

ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E MECANISMO DE AÇÃO DO  
PEPTÍDEO SINTÉTICO DESENHADO D-A<sub>36,42,44</sub>R<sub>37,38</sub>γ<sub>32-46</sub>VuDef SOBRE  
LEVEDURAS PATOGÊNICAS E TOXICIDADE SOBRE CÉLULAS DE  
MAMÍFEROS

**DOUGLAS RIBEIRO LUCAS**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO - UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO/2021

ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E MECANISMO DE AÇÃO DO  
PEPTÍDEO SINTÉTICO DESENHADO D-A<sub>36,42,44</sub>R<sub>37,38γ32-46</sub>VuDef SOBRE  
LEVEDURAS PATOGÊNICAS E TOXICIDADE SOBRE CÉLULAS DE  
MAMÍFEROS

**DOUGLAS RIBEIRO LUCAS**

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

Orientador: Prof. Dr. 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  
2021

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

L933

Lucas, Douglas Ribeiro.

ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E MECANISMO DE AÇÃO DO PEPTÍDEO SINTÉTICO DESENHADO D-A<sub>36,42,44</sub>R<sub>37,38</sub>V<sub>32-46</sub>Def SOBRE LEVEDURAS PATOGENICAS E TOXICIDADE SOBRE CÉLULAS DE MAMÍFEROS. / Douglas Ribeiro Lucas. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

81 f. : il.

Bibliografia: 71 - 81.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2021.

Orientador: Andre de Oliveira Carvalho.

1. Atividade antifúngica. 2. Toxicidade. 3. AMPs. 4. Mecanismo de ação. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

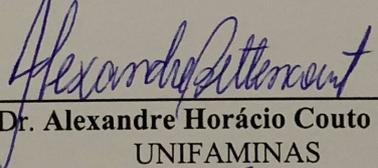
CDD - 570

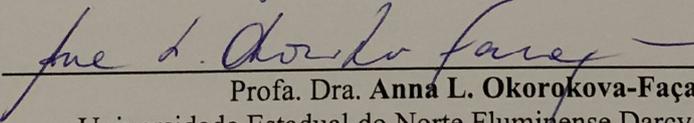
ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E MECANISMO DE AÇÃO DO PEPTÍDEO  
SINTÉTICO DESENHADO D-A<sub>36,42,44</sub>R<sub>37,38,32-46</sub>VuDef SOBRE LEVEDURAS  
PATOGENICAS E TOXICIDADE SOBRE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

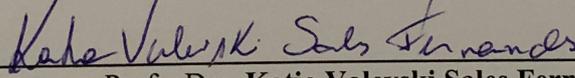
**DOUGLAS RIBEIRO LUCAS**

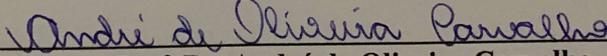
Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biociências, da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Biociências e  
Biotecnologia.

APROVADO EM: 26/02/2021

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. **Alexandre Horácio Couto Bittencourt**  
UNIFAMINAS

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. **Anna L. Okorokova-Façanha**  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. **Katia Valevski Sales Fernandes**  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. **André de Oliveira Carvalho**  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF (orientador)

DEDICO...

Ao meu pai Gilmar, minha mãe Maria Aparecida e meu irmão Gustavo Henrique  
por todo apoio sempre.

## AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar por me dar forças para seguir adiante mesmo nas horas mais difíceis; por tomar conta de mim nas estradas, e pernoites nas rodoviárias ao longo do Mestrado.

Ao meu orientador prof. André de Oliveira Carvalho, por todos os ensinamentos, incentivos, amizade e acima de tudo assistência em todas as dúvidas ao longo do curso.

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

A Dra. Camilla Ribeiro Alexandrino por revisar minha dissertação.

A Dra. Elena Lassounskaia e ao seu grupo pela colaboração com ensaio de toxicidade.

A todos os professores e funcionários do PGBB pelas ajudas e ensinamentos, em especial Dra. Anna Okorokova, Dr. Gabriel Bonan Taveira, Dr. Antônio Cogo, com quem tive maior proximidade.

A todos amigos do grupo “VAL-ANDRÉ”, pelas dicas, amizade, e brincadeiras, em especial para meu grande amigo Rodrigo Gebara e minha amiga Estefany Toledo por todos os ensinamentos, principalmente, no início da minha rotina no laboratório.

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

A meus amigos/irmãos da graduação para a vida Filipe Zaniratti (Príncipe) e Leismarque Jr. (Pequeno), e meu amigo irmão de infância Valber Augusto (Vacão) por toda ajuda, força e incentivo, ao longo de todos os anos.

A um grande professor da graduação Dr. Braz Antônio Pereira Cosenza, que graças a sua luta pela estadualização da UEMG-Unidade Carangola MG, pude realizar minha graduação em Ciências Biológicas, e ao professor Dr. Alexandre Bittencourt por ter me incentivado a continuar minha carreira acadêmica me indicando a UENF para realização do Mestrado.

A toda minha família pela força, incentivo e por acreditar em mim, em principal minha namorada Selmara Marcelino pela paciência, sempre me incentivando a dar o meu melhor.

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

Ao CNPq, Capes e a Faperj, pelo apoio financeiro;

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

*“Vocês jovens, doutores, cientistas do futuro não se deixem abalar por um ceticismo estéril, nem se deixem desencorajar pela tristeza de certas horas que as nações passam!”.*

***Louis Pasteur***

## RESUMO

As defensinas de plantas são promissoras moléculas candidatas a novos fármacos para tratar infecções fúngicas, especialmente as causadas por fungos resistentes. Nosso grupo explorou uma defensina de plantas de sementes de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda), chamada de  $VuDef_1$ .  $VuDef_1$  e um peptídeo sintetizado, chamado DD, contendo seu  $\gamma$ -core, elemento estrutural responsável pela atividade biológica das defensinas, têm atividade inibitória sobre *Leishmania amazonenses*. Devido a forte atividade de DD sobre o protozoário, testamos sua atividade inibitória sobre leveduras, no entanto, DD foi inativo sobre elas. A inatividade de DD sobre as leveduras nos levou a melhorar sua atividade inibitória, desenhando novos peptídeos com alterações em seus parâmetros bioquímicos por meio de substituições de aminoácidos. Um destes peptídeos foi chamado de D-RR que tinha as seguintes diferenças em relação ao DD: troca de dois ácidos aspárticos (Asp) nas posições 37 e 38 por duas argininas (Arg), aumentando sua carga líquida de +2 para +6 e sua hidrofobicidade foi aumentada de +21.98 para +18.32 kcal/mol, e também tinham seus aminoácidos como D-enantiômeros. O objetivo deste trabalho foi testar a atividade inibitória de D-RR sobre leveduras, confrontar a inibição de D-RR com o fármaco de referência fluconazol e avaliar os mecanismos que estão envolvidos na inibição das leveduras. Foram feitos ensaios antimicrobianos com seis espécies de leveduras. Para as leveduras mais sensíveis foram feitas a determinação da mínima concentração inibitória ( $MIC_{100}$ ) e da dose letal ( $DL_{100}$ ). As  $DL_{100}$  determinadas para as leveduras mais sensíveis foram confrontadas com o fluconazol e também foi testada com estas concentrações a toxicidade sobre células de mamíferos (macrófagos murinos e monócitos humanos) pelo ensaio do MTT. Foi também determinado o tempo que D-RR leva para matar toda a população de células do ensaio original para a levedura mais sensível. Com os parâmetros de  $DL_{100}$  e tempo de morte, foram feitos estudos do mecanismo de ação, sendo estudado a permeabilização de membranas, indução de espécies reativas de oxigênio e atividade mitocondrial para a levedura mais sensível por ensaios de microscopia de fluorescência. Nossos resultados mostraram que as modificações realizadas para melhorar a atividade antimicrobiana foram eficientes, pois com estas alterações D-RR mostrou uma melhora na sua atividade antifúngica e também apresentou um efeito fungicida com 3 h de incubação, quando comparada com o peptídeo original DD. Confrontado com o fluconazol nas mesmas concentrações utilizadas para *C. tropicalis* mostrou efeito fungicida. Na  $DL_{100}$  para *C. tropicalis* D-RR apresentou baixa toxicidade para células de mamíferos. Em relação aos mecanismos que levam a morte de *C. tropicalis*, D-RR induziu a produção de espécies reativas de oxigênio, permeabilização da membrana, e não causou a perda

da funcionalidade mitocondrial em um tempo de 3 h no qual ocorre a morte da levedura. Nossos resultados podem vir a contribuir para os esforços futuros com o objetivo de empregar este peptídeo sintético derivado de planta como nova alternativa diante aos antifúngicos convencionais.

**Palavras-chave:** Atividade antifúngica. Toxicidade. AMPs. Mecanismo de ação.

## ABSTRACT

Plant defensins are promising molecules that are candidates for new drugs to treat fungal infections, especially those caused by resistant fungi. Our group explored a plant defensin from seeds of *Vigna unguiculata* (cowpea), called *VuDef*<sub>1</sub>. *VuDef*<sub>1</sub> and a synthesized peptide, called DD, containing its  $\gamma$ -core, structural element responsible for the biological activity of defensins, have inhibitory activity on *Leishmania amazonenses*. Due to the strong activity of DD on the protozoan, we tested its inhibitory activity on yeasts, however, DD was inactive on them. DD inactivity on yeasts led us to improve its inhibitory activity, designing new peptides with changes in their biochemical parameters through amino acid substitutions. One of these peptides was called D-RR which had the following differences in relation to DD: exchange of two aspartic acids (Asp) in positions 37 and 38 for two arginines (Arg), increasing its net charge from +2 to +6 and their hydrophobicity was increased from +21.98 to +18.32 kcal/mol, and they also had their amino acids as D-enantiomers. The objective of this work was to test the inhibitory activity of D-RR on yeasts, to confront the inhibition of yeasts by D-RR with the reference drug fluconazole and to evaluate the mechanisms that are involved in the yeast inhibition. Antimicrobial tests were carried out with six yeast species. For the most sensitive yeasts, the minimum inhibitory concentration (MIC<sub>100</sub>) and the lethal dose (DL<sub>100</sub>) were determined. At the DL<sub>100</sub> determined for D-RR for the most sensitive yeasts were both to confront with fluconazole activity and to evaluate the toxicity on mammalian cells (murine macrophages and human monocytes) by the MTT assay. The time required for D-RR to kill the entire cell population of the original assay for the most sensitive yeast was also determined. With the parameters of DL<sub>100</sub> and time of death, studies of the mechanism of action were carried out, studying membrane permeabilization, induction of reactive oxygen species and mitochondrial functionality for the most sensitive yeast by fluorescence microscopy assays. Our results showed that the modifications made to improve the antimicrobial activity were efficient, because with these changes D-RR showed an improvement in its antifungal activity and also presented a fungicidal effect with 3 h of incubation, when compared with the original peptide DD. Compared to fluconazole in the same concentrations used for *C. tropicalis*, it showed a fungicidal effect. DL<sub>100</sub> for *C. tropicalis* D-RR showed low toxicity for mammalian cells. In relation to the mechanisms that lead to *C. tropicalis* death, D-RR induced the production of reactive oxygen species, permeabilization of the membrane, and did not cause the loss of mitochondrial functionality in a time of 3 h at which the death of the yeast occurs. Our results

may contribute to future efforts to use this synthetic plant-derived peptide as a new alternative to conventional antifungals.

**Keywords:** Antifungal activity. Toxicity. AMPs. Mechanism of action.

## LISTA DE FIGURAS

## FIGURAS

- Figura 1 -** Representação esquemática das estruturas químicas das principais 16 classes de drogas usadas para o tratamento de doenças fúngicas.
- Figura 2 -** Visão geral das principais classes estruturais de peptídeos 18 antimicrobianos.
- Figura 3 -** A distribuição do tipo de atividades biológicas no conjunto de dados 19 gerais de AMPs e nos dados de patentes descritos no site *Data Repository of Antimicrobial Peptides (DRAMP)*.
- Figura 4 -** Representação esquemática de estruturas tridimensionais selecionadas 21 de diferentes famílias de peptídeos antimicrobianos de plantas
- Figura 5 -** Organização estrutural das *cis*-defensina e *trans*-defensina. 22
- Figura 6 -** Representação esquemática das estruturas terciária e primária da 23 defensina *NaD*<sub>1</sub> de *Nicotiana glauca*.
- Figura 7 -** Representação esquemática das estruturas primárias e terciárias de 25 defensinas.
- Figura 8 -** Representação esquemática dos mecanismos de ação das defensinas 27 *DmAMP*<sub>1</sub> e *RsAFP*<sub>2</sub> em células fúngicas.
- Figura 9 -** Representação esquemática dos mecanismos de ação de *PsD*<sub>1</sub>, *MsDef*<sub>1</sub> 28 e *MtDef*<sub>4</sub> em células fúngicas.
- Figura 10 -** Representação esquemática dos mecanismos de ação de *NaD*<sub>1</sub> em 29 células fúngicas.
- Figura 11 -** Crescimento das leveduras na ausência (controle) e na presença do 32 peptídeo sintético DD na concentração de 18,5 µM.
- Figura 12 -** Crescimento das leveduras na ausência (controle) e na presença do 42 peptídeo sintético D-RR na concentração de 18,5 µM.
- Figura 13 -** Imagens do fundo dos poços ao final do ensaio de 24 h para 43 determinação da mínima concentração inibitória das leveduras diante do peptídeo sintético D-RR.
- Figura 14 -** Imagens das placas de Petri mostrando as colônias de leveduras após 24 45 h de tratamento com D-RR.
- Figura 15 -** Imagens das placas de Petri mostrando as colônias de leveduras após 24 46 h de tratamento com D-RR na sua *DL*<sub>100</sub>.

- Figura 16 -** Cinética de morte celular de *Candida tropicalis* incubada com D-RR. 47
- Figura 17 -** Imagens de microscopia das células de *Candida tropicalis* incubadas por 1 e 3 h na ausência (controle) e na presença de 23  $\mu$ M do peptídeo D-RR. 49
- Figura 18 -** Permeabilização de membrana de células de *Candida tropicalis* induzida por D-RR. 51
- Figura 19 -** Estresse oxidativo em células de *Candida tropicalis* induzido por D-RR. 54
- Figura 20 -** Imagens das placas de Petri mostrando as colônias de leveduras após de tratamento com D-RR na presença de 70 mM do antioxidante ácido ascórbico por 3 h. 55
- Figura 21 -** Funcionalidade mitocondrial em células de *Candida tropicalis* induzido por D-RR. 57
- Figura 22 -** Viabilidade de células RAW 264.7 e THP-1 em resposta a peptídeo sintético D-RR. 59

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AMPs	Peptídeos antimicrobianos (do inglês <i>antimicrobial peptides</i> )
ATCC	Do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
CWI	Via de integridade de parede celular (do inglês <i>cell wall integrity</i> )
D	Conformação dextrogira (D-enantiômeros)
dAMPs	Peptídeos antimicrobianos projetados (do inglês <i>designed AMPs</i> )
DD	Peptídeo sintético A <sub>36,42,44</sub> γ <sub>32-46</sub> Vu-Def
D-RR	Peptídeo sintético D-A <sub>36,42,44</sub> R <sub>37,38</sub> γ <sub>32-46</sub> Vu-Def
DL <sub>100</sub>	Dose letal
DIC	Contraste interferencial diferencial (do inglês <i>differential interference contrast</i> )
DMSO	Dimetil sulfoxido
DO	Densidade óptica
DRAMP	Do inglês <i>Data Repository of Antimicrobial Peptides</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês <i>fluorescein isothiocyanate</i> )
GAFFI	Fundo de Ação Global para Infecções Fúngicas (do inglês <i>Global Action Fund for Fungal Infections</i> )
GlcCer	Glucosilceramida
H <sub>2</sub> DCFDA	2', 7' diacetato diclorofluoresceína
HOG	Via de alta osmolaridade/glicerol (do inglês <i>high osmolarity/glycerol</i> )
HU	Hidroxiureia
LTPs	Proteínas transportadoras de lipídeos (do Inglês <i>lipid transfer proteins</i> )
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos (do inglês <i>mitogen activated protein kinase</i> )
MIC <sub>100</sub>	Mínima concentração inibitória (do inglês <i>minimal inhibitory concentration</i> )
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio
NO	Óxido nítrico (do inglês <i>nitric oxide</i> )
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i> )
UFC	Unidade formadora de colônias
UTI	Unidade de tratamento intensivo

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>V</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>XIV</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 <i>Candida spp.</i> e saúde pública .....	15
1.2 Peptídeos antimicrobianos .....	17
1.3 Defensinas de plantas.....	20
1.4 Mecanismos de ação sobre a inibição de microrganismos .....	26
1.5 AMPs e desenvolvimento de novas drogas .....	29
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
2.1 Objetivo geral .....	33
2.2 Objetivos específicos .....	33
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
3.1 Materiais biológicos.....	34
3.1.1 Peptídeo sintético D-A <sub>36,42,44</sub> R <sub>37,38γ</sub> 32-46Vu-Def.....	34
3.1.2 Microrganismos .....	34
3.2 Ensaio de inibição da cultura de leveduras .....	34
3.3 Determinação da mínima concentração inibitória de D-RR sobre leveduras .....	35
3.4 Ensaio da viabilidade celular, determinação da dose letal (DL <sub>100</sub> ) sobre leveduras tratadas com D-RR e teste com fluconazol.....	36
3.5 Estudo da cinética de morte celular induzida por D-RR em <i>C. tropicalis</i> .....	37
3.6 Análise por microscopia óptica de células <i>C. tropicalis</i> incubadas com D-RR .....	37
3.7 Estudo do efeito do peptídeo sintético D-RR sobre a permeabilização de membranas de <i>C. tropicalis</i> .....	38
3.8 Ensaio da determinação da indução de Espécies Reativas de Oxigênio intracelular em <i>C. tropicalis</i> .....	39
3.9 Análise da funcionalidade mitocondrial das de <i>C. tropicalis</i> tratadas com D-RR ...	40
3.10 Ensaio de viabilidade celular de células de mamíferos diante do peptídeo sintético D-RR. 40	
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
4.1 Inibição do crescimento de leveduras pelo peptídeo sintético D-RR. ....	42
4.2 Mínima concentração inibitória de D-RR de diante das células de <i>C. tropicalis</i> .....	43

4.3	Efeito de D-RR sobre a viabilidade celular de <i>C. tropicalis</i> , determinação da (DL <sub>100</sub> ) e teste com fluconazol.....	43
4.4	Cinética de morte celular induzida por D-RR em <i>C. tropicalis</i> .....	46
4.5	Diferenças citoplasmáticas em células de <i>C. tropicalis</i> incubadas com D-RR .....	48
4.6	Efeito do peptídeo sintético D-RR na permeabilização de membranas de <i>C. tropicalis</i> .....	49
4.7	Efeito do peptídeo sintético D-RR na produção endógena de ROS em <i>C. tropicalis</i> .....	52
4.8	Efeito do peptídeo sintético na funcionalidade mitocondrial de <i>C. tropicalis</i> .....	56
4.9	Viabilidade celular de células de mamíferos macrófagos murinos e monócitos humanos em frente de D-RR.....	58
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>69</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>70</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Candida spp.* e saúde pública

As leveduras do gênero *Candida* são patógenos oportunistas que fazem parte da microflora humana, são comensais e sua proliferação é controlada pelo sistema imunológico do hospedeiro. Sob condições de supressão imunológica ou qualquer interrupção na fisiologia do hospedeiro, podem rapidamente fazer a transição para um patógeno, onde tem a capacidade de formar biofilmes e conseqüentemente causar uma variedade de infecções (TSUI *et al.*, 2016). Quando geram alguma patogenicidade, essas espécies podem causar infecções localizadas (na cavidade oral, na pele) ou sistêmicas (inflamações) como, septicemias e meningite, causadas principalmente pela espécie *C. albicans* (LEVY, 2004). As espécies de leveduras do gênero *Candida* mais importantes do ponto de vista clínico e epidemiológico são as *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (ABI-SAID *et al.*, 1997).

As espécies do gênero *Candida* caracterizam o agente etiológico mais recorrente de infecções fúngicas que põem em risco a vida de pacientes que estão imunocomprometidos, assim como os que foram submetidos a procedimentos clínicos invasivos ou pacientes politraumatizados que precisam de estadias prolongadas em unidade de tratamento intensivo (UTI). Doenças causadas por leveduras do gênero *Candida* tem aumentado nos últimos anos em várias partes do mundo (DE FRANCESCO *et al.*, 2017; DOI *et al.*, 2016; FISHER *et al.*, 2018; FU *et al.*, 2017; TUKENMEZ *et al.*, 2017). A candidemia é a quinta principal causa de infecção da corrente sanguínea em pacientes em UTI, e a terceira em UTIs neonatais causando cerca de 20-34% de mortalidade (FU *et al.*, 2017). Em decorrência disso é uma fonte significativa de mortalidade, morbidade e provavelmente altos custos associados aos cuidados em UTI, em todo o mundo (FU *et al.*, 2017; TUKENMEZ *et al.*, 2017). O Fundo de Ação Global para Infecções Fúngicas (GAFFI, do inglês *Global Action Fund for Fungal Infections*) estima que doenças fúngicas causem em torno de 2 milhões de mortes por ano mundialmente<sup>1</sup>.

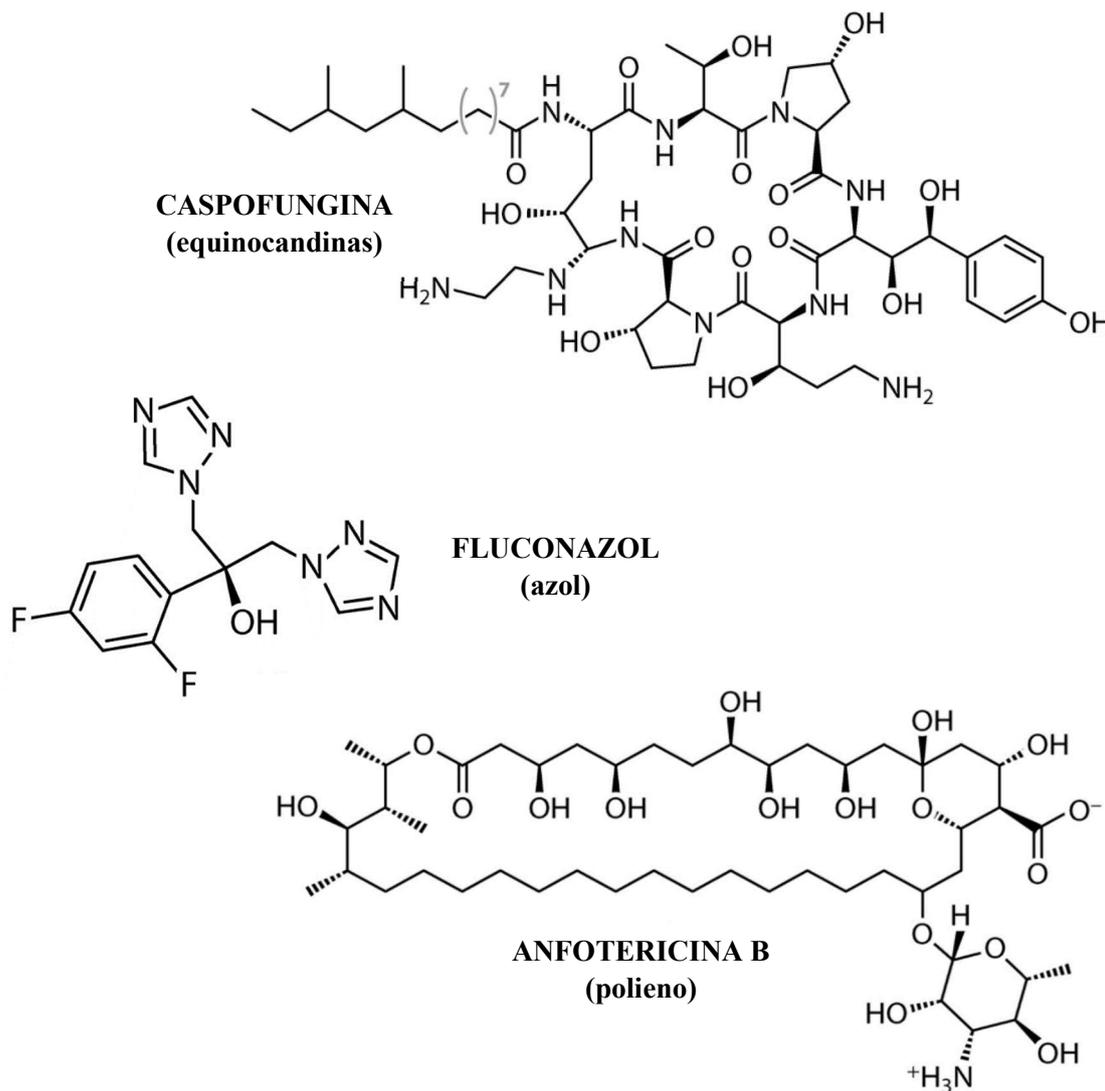
Os principais fármacos usados para o tratamento de doenças fúngicas são os azóis (fluconazol), os polienos (anfotericina B) e as equinocandinas (caspofungina) (ROBBINS *et al.*, 2017) (Figura 1). As classes agem de forma diferentes, com mecanismos de ações distintos: As moléculas de polieno tem espectro de atividade fungicida e se ligam ao ergosterol na membrana fúngica, inserindo-se nas bicamadas lipídicas, criando poros que rompem a membrana plasmática e causando danos oxidativo. As equinocandinas também são fungicidas

---

<sup>1</sup> Fonte: <https://www.gaffi.org/why/fungi-fungal-infections/>

e inibem a  $\beta$ -(1,3) *glucano sintase*, diminuindo a produção de  $\beta$ -(1,3)glucano, que representa um dos principais componentes da parede celular do fungo. Já os azóis tem efeito fungistático e inibem a *14 $\alpha$ -lanosterol demetilase* do citocromo P450 fúngico e causa o acúmulo de intermediários metilados tóxicos, com a interrupção resultante da função da membrana da célula fúngica e inibem seu crescimento (COSTA-DE-OLIVEIRA E RODRIGUES, 2020).

**Figura 1:** Representação esquemática das estruturas químicas das principais classes de drogas usadas para o tratamento de doenças fúngicas (Adaptado de ROBBINS *et al.*, 2017, com modificações).



Apesar das substâncias descritas acima, o aumento crescente de fungos patogênicos que são resistentes ao número limitado de agentes antifúngicos habitualmente usados é sem precedentes (DE FRANCESCO *et al.*, 2017). Diante disso diversos mecanismos como formação de biofilmes, que diminuem a acessibilidade do antifúngico, seleção de mutações espontâneas que aumentam a expressão do alvo, ou que diminuem a suscetibilidade do alvo, alterações cromossômicas anormais, superexpressão de bombas de efluxo de múltiplas drogas

e a capacidade de escapar das defesas imunológicas do hospedeiro são alguns dos fatores que podem contribuir para a tolerância e resistência antifúngica (COSTA-DE-OLIVEIRA E RODRIGUES, 2020).

DE FRANCESCO *et al.* (2017) alertam à alta resistência aos antifúngicos mais utilizados de forma sistemática e local que são os azóis, incluindo o aumento da resistência ao fluconazol. Por exemplo, trabalhos diferentes mostraram que a taxa de resistência ao fluconazol varia de 2,5 a 9% em *Candida spp.* isoladas do sangue (DE FRANCESCO *et al.*, 2017). Adicionalmente, o mundo tem visto o surgimento de outras leveduras patogênicas como *C. auris*, um patógeno resistente a multidrogas que tem causado sérias infecções em várias partes do mundo (FORSBERG *et al.*, 2019). Deste modo, patógenos fúngicos oportunistas que adquiriram resistência a às classes de antimicrobianos impõem um risco enorme para a assistência à saúde humana. Para tentar amenizar esse problema global em nossa capacidade de controlar infecções por fungos e evitar falhas em protocolos de tratamentos, precisamos nos conscientizar sobre o uso adequado de produtos antimicrobianos e antifúngicos, promover novas descobertas de substâncias antifúngicas e incentivar tecnologias inovadoras para soluções alternativas (FISHER *et al.*, 2018).

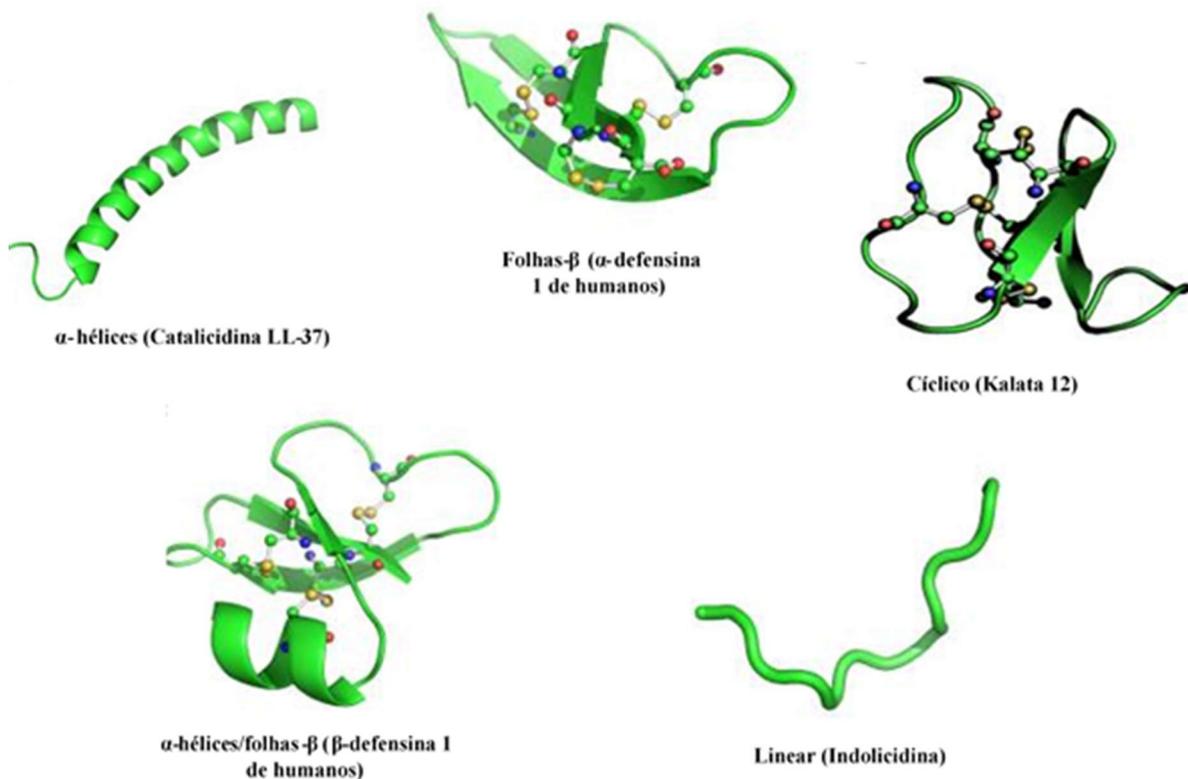
Diante disso, LEI *et al.* (2019) discutem a importância de se descobrir novos antibióticos ou moléculas com capacidade de inibir o crescimento desses microrganismos. Neste sentido, chamando a atenção cada vez maior dos cientistas de todo mundo em pesquisas relacionadas a essa área, estão os peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*).

## 1.2 Peptídeos antimicrobianos

AMPs são moléculas atuantes do sistema imunológico, encontrados em diversos organismos, e com atividade inibitória sobre vários microrganismos tais como: bactérias, fungos filamentosos, leveduras e protozoários. Além disso, geralmente apresentam baixa, ou nenhuma toxicidade para células de animais (HOSKIN E RAMAMOORTHY, 2008; IZADPANAH E GALLO, 2005). Os AMPs são codificados por genes, formando peptídeos de L-aminoácidos sintetizados nos ribossomos, em uma configuração linear ou cíclica, geralmente com menos de 100 resíduos de aminoácidos. Possuem uma ampla variação em relação a sequência, estrutura e conformação. São ricos em resíduos de cisteína o que permite a formação de pontes dissulfeto que favorece uma maior estabilidade, resistência a degradações em altas temperatura, extremos de pH e ações proteolíticas (HEGEDUS; MARX, 2013; ROSCIA *et al.*,

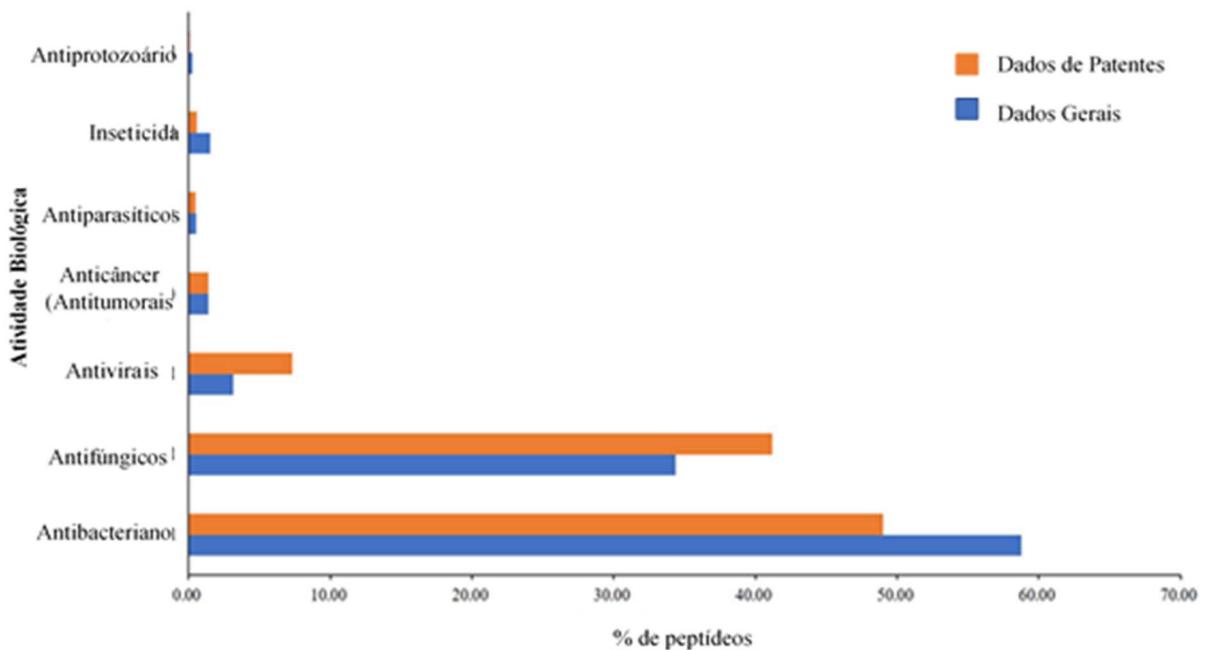
2013; SILVA E MACHADO, 2012).

Essas moléculas apresentam uma estrutura tridimensional altamente variável, dentre elas estão as  $\alpha$ -hélices como, magainina (AMP da pele do sapo *Xenopus laevis*), cecropina (AMP da hemolinfa de insetos) e catelicidina (AMPs de mamíferos), folhas  $\beta$  ( $\alpha$ -defensina 1 de humanos) uma combinação de  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$  ( $\beta$ -defensina 1 de humanos e defensinas de plantas) e podem ainda apresentar configuração cíclica (ciclotídeos), estrutura linear ou de *loops* flexíveis (indolicidinas, AMPs de neutrófilos bovinos) (Figura 2) (SILVA *et al.*, 2011). A maioria dos AMPs são moléculas catiônicas, e a presença de aminoácidos, como argininas e lisinas, confere a eles uma carga positiva em pH fisiológico. Outra característica importante em alguns AMPs é a presença de um grande número de resíduos de cisteínas (4, 6 ou 8), que se conectam aos pares formando pontes dissulfeto, as quais conferem a estes peptídeos uma alta estabilidade a condições físico-químicas extremas, como relatado acima (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2010; BROEKAERT *et al.*, 1997; SHABIR *et al.*, 2018).



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

Com o passar dos anos um grande número de AMPs foram sendo descobertos e estudados. Atualmente, já foram isolados e identificados cerca de 5.823 AMPs, AMPs naturais e sintéticos, e depositadas mais de 14.739 patentes de AMPs e 76 AMPs encontram-se em fase de testes para o desenvolvimento de drogas (estágio pré-clínico ou clínico) segundo o *Data Repository of Antimicrobial Peptides*<sup>2</sup> (DRAMP) (KANG *et al.*, 2019). Sendo estes apresentando diversas atividades biológicas demonstradas na figura 3. O site DRAMP, criado e atualizado por KANG *et al.* (2019), é um banco de dados de acesso aberto e com curadoria manual que abriga diversas anotações de AMPs, incluindo estruturas primárias e terciárias, atividades, características físico-químicas, patentes, informações clínicas e de referência. O conjunto de dados clínicos também inclui informações sobre a fase de ensaio clínico e aplicações terapêuticas (FAN L. *et al.*; 2016; KANG *et al.*, 2019, LIU S. *et al.*, 2017, 2018).



**Figura 3:** A distribuição do tipo de atividades biológicas no conjunto de dados gerais de AMPs e nos dados de patentes descritos no site *Data Repository of Antimicrobial Peptides* (DRAMP) (Adaptado de KANG *et al.*, 2019, com modificações).

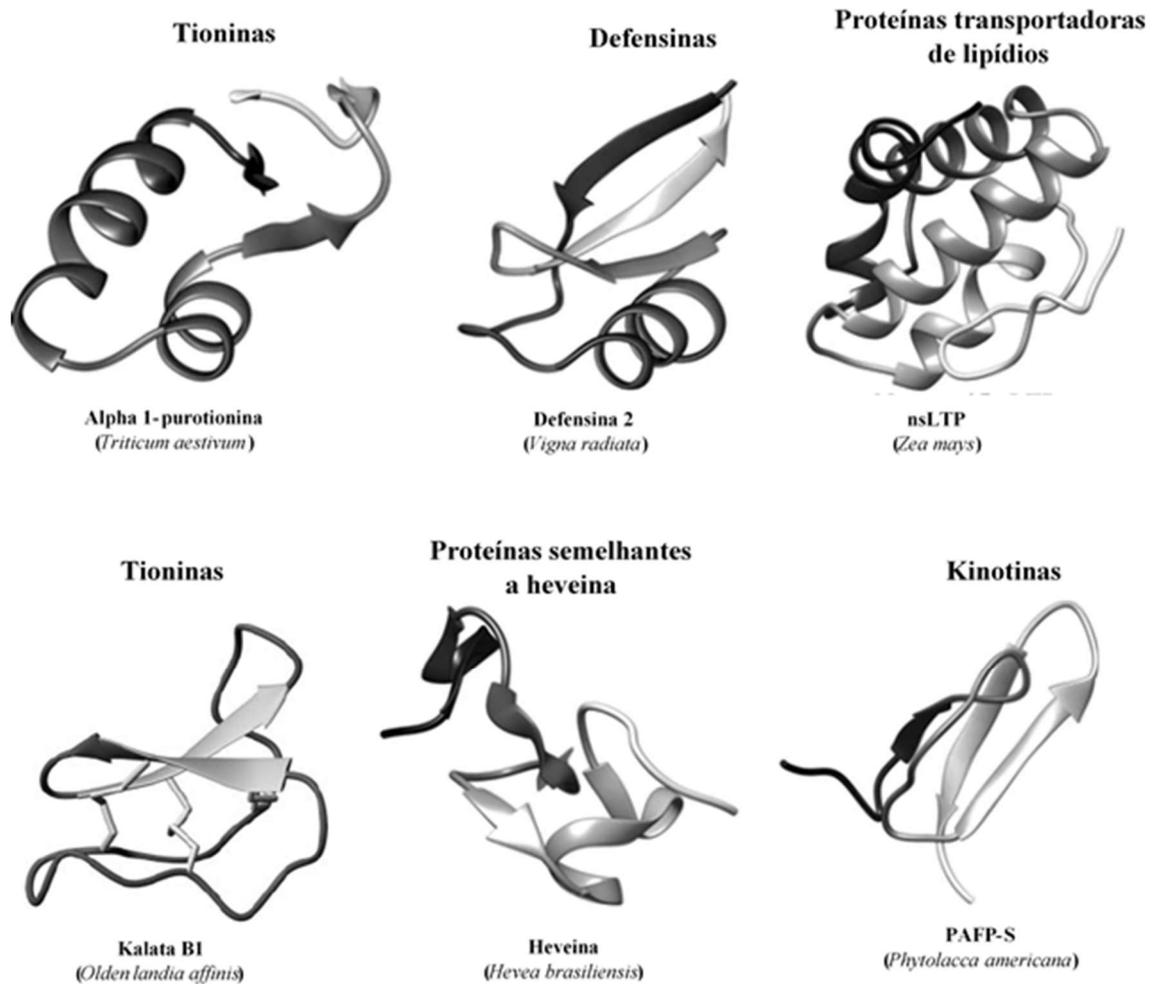
Estas moléculas exibem diversas propriedades favoráveis para a criação de novos antibióticos como: a maior dificuldade para o desenvolvimento de resistência microbiana, sinergismo às drogas convencionais e neutralização de endotoxinas. Os AMPs também se

<sup>2</sup> Fonte: <http://dramp.cpu-bioinfor.org>

destacam pela forte atividade antimicrobiana, antifúngica e antitumoral. Outro papel importante é sua atuação como moléculas de sinalização (imunomodulação), despertando assim seu interesse para aplicações profiláticas e terapêuticas (GIULIANI *et al.*, 2007; PUSHPANATHAN *et al.*, 2013). Diante disso, a procura por moléculas naturais que tenham atividade antimicrobiana tem aumentado expressivamente em diversas fontes como microrganismos, plantas, vertebrados, invertebrados, entre outros. Estes AMPs já caracterizados têm sido motivos de pesquisa para avaliação do potencial terapêutico (BOWDISH *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2011; ROSCIA *et al.*, 2013; SILVA E DIAMOND, 2014).

### 1.3 Defensinas de plantas

As plantas, por serem organismos sésseis não podem fugir da agressão. Por causa disso, estão frequentemente expostas a diferentes tipos de fatores abióticos, diversas pragas e patógenos na natureza. Diante disso desenvolveram vários mecanismos de defesa para se protegerem contra ataques de patógenos e contra situação de estresses (GACHOMO *et al.*, 2003, 2010). Neste cenário, se destacam os AMPs, como um importante mecanismo à frente de invasões, de patógenos ou até mesmo a respostas a estresses ambientais (THEVISSSEN *et al.*, 2004). As plantas possuem uma gama de compostos com atividades antimicrobiana, que tem a possibilidade de serem usados no tratamento de infecções causadas por microrganismos (MARÓTI *et al.*, 2011). Os AMPs de plantas, desde sua descoberta há duas décadas, são motivos de investigação, e com isso, muitas características destas famílias de peptídeos já são bastante conhecidas (SALAS *et al.*, 2015). Os principais AMPs de plantas foram reunidos em famílias de acordo com suas semelhanças, principalmente na estrutura primária (Figura 4), e entre elas estão as proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs, do Inglês *lipid transfer proteins*), tioninas, ciclotídeos, knotinas, snakinas, peptídeos similares à heveína e as defensinas de plantas (NAWROT *et al.*, 2014; SALAS *et al.*, 2015).

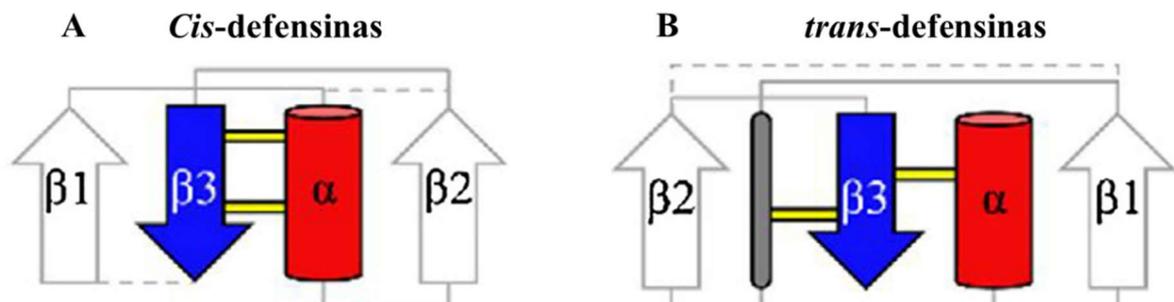


**Figura 4:** Representação esquemática de estruturas tridimensionais selecionadas de diferentes famílias de peptídeos antimicrobianos de plantas (Adaptada de NAWROT *et al.*, 2014; SIMONSEN *et al.*, 2008, com modificações).

De acordo com TERRAS *et al.* (1995) as defensinas de plantas representam uma família de peptídeos com cerca de 45 a 54 resíduos de aminoácidos em sua estrutura primária. Estes peptídeos foram primeiramente isolados a partir de grãos de trigo (chamada de  $\gamma_1$ -purotionina) e cevada (chamada de  $\gamma$ -hordotionina), tem sido inicialmente classificada como  $\gamma$ -tioninas, por apresentarem tamanho de 5 kDa e quatro pontes dissulfeto e que, portanto, naquele momento pareciam pertencer a esta família de AMPs de plantas já caracterizadas (BROEKART *et al.*, 1995; COOLS *et al.*, 2017). Apesar da similaridade com a família das tioninas, com o avanço dos estudos, percebeu-se que eles não apresentavam o mesmo padrão de formação de pontes dissulfeto, tinham diferenças na estrutura primária, como espaçamento dos resíduos de cisteínas, e também na estrutura tri-dimensional. Por estes motivos, os estudos posteriores

revelaram a similaridade maior destes peptídeos com defensinas de insetos e mamíferos previamente caracterizadas, e eles então foram renomeadas para defensinas de plantas (TERRAS *et al.*, 1995). Com o avanço dos estudos, principalmente da estrutura secundária e a disposição das pontes dissulfeto, revelaram-se duas superfamílias independentes de defensinas: as *trans*-defensinas, que abrigam as defensinas de mamíferos e vertebrados em geral e as *cis*-defensinas, que estão presentes na maioria dos invertebrados, fungos e plantas (Figura 5). Essa semelhança entre as *trans*-defensinas e as *cis*-defensinas é descrita como um possível caso extremo de evolução convergente (PARISI *et al.*, 2019; SHAFEE *et al.*, 2016, 2017). Nas *cis*-defensinas a organização das pontes dissulfeto acontecem no mesmo sentido, sendo um par de cisteínas presente na folha  $\beta_3$  interage com um outro par de cisteína presente na  $\alpha$ -hélice, formando um arranjo estrutural conservado (Figura 5A) (SHAFEE *et al.*, 2016). Este padrão difere das *trans*-defensinas em que uma das cisteínas do par presente na folha  $\beta_3$  interage com uma cisteína da  $\alpha$ -hélice e a outra interage com uma cisteína presente em uma região de volta (Figura 4B) (PARISI *et al.*, 2019).

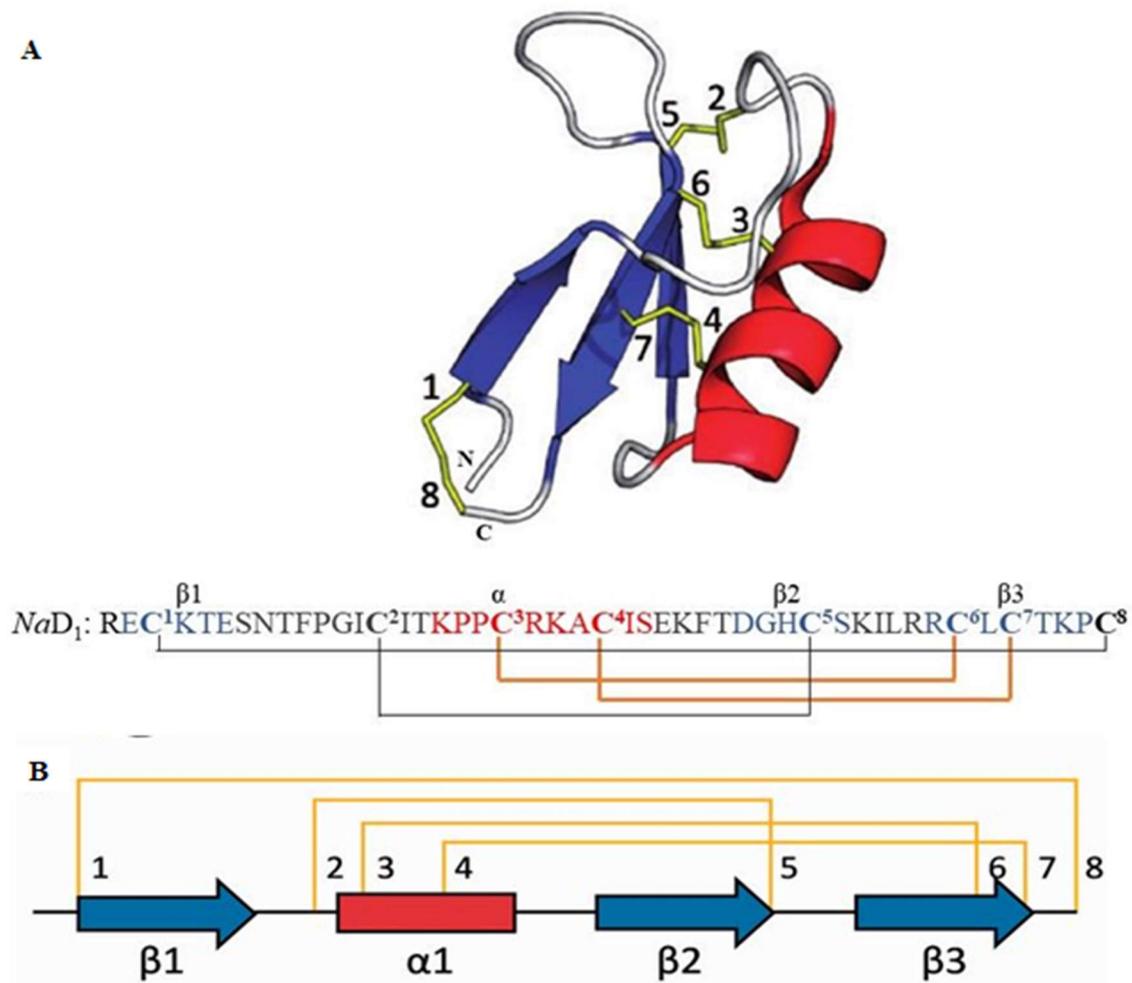
**Figura 5.** Organização estrutural das *cis*-defensina e *trans*-defensina. (A) As pontes dissulfeto mais conservadas



da superfamília *cis*-defensina (em amarelo) apontam o mesmo sentido. (B) As pontes dissulfetos mais conservados da superfamília *trans*-defensina (em amarelo) tem orientações diferentes. ( $\alpha$ )  $\alpha$ -hélice; ( $\beta_1$ ) folha  $\beta_1$ ; ( $\beta_2$ ) folha  $\beta_2$ ; ( $\beta_3$ ) folha  $\beta_3$ . As ligações dissulfeto não conservadas são mostradas como linhas tracejadas (Adaptado de PARISI *et al.* (2019), com modificações).

As defensinas de plantas são compostas por 45 a 54 resíduos de L-aminoácidos e apresentam oito cisteínas que formam uma estrutura estável com quatro pontes de dissulfeto, que são enoveladas em forma globular, contendo três fitas- $\beta$  antiparalelas e uma  $\alpha$ -hélice (CARVALHO E GOMES, 2009) (Figura 6A). SHAFEE *et al.* (2016) alinharam 1.292 sequências de defensinas já descritas, revelando que apenas os oito resíduos de cisteína são completamente conservados, formando quatro pontes dissulfeto com o arranjo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> e C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub> (Figura 6B). São conhecidas exceções como as defensinas *PhD*<sub>1</sub> e *PhD*<sub>2</sub> (de *Petunia hybrida*), que tem um par extra de cisteínas formando uma quinta ponte dissulfeto

(JANSSEN *et al.*, 2003). A formação das pontes dissulfeto, ajuda a manter os elementos estruturais secundários compactados, conferindo assim uma alta estabilidade físico-química, e especialmente a ponte C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> que a torna uma molécula pseudocíclica (CARVALHO E GOMES, 2011). Além das cisteínas, há resíduos de aminoácidos que também são comuns em defensinas como: dois resíduos de glicina (posição 12 e 32), um resíduo aromático (posição 10), e um glutamato (posição 27) (as posições são relativas a NaD<sub>1</sub> como mostrado na figura 5) (PARISI *et al.*, 2019; WEERDEN *et al.*, 2013) (Figura 7B).

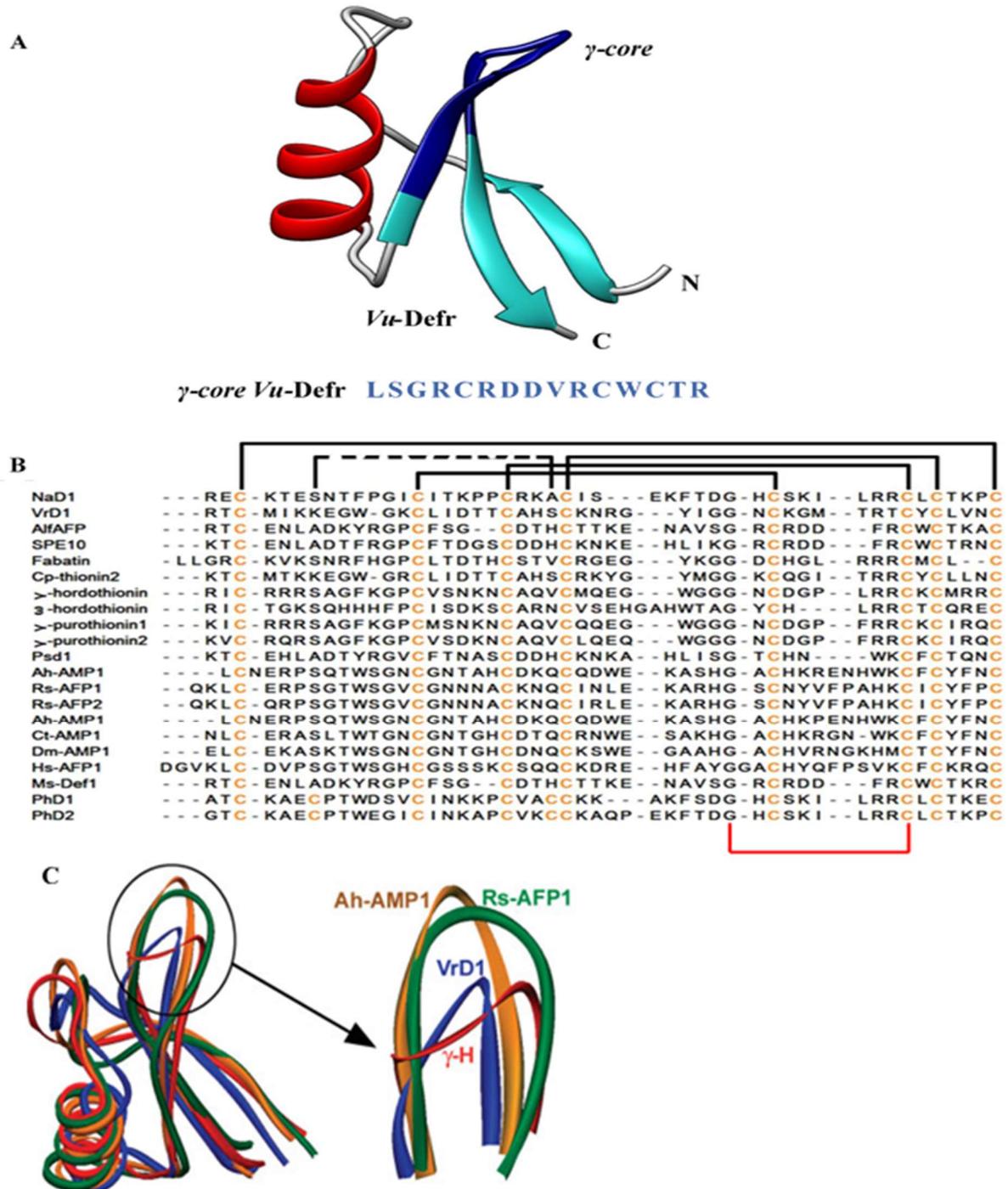


**Figura 6.** Representação esquemática das estruturas terciária e primária (A) da defensina NaD<sub>1</sub> de *Nicotiana alata* e elementos de estrutura secundária análogos alinhados em uma ordem de estrutura primária (B). Para as duas estruturas são mostrados em vermelho a  $\alpha$ -hélice, em azul as folhas  $\beta$ , em amarelo as pontes dissulfeto e em cinza as voltas. Os números indicam tanto os resíduos de cisteínas como o padrão de ligação entre eles para a formação das pontes dissulfeto. As linhas abaixo dos resíduos de cisteínas (destacados em negrito), na estrutura primária, indicam as pontes dissulfeto. As linhas destacadas em amarelo escuro indicam o domínio CS $\alpha$  $\beta$ . C e N indicam o C-terminal e o N-terminal, respectivamente (Adaptado de SHAFEE *et al.*, 2016, com modificações).

Essas variações nas estruturas primárias refletem em algumas variações espaciais da

estrutura tridimensional, diversificando assim o tamanho das voltas e contribuindo para o extenso espectro de atividades biológicas apresentado pelas defensinas de plantas (CARVALHO E GOMES 2011). Um exemplo ocorre na comparação da sequência dos dois grupos de defensinas de plantas em que comprimento da alça entre as fitas  $\beta_2$  e  $\beta_3$  foi relacionado com atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase de inseto, onde alças mais curta para as defensinas VrD<sub>1</sub> (de *Vigna radiata*) e  $\gamma$ -hordotionina de cevada se inserem no sítio ativo da  $\alpha$ -amilase de *Tenebrio molitor* causando sua inibição. As voltas maiores entre as fitas  $\beta_2$  e  $\beta_3$  de RsAFP<sub>1</sub> (de *Raphanus sativus*) e AhAMP<sub>1</sub> (de *Aesculus hippocastanum*) previnem a ligação destas defensinas à  $\alpha$ -amilase do inseto (Figura 7C) (LIU *et al.*, 2006). Adicionalmente, DE SAMBLANX *et al.* (1997) e SCHAAPER *et al.* (2001) avaliaram, e correlacionaram, a atividade biológica das defensinas também a uma região da sequência de aminoácidos entre as fitas  $\beta_2$  e  $\beta_3$  (Figura 7A). Mais tarde YOUNT e YEMAN (2004) analisando várias estruturas primárias de diferentes classes de AMPs descobriram um elemento estrutural conservado composto nas estruturas de todos os AMPs estudados (Figura 7B). Eles também demonstraram que essa região era a detentora da atividade biológica do AMP. Eles nomearam este elemento estrutural de  $\gamma$ -core devido à similaridade estrutural na organização espacial dentro do AMP com esta letra do alfabeto grego. Esta região compreende a região descrita por DE SAMBLANX *et al.* (1997) e SCHAAPER *et al.* (2001) e para as defensinas de plantas a estrutura primária do  $\gamma$ -core tem sua fórmula descrita como dextromérica com o seguinte arranjo: NH<sub>2</sub>- [X<sub>1-3</sub>] - [GXC] - [X<sub>3-9</sub>] - [C] -COOH, sendo X qualquer aminoácido.

Sabendo disso, compreender essa região é importante para o desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica que podem ser usadas para o desenvolvimento de novas drogas (SOUZA *et al.*, 2019). Além disso as defensinas de plantas vêm mostrando sua ampla atividade contra fungos e patógenos humanos, principalmente do gênero *Candida* (CARVALHO E GOMES, 2011).

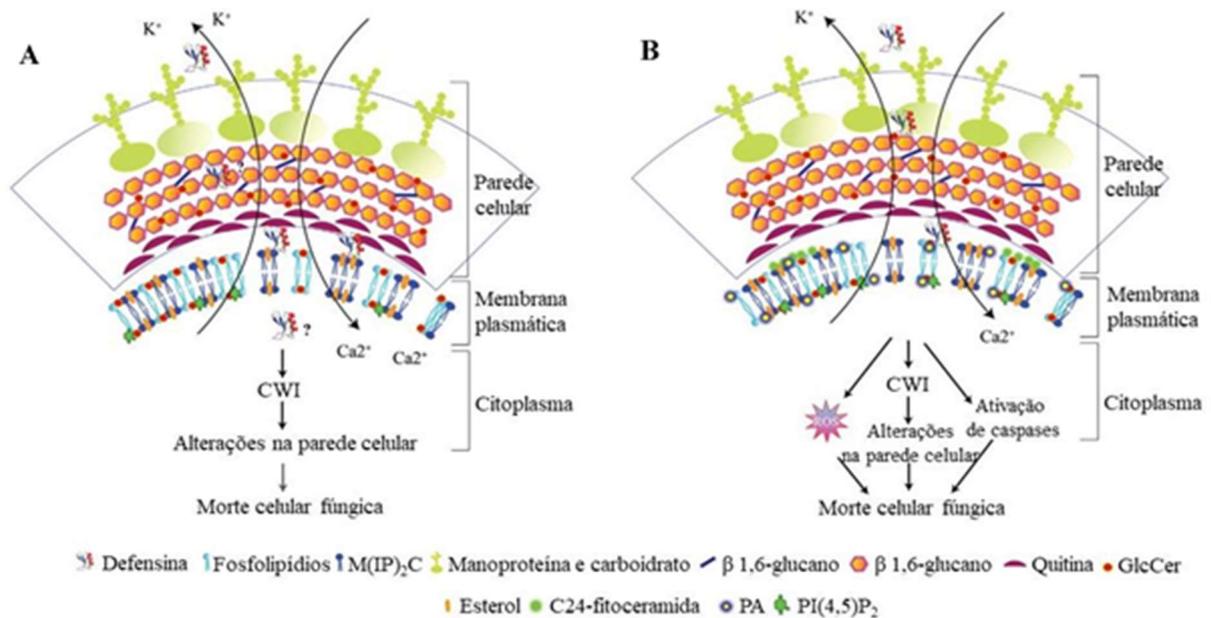


**Figura 7.** Representação esquemática das estruturas primárias e terciárias de defensas. (A) Modelo estrutural de *VuDefr* de *Vigna unguiculata*. O cinza representa os elementos não estruturados, o vermelho representa a  $\alpha$ -hélices e o azul claro representa as folhas  $\beta$  e o azul escuro representa a região do  $\gamma$ -core. C e N indicam o C-terminal e o N-terminal, respectivamente (Adaptado de SOUZA *et al.*, 2019). (B) Sequências de defensas de plantas. As linhas acima dos resíduos de cisteínas (destacados em laranja) na estrutura primária indicam as pontes dissulfeto, a linha pontilhada indica a quinta ponte dissulfeto presente em *PhD1* e *PhD2*. A linha vermelha indica a região do  $\gamma$ -core, notar que essa região é a mais variável das estruturas das defensas (Adaptado de TAM *et al.*, 2015). (C) Representação esquemática das estruturas tridimensionais das defensas *AhAMP1*, *RsAFP1*, *VrD1*,  $\gamma$ -hordothionina, mostrando a variação espacial das voltas entre a fita  $\beta_2$  e  $\beta_3$  (Adaptado de LIU *et al.*, 2006).

#### 1.4 Mecanismos de ação sobre a inibição de microrganismos

As defensinas de plantas apresentam inúmeras atividades biológicas descritas, tais como antibacteriana, antitumoral, antiviral e dentre as mais estudadas está a atividade antifúngica. No entanto, ainda se sabe pouco sobre os mecanismos de ação que levam à inibição de fungos, pois estes mecanismos apresentam grandes variações de uma determinada defensina para outra (LACERDA *et al.*, 2014; VRIENS *et al.*, 2014; COOLS *et al.*, 2017; PARISI *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2019). Diante disso, esforços para a identificação a nível molecular de ativações de vias e processos de sinalizações que podem levar a inibição do crescimento celular, e até mesmo a morte das células microbianas, vem sendo alvo de estudos para tentar descrever o mecanismo de ação tão complexo das defensinas (SOUZA *et al.*, 2019; PARISI *et al.*, 2019; THEVISSSEN *et al.*, 2000; WILMES *et al.*, 2011).

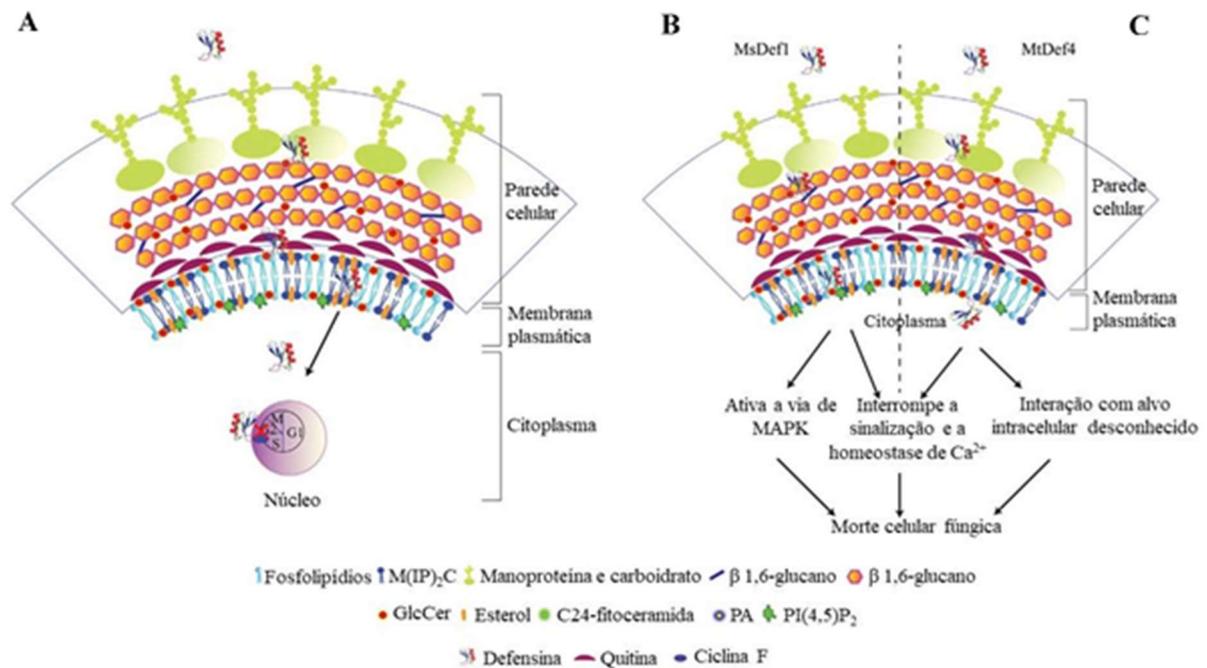
Um dos efeitos mais notados no mecanismo de ação das defensinas é a permeabilização de membrana como visto para as interações das defensinas de plantas DmAMP<sub>1</sub> (de *Dahlia mercki*) com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (THEVISSSEN *et al.*, 1996; 1999) e NaD<sub>1</sub> (de *Nicotiana glauca*) com o fungo *Fusarium oxysporum* (VAN DER WEERDEN *et al.*, 2008; 2010). Apesar da permeabilização da membrana ser um fator bastante recorrente e importante para a atividades de vários AMPs, alguns estudos demonstraram que a permeabilização sozinha não é capaz de explicar o amplo espectro de atividades inibitórias demonstradas pelas defensinas (FRANCO, 2011; JENSSEN *et al.*, 2006). No estudo dos mecanismos de ação de DmAMP<sub>1</sub> e da defensina de semente de rabanete RsAFP<sub>2</sub> (de *Raphanus sativus*) foram observadas uma série de respostas rápidas nas membranas fúngicas após interações com esfingolípídios, como alterações no potencial de membrana, efluxo K<sup>+</sup>, influxo de Ca<sup>2+</sup> e permeabilização de membrana (Figura 8A e B) (BLEACKLEY *et al.*, 2016; THEVISSSEN *et al.*, 1996, 1999). Diante disso, respostas ativadas pelos fungos, para ajudar a conter o dano causado pelo peptídeo, foram observadas como: a ativação da via de integridade da parede celular (CWI, do inglês *cell wall integrity*) em *S. cerevisiae* em contato com DmAMP<sub>1</sub> (Figura 8A) e na ação de RsAFP<sub>2</sub> foi observado ativação da via CWI, além de indução de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), indução da morte celular programada ou apoptose em *C. albicans* (AERTS *et al.*, 2009; COOLS *et al.*, 2017; THEVISSSEN *et al.*, 1996) (Figura 8B).



**Figura 8.** Representação esquemática dos mecanismos de ação das defensinas *DmAMP*<sub>1</sub> (A) e *RsAFP*<sub>2</sub> (B) em células fúngicas. (A) A interação com *DmAMP*<sub>1</sub> resulta na permeabilização da membrana plasmática e no efluxo de K<sup>+</sup> e influxo de Ca<sup>2+</sup>. Em resposta a *DmAMP*<sub>1</sub> a via CWI é ativada no fungo. (B) A interação com *RsAFP*<sub>2</sub> na parede celular e na membrana plasmática leva ao efluxo do K<sup>+</sup> e ao influxo de Ca<sup>2+</sup> assim como a permeabilização da membrana. A interação entre *RsAFP*<sub>2</sub> também leva ao aumento da produção de ROS, ativação da CWI e da via de caspase que contribuem para a morte celular (Adaptado de PARISI *et al.*, 2019).

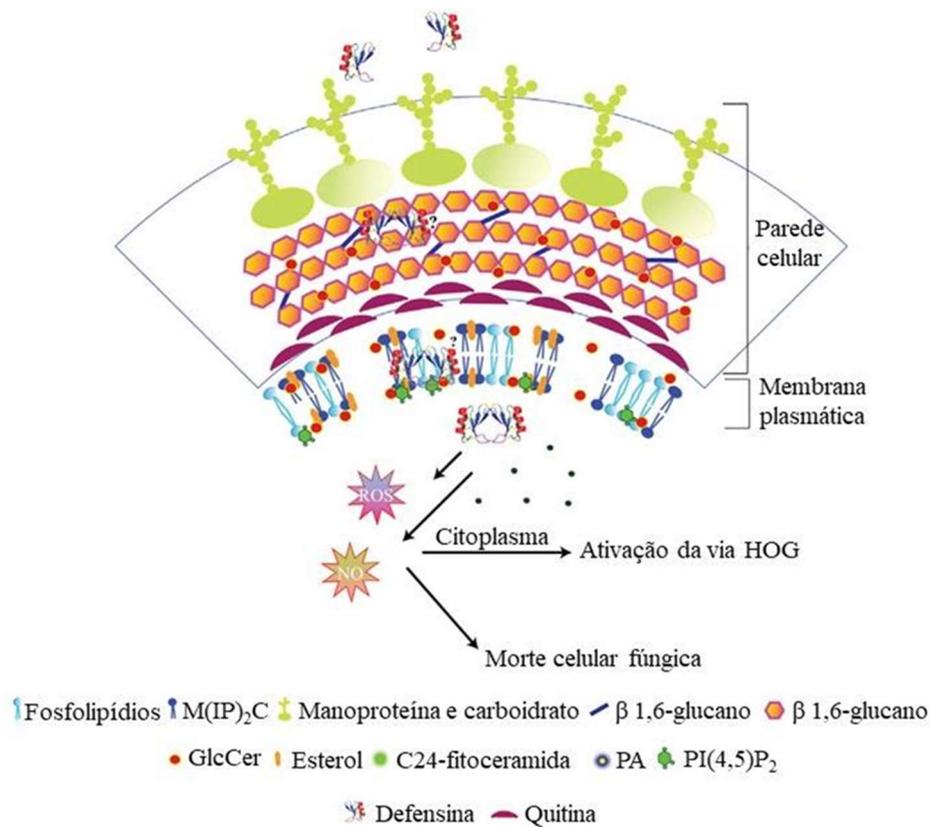
Diferente de *DmAMP*<sub>1</sub> e *RsAFP*<sub>2</sub>, as defensinas de plantas *MsDef*<sub>1</sub> (de *Medicago sativa*) e *PsD*<sub>1</sub> (de *Pisum sativum*), apesar de também interagirem com esfingolipídios, possuem mecanismos de ações diferentes. Em resposta a *MsDef*<sub>1</sub> cascatas de sinalização da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK, do inglês *mitogen activated protein kinase*) são ativadas no fungo *F. graminearum*, além da interrupção da sinalização e do gradiente de Ca<sup>2+</sup> nas pontas das hifas, levando à hiper ramificação, característica que ocorre com esta defensina, chamada de morfogênica (Figura 9B) (GONÇALVES *et al.*, 2012; PARISI *et al.*, 2019; RAMAMOORTHY *et al.*, 2007; SAGARAM *et al.*, 2011; SPELBRINK *et al.*, 2004). Para *PsD*<sub>1</sub>, análises através de microscopia de fluorescência com peptídeo marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) mostrou a colocalização de *PsD*<sub>1</sub> no núcleo. *PsD*<sub>1</sub> interage com os esfingolipídios e com ergosterol, foi observado também que em seguida *PsD*<sub>1</sub> se move para o citoplasma onde interage com a ciclina F presente no núcleo, levando o fungo *Fusarium solani* à morte (LOBO *et al.*, 2007; PARISI *et al.*, 2019) (Figura 9A). Já *MtDef*<sub>4</sub> (de *Medicago trunculata*) tem a capacidade de interagir com fosfolípidios interrompendo a homeostase de Ca<sup>2+</sup>, seguido da entrada citoplasmática e é possível que ela interaja com algum alvo intracelular ocasionando a morte celular fúngica (SAGARAM *et al.*,

2011; 2013) (Figura 9C).



**Figura 9.** Representação esquemática dos mecanismos de ação de *PsD*<sub>1</sub> (A), *MsDef*<sub>1</sub> (B) e *MtDef*<sub>4</sub> (C) em células fúngicas. (A) *PsD*<sub>1</sub> interage com o esfingolipídio e com ergosterol, posteriormente se move para o citoplasma e interage com a ciclina F presente no núcleo levando o fungo à morte. (B) *MsDef*<sub>1</sub> interage com esfingolipídios, interrompe a sinalização e a homeostase de Ca<sup>+2</sup>, e ativa a via de MAPK contribuindo para a morte do fungo. (C) *MtDef*<sub>4</sub> interage com fosfolipídios e interrompe a sinalização e a homeostase de cálcio. Após a interação a *MtDef*<sub>4</sub> entra no fungo e acredita-se que interaja com um alvo intracelular ainda não descrito (Adaptado de PARISI *et al.*, 2019).

Outros mecanismos foram descritos para a defensina de planta *NaD*<sub>1</sub> onde observou-se que a defensina formou dímeros, e também foi capaz de entrar no citoplasma via endocitose. Uma vez no citoplasma, foi observado a formação de oligômeros que interagiram com alvos celulares, provavelmente a mitocôndria, acarretando uma alta produção de ROS e óxido nítrico (NO do inglês *nitric oxide*), além de granulação do citoplasma, permeabilização de membrana e morte celular. Em resposta à ação de *NaD*<sub>1</sub> foi observado que houve a ativação da via de resposta de alta osmolaridade/glicerol (HOG, do inglês *high osmolarity/glycerol*) e não ativação da via CWI como observado para *DmAMP*<sub>1</sub> e *RsAFP*<sub>2</sub> (Figura 10) (BLEACKLEY *et al.*, 2014; HAYES *et al.*, 2013, 2018; POON *et al.*, 2014; PARISI *et al.*, 2019; VAN DER WEERDEN *et al.*, 2008, 2010).



**Figura 10.** Representação esquemática do mecanismo de ação da defensina *NaD*<sub>1</sub>. A presença da *NaD*<sub>1</sub> 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 (Adaptado de PARISI *et al.*, 2019).

A compreensão do mecanismo de ação dos AMPs, incluindo as defensinas, é de grande importância porque: (1) simplificará uso deles como agentes antimicrobianos; (2) contribuirá para a identificação de possíveis alvos para terapia antifúngica; (3) permitirá projeto racional de modificações e substituições para minimização de instabilidade do AMP e toxicidade para as células não alvo; e (4) melhorará a escolha do melhor método de entrega para os seus sítios de ação (SOARES *et al.*, 2016). A relevância das defensinas de plantas para a aplicação na medicina justifica os intensos estudos para desvendar o mecanismo de ação desta família de peptídeos de plantas, uma vez que, o mecanismo de ação sobre as células-alvo ainda não está elucidado.

### 1.5 AMPs e desenvolvimento de novas drogas

O uso de antimicrobianos de maneira intensiva, prolongada e de forma irracional, na medicina humana e veterinária, tem aumentado a seleção de resistência de microrganismos à estes antimicrobianos atuais, necessitando assim a busca de novas alternativas farmacêuticas

(MENEGUETTI *et al.*, 2017). Uma vez que os AMPs são onipresentes na natureza e são produzidos por quase todos os organismos vivos, esses peptídeos e os seus derivados sintéticