminearum*. *Molecular Microbiology* 100, 542–559.
- Fant, F., Vranken, W. F. and Borremans, F. A. M.** (1999). The three-dimensional

solution structure of *Aesculus hippocastanum* antimicrobial protein 1 determined by ¹H nuclear magnetic resonance. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 37, 388–403.

Fardin, J. M., Carvalho, L. P., Nascimento, V. V., Melo, E. J. T., Gomes, V. M., Machado, O. L. T., Vieira-Silva, F. C. and Carvalho, A. de O. (2016). Biochemical purification of proteins from *Bertholletia excelsa* seeds and their antileishmanial action in vitro. *World Journal of Pharmaceutical Research* 5, 233–300.

Figueira, T. N., Oliveira, F. D., Almeida, I., Mello, E. O., Gomes, V. M., Castanho, M. A. R. B. and Gaspar, D. (2017). Challenging metastatic breast cancer with the natural defensin PvD 1. *Nanoscale* 16887–16899.

Franco, O. L., Murad, A. M., Leite, J. R., Mendes, P. A. M., Prates, M. V. and Bloch, C. (2006). Identification of a cowpea γ -thionin with bactericidal activity. *The Federation of European Biochemical Societies Letters Journal* 273, 3489–3497.

Games, P. D., dos Santos, I. S., Mello, É. O., Diz, M. S. S., Carvalho, A. O., de Souza-Filho, G. A., Da Cunha, M., Vasconcelos, I. M., Ferreira, B. dos S. and Gomes, V. M. (2008). Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Peptides* 29, 2090–2100.

Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S. L., Daher, K., Bainton, D. F. and Lehrer, R. I. (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation* 76, 1427–1435.

Gao, a G., Hakimi, S. M., Mittanck, C. a, Wu, Y., Woerner, B. M., Stark, D. M., Shah, D. M., Liang, J. and Rommens, C. M. (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature biotechnology* 18, 1307–10.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. and Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The Proteomics Protocols Handbook*, pp. 571–607. Humana Press, Totowa, NJ.

- Giuliani, A., Pirri, G. and Nicoletto, S. F.** (2007). Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology* 2, 1–33.
- Glaser, T. A., Baatz, J. E., Kreishman, G. P. and Mukkada, A. J.** (1988). pH homeostasis in *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 7602–7606.
- Gonçalves, S., Teixeira, A., Abade, J., De Medeiros, L. N., Kurtenbach, E. and Santos, N. C.** (2012). Evaluation of the membrane lipid selectivity of the pea defensin PsD₁. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1818, 1420–1426.
- Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O. and Terán, L. M.** (2010). Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology* 135, 1–11.
- Guerrero, E., Saugar, J. M., Matsuzaki, K. and Rivas, L.** (2004). Role of positional hydrophobicity in the leishmanicidal activity of magainin 2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 2980–2986.
- Gyurko, C., Lendenmann, U., Troxler, R. F. and Oppenheim, F. G.** (2000). *Candida albicans* mutants deficient in respiration are resistant to the small cationic salivary antimicrobial peptide histatin 5. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 348–354.
- Hayes, B. M. E., Bleackley, M. R., Wiltshire, J. L., Anderson, M. A., Traven, A. and Van Der Weerden, N. L.** (2013). Identification and mechanism of action of the plant defensin NaD₁ as a new member of the antifungal drug arsenal against *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57, 3667–3675.
- Hayes, B. M. E., Bleackley, M. R., Anderson, M. A. and Weerden, N. L. Van Der** (2018). The plant defensin NaD₁ enters the cytoplasm of *Candida albicans* via endocytosis. *Journal of Fungi* 4, 20.
- Huang, G. J., Lai, H. C., Chang, Y. S., Sheu, M. J., Lu, T. L., Huang, S. S. and Lin, Y. H.** (2008). Antimicrobial, dehydroascorbate reductase, and monodehydroascorbate reductase activities of defensin from sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam. “Tainong 57”] storage roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 2989–2995.

- Kant, P., Liu, W. Z. and Pauls, K. P.** (2009). PDC1, a corn defensin peptide expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* inhibits growth of *Fusarium graminearum*. *Peptides* 30, 1593–1599.
- Kanzaki, H., Nirasawa, S., Saitoh, H., Ito, M., Nishihara, M., Terauchi, R. and Nakamura, I.** (2002). Overexpression of the wasabi defensin gene confers enhanced resistance to blast fungus (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice. *Theoretical and Applied Genetics* 105, 809–814.
- Kragh, K. M., Nielsen, J. E., Nielsen, K. K., Dreboldt, S. and Mikkelsen, J. D.** (1995). Characterization and localization of new antifungal cysteine-rich proteins from *Beta vulgaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8, 424–34.
- Kulkarni, M. M., McMaster, W. R., Kamysz, E., Kamysz, W., Engman, D. M. and McGwire, B. S.** (2006). The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Molecular Microbiology* 62, 1484–1497.
- Kushmerick, C., de Souza Castro, M., Santos Cruz, J., Bloch, C. and Beirão, P. S.** (1998). Functional and structural features of gamma-zeathionins, a new class of sodium channel blockers. *FEBS Letters* 440, 302–306.
- Lacerda, A. F., Vasconcelos, E. A. R., Pelegrini, P. B. and Grossi de Sa, M. F.** (2014). Antifungal defensins and their role in plant defense. *Frontiers in Microbiology* 5, 1–10.
- Lambert, J., Keppi, E., Dimarcq, J.-L., Wicker, C., Reichhart, J.-M., Dunbar, B., Lepage, P., Van Dorsselaer, A., Hoffmann, J., Fothergill, J. and Hoffmann, D.** (1989). Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 262–266.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. and Thornton, J. M.** (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* 26, 283–291.
- Lay, F. T. and Anderson, M. A.** (2005). Defensins - Components of the innate immune system in plants. *Current Protein and Peptide Science* 6, 85–101.

- Levy, S. B. and Bonnie, M.** (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 10, S122–S129.
- Li, D. and Li, J.** (2009). Antifungal activity of a recombinant defensin CADEF1 produced by *Escherichia coli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25, 1911–1918.
- Lobo, D. S., Pereira, I. B., Frangel-Madeira, L., Medeiros, L. N., Cabral, L. M., Faria, J., Bellio, M., Campos, R. C., Linden, R. and Kurtenbach, E.** (2007). Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry* 46, 987–996.
- López-Solanilla, E., González-Zorn, B., Novella, S., Vázquez-Boland, J. A. and Rodríguez-Palenzuela, P.** (2003). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* to antimicrobial peptides. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 226, 101–105.
- Lynn, M. A., Kindrachuk, J., Marr, A. K., Jenssen, H., Panté, N., Elliott, M. R., Napper, S., Hancock, R. E. and McMaster, W. R.** (2011). Effect of BMAP-28 antimicrobial peptides on *Leishmania major* promastigote and amastigote growth: role of leishmanolysin in parasite survival. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 5, e1141.
- Mangoni, M. L., Saugar, J. M., Dellisanti, M., Barra, D., Simmaco, M. and Rivas, L.** (2005). Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *Journal of Biological Chemistry* 280, 984–990.
- Marquès, L., Oomen, R. J. F. J., Aumelas, A., Le Jean, M. and Berthomieu, P.** (2009). Production of an *Arabidopsis halleri* foliar defensin in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1640–1648.
- Marr, A. K., McGwire, B. S. and McMaster, W. R.** (2012). Modes of action of leishmanicidal antimicrobial peptides. *Future Microbiology* 7, 1047–1059.
- McGwire, B. S. and Kulkarni, M. M.** (2010). Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Experimental Parasitology* 126, 397–405.
- Mendez, E., Moreno, A., Colilla, F., Pelaez, F., Limas, G. G., Mendez, R., Soriano,**

- F., Salinas, M. and de Haro, C.** (1990). Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, γ -hordothionin, from barley endosperm. *European Journal of Biochemistry* 194, 533–539.
- Mendez, E., Rocher, a, Calero, M., Girbés, T., Citores, L. and Soriano, F.** (1996). Primary structure of ω -hordothionin, a member of a novel family of thionins from barley endosperm, and its inhibition of protein synthesis in eukaryotic and prokaryotic cell-free systems. *European Journal of Biochemistry/FEBS* 239, 67–73.
- Meyer, B., Houlné, G., Pozueta-Romero, J., Schantz, M. L. and Schantz, R.** (1996). Fruit-specific expression of a defensin-type gene family in bell pepper. Upregulation during ripening and upon wounding. *Plant physiology* 112, 615–22.
- Miller, R. N. G., Alves, G. S. C. and Sluys, M. A. VAn** (2017). Plant immunity: unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Annals of Botany* 119, 681–687.
- Mirouze, M., Sels, J., Richard, O., Czernic, P., Loubet, S., Jacquier, A., François, I. E. J. A., Cammue, B. P. A., Lebrun, M., Berthomieu, P. and Marquès, L.** (2006). A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. *Plant Journal* 47, 329–342.
- Mukherjee, S. B., Das, M., Sudhandiran, G. and Shaha, C.** (2002). Increase in cytosolic Ca^{2+} levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Biological Chemistry* 277, 24717–24727.
- Muñoz, A., Chu, M., Marris, P. I., Sagaram, U. S., Kaur, J., Shah, D. M. and Read, N. D.** (2014). Specific domains of plant defensins differentially disrupt colony initiation, cell fusion and calcium homeostasis in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology* 92, 1357–1374.
- Musidlak, O., Nawrot, R. and Goździcka-Józefiak, A.** (2017). Which plant proteins are involved in antiviral defense? Review on in vivo and in vitro activities of selected plant proteins against viruses. *International Journal of Molecular Sciences*

18, 2300.

- Neto, R. L. M., Sousa, L. M. A., Dias, C. S., Filho, J. M. B., Oliveira, M. R. and Figueiredo, R. C. B. Q.** (2011). Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. *Experimental Parasitology* 127, 215–221.
- Nürnbergger, T. and Lipka, V.** (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology* 6, 335–345.
- Odintsova, T. I., Rogozhin, E. A., Baranov, Y., Musolyamov, A. K., Yalpani, N., Egorov, T. A. and Grishin, E. V.** (2008). Seed defensins of barnyard grass *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. *Biochimie* 90, 1667–1673.
- Olivier, M., Atayde, V. D., Isnard, A., Hassani, K. and Shio, M. T.** (2012). *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes and Infection* 14, 1377–1389.
- Osborn, R. W., De Samblanx, G. W., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., Van Leuven, F., Attenborough, S., Rees, S. B. and Broekaert, W. F.** (1995). Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 368, 257–262.
- Parisi, K., Shafee, T., Quimbar, P., van der Weerden, N., Bleackley, M. and Anderson, M.** (2017). The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. *Seminars in cell and developmental biology* (in press), doi: 10.1016/j.semcdb.2018.02.004.
- Park, H. C., Kang, Y. H., Chun, H. J., Koo, J. C., Cheong, Y. H., Kim, C. Y., Kim, M. C., Chung, W. S., Kim, J. C., Yoo, J. H., Koo, Y. D., Koo, S. C., Lim, C. O., Lee, S. Y. and Cho, M. J.** (2002). Characterization of a stamen-specific cDNA encoding a novel plant defensin in *Chinese cabbage*. *Plant molecular biology* 50, 59–69.
- Payne, J. A. E., Bleackley, M. R., Lee, T. H., Shafee, T. M. A., Poon, I. K. H., Hulett, M. D., Aguilar, M. I., Van Der Weerden, N. L. and Anderson, M. A.** (2016). The plant defensin *NaD*₁ introduces membrane disorder through a specific interaction with the lipid, phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate. *Biochimica et Biophysica*

Acta - Biomembranes 1858, 1099–1109.

- Pelegrini, P. B., Lay, F. T., Murad, A. M., Anderson, M. A. and Franco, O. L.** (2008). Novel insights on the mechanism of action of α -amylase inhibitors from the plant defensin family. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 73, 719–729.
- Penninckx, I. A. M. A., Eggermont, K., Terras, F. R. G., Thomma, B. P. H. J., De Samblanx, G. W., Buchala, A., Métraux, J.-P., Manners, J. M. and Broekaert, W. F.** (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *The Plant Cell* 8, 2309–2323.
- Pennisi, E.** (2010). Armed and Dangerous. *Science* 327, 804–805.
- Pérez-Cordero, J. J., Lozano, J. M., Cortés, J. and Delgado, G.** (2011). Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells. *Peptides* 32, 683–690.
- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J.-C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., Pountain, A. W., Mwenechanya, R. and Papadopoulou, B.** (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11, e0006052.
- Poon, I. K. H., Baxter, A. A., Lay, F. T., Mills, G. D., Adda, C. G., Payne, J. A. E., Phan, T. K., Ryan, G. F., White, J. A., Vener, P. K., van der Weerden, N. L., Anderson, M. A., Kvensakul, M. and Hulett, M. D.** (2014). Phosphoinositide-mediated oligomerization of a defensin induces cell lysis. *eLife* 2014, 1–27.
- Ramamoorthy, V., Zhao, X., Snyder, A. K., Xu, J. R. and Shah, D. M.** (2007). Two mitogen-activated protein kinase signalling cascades mediate basal resistance to antifungal plant defensins in *Fusarium graminearum*. *Cellular Microbiology* 9, 1491–1506.
- Reece, S. E., Pollitt, L. C., Colegrave, N. and Gardner, A.** (2011). The meaning of death: evolution and ecology of apoptosis in protozoan parasites. *PLoS Pathogens* 7, 1–9.
- Rodrigues, J. C. F., Godinho, J. L. P. and de Souza, W.** (2014a). Biology of human pathogenic Trypanosomatids: epidemiology, life cycle and ultrastructure. In

Proteins and Proteomica of Leishmania and Trypanosoma, pp. 119–135.

- Rodrigues, I. A., Azevedo, M. M. B., Chaves, F. C. M., Alviano, C. S., Alviano, D. S. and Vermelho, A. B.** (2014b). *Arrabidaea chica* hexanic extract induces mitochondrion damage and peptidase inhibition on *Leishmania* spp. *BioMed Research International* 2014, 985171.
- Romestand, B., Molina, F., Richard, V., Roch, P. and Granier, C.** (2003). Key role of the loop connecting the two beta strands of mussel defensin in its antimicrobial activity. *European Journal of Biochemistry* 270, 2805–2813.
- Sagaram, U. S., Pandurangi, R., Kaur, J., Smith, T. J. and Shah, D. M.** (2011). Structure-activity determinants in antifungal plant defensins *MsDef₁* and *MtDef₄* with different modes of action against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* 6, e18550.
- Sagaram, U. S., El-Mounadi, K., Buchko, G. W., Berg, H. R., Kaur, J., Pandurangi, R. S., Smith, T. J. and Shah, D. M.** (2013). Structural and functional studies of a phosphatidic acid-binding antifungal plant defensin *MtDef₄*: identification of an RGFRRR motif governing fungal cell entry. *PLoS ONE* 8, 1–22.
- Santos, I. S., Carvalho, A. de O., de Souza-Filho, G. A., do Nascimento, V. V, Machado, O. L. T. and Gomes, V. M.** (2010). 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* 71, 8–15.
- Sardar, A. H., Das, S. and Das, P.** (2015). Development of antimicrobial peptide based anti-leishmanial agents: current understandings and future perspective. In *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* (ed. Méndez-Vilas, A.), pp. 137–143. Formatex Research Center.
- Schaaper, W. M. M., Posthuma, G. A., Meloen, R. H., Plasman, H. H., Sijtsma, L., Van Amerongen, A., Fant, F., Borremans, F. A. M., Thevissen, K. and Broekaert, W. F.** (2001). Synthetic peptides derived from the β_2 - β_3 loop of *Raphanus sativus* antifungal protein 2 that mimic the active site. *Journal of Peptide Research* 57, 409–418.

- Scorza, B. M., Carvalho, E. M. and Wilson, M. E.** (2017). Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 1296.
- Shafee, T. M. A., Lay, F. T., Hulett, M. D. and Anderson, M. A.** (2016). The defensins consist of two independent, convergent protein superfamilies. *Molecular Biology and Evolution* 33, 2345–2356.
- Shafee, T. M. A., Lay, F. T., Phan, T. K., Anderson, M. A. and Hulett, M. D.** (2017). Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74, 663–682.
- Silva-Almeida, M., Pereira, B. A. S., Ribeiro-Guimarães, M. L. and Alves, C. R.** (2012). Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasites and Vectors* 5, 1–10.
- Singh, N., Kumar, M. and Singh, R. K.** (2012). Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 5, 485–497.
- Soares, J. R., de Melo, E. J. T., da Cunha, M., Fernandes, K. V. S., Taveira, G. B., da Silva Pereira, L., Pimenta, S., Trindade, F. G., Regente, M., Pinedo, M., de la Canal, L., Gomes, V. M. and Carvalho, A. de O.** (2017). Interaction between the plant ApDef₁ defensin and *Saccharomyces cerevisiae* results in yeast death through a cell cycle- and caspase-dependent process occurring via uncontrolled oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1861, 3429–3443.
- Solis, J., Medrano, G. and Ghislain, M.** (2007). Inhibitory effect of a defensin gene from the Andean crop maca (*Lepidium meyenii*) against *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology* 164, 1071–1082.
- Song, X., Zhang, M., Zhou, Z. and Gong, W.** (2011). Ultra-high resolution crystal structure of a dimeric defensin SPE10. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 585, 300–306.
- Souza, G. S., do Nascimento, V. V., de Carvalho, L. P., de Melo, E. J. T., Fernandes, K. V., Machado, O. L. T., Retamal, C. A., Gomes, V. M. and Carvalho, A. de O.** (2013). Activity of recombinant and natural defensins from *Vigna unguiculata*

seeds against *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology* 135, 116–125.

- Souza, G. S., Carvalho, L. P., Melo, E. J. T., Gomes, V. M. and Carvalho, A. de O.** (2018). The toxic effect of Vu-Defr, a defensin from *Vigna unguiculata* seeds, on *Leishmania amazonensis* is associated with reactive oxygen species production, mitochondrial dysfunction and plasma membrane perturbation. *Canadian Journal of Microbiology* 1–24.
- Spelbrink, R. G.** (2004). Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. *Plant Physiology* 135, 2055–2067.
- Stotz, H. U., Spence, B. and Wang, Y.** (2009). A defensin from tomato with dual function in defense and development. *Plant Molecular Biology* 71, 131–143.
- Tam, J. P., Wang, S., Wong, K. H. and Tan, W. L.** (2015). Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals* 8, 711–757.
- Terras, F. R., Goderis, I. J., Van Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. and Broekaert, W. F.** (1992). In vitro antifungal activity of a radish (*Raphanus sativus* L.) seed protein homologous to nonspecific lipid transfer proteins. *Plant physiology* 100, 1055–1058.
- Terras, F. R. G., Torrekens, S., Van Leuven, F., Osborn, R. W., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A. and Broekaert, W. F.** (1993). A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Letters* 316, 233–240.
- Terras, F. R. G., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V, Osborn, R. W., Kester, A., Rees, S. B., Torrekens, S., Van Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A. and Broekaert, W. F.** (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *The Plant Cell Online* 7, 573–588.
- Thevissen, K., Ghazi, a, De Samblanx, G. W., Brownlee, C., Osborn, R. W. and Broekaert, W. F.** (1996). Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 15018–15025.
- Thevissen, K., Terras, F. R. and Broekaert, W. F.** (1999). Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5451–8.

- Thevissen, K., Osborn, R. W., Acland, D. P. and Broekaert, W. F.** (2000). Specific binding sites for an antifungal plant defensin from Dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 13, 54–61.
- Thevissen, K., François, I. E. J., Takemoto, J. Y., Ferket, K. K., Meert, E. M. and Cammue, B. P.** (2003a). DmAMP₁, an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*), interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 226, 169–173.
- Thevissen, K., Ferket, K. K. A., François, I. E. J. A. and Cammue, B. P. A.** (2003b). Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides* 24, 1705–1712.
- Thevissen, K., Warnecke, D. C., François, I. E. J. A., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., Zähringer, U., Thomma, B. P. H. J., Ferket, K. K. A. and Cammue, B. P. A.** (2004). Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry* 279, 3900–3905.
- Thomma, B. P. H. J., Cammue, B. P. A. and Thevissen, K.** (2002). Plant defensins. *Planta* 216, 193–202.
- Torrent, M., Pulido, D., Rivas, L. and Andreu, D.** (2012). Antimicrobial peptide action on parasites. *Current Drug Targets* 13, 1138–1147.
- Uchôa, H. B., Jorge, G. E., Freitas Da Silveira, N. J., Camera, J. C., Canduri, F. and De Azevedo, W. F.** (2004). Parmodel: A web server for automated comparative modeling of proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325, 1481–1486.
- van der Weerden, N. L. and Anderson, M. A.** (2013). Plant defensins: common fold, multiple functions. *Fungal Biology Reviews* 26, 121–131.
- van der Weerden, N. L., Lay, F. T. and Anderson, M. A.** (2008). The plant defensin, NaD₁, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae. *Journal of Biological Chemistry* 283, 14445–14452.
- van der Weerden, N. L., Hancock, R. E. W. and Anderson, M. A.** (2010).

- Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD₁ occurs through a cell wall-dependent process. *Journal of Biological Chemistry* 285, 37513–37520.
- van Loon, L. C.** (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103, 753–765.
- Van Loon, L. C. and Van Strien, E. A.** (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55, 85–97.
- Vieira, M. E. B., Vasconcelos, I. M., Machado, O. L. T., Gomes, V. M. and Carvalho, A. de O.** (2015). Isolation, characterization and mechanism of action of an antimicrobial peptide from *Lecythis pisonis* seeds with inhibitory activity against *Candida albicans*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 47, 716–729.
- Vriens, K., Cammue, B. P. a and Thevissen, K.** (2014). Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. *Molecules* 19, 12280–12303.
- Wijaya, R., Neumann, G. M., Condrón, R., Hughes, A. B. and Polya, G. M.** (2000). Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Science* 159, 243–255.
- Wilmes, M., Cammue, B. P. A., Sahl, H.-G. and Thevissen, K.** (2011). Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation. *Natural Product Reports* 28, 1350.
- Wong, J. H. and Ng, T. B.** (2003). Gymnin, a potent defensin-like antifungal peptide from the Yunnan bean (*Gymnocladus chinensis* Baill). *Peptides* 24, 963–968. doi: 10.1016/S0196-9781(03)00192-X.
- Wong, J. H. and Ng, T. B.** (2005a). Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. *Peptides* 26, 1120–1126.
- Wong, J. H. and Ng, T. B.** (2005b). Vulgarinin, a broad-spectrum antifungal peptide from haricot beans (*Phaseolus vulgaris*). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37, 1626–1632.
- Wong, J. H., Zhang, X. Q., Wang, H. X. and Ng, T. B.** (2006). A mitogenic defensin from white cloud beans (*Phaseolus vulgaris*). *Peptides* 27, 2075–2081.

- Ye, X. Y. and Ng, T. B.** (2001). peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to cowpea 10-kDa protein precursor exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptase-inhibitory activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285, 424–429.
- Yount, N. Y. and Yeaman, M. R.** (2004). Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 7363–7368.
- Yu, X., Feng, B., He, P. and Shan, L.** (2017). From chaos to harmony: responses and signaling upon microbial pattern recognition. *Annual Review of Phytopathology* 55, 109–37.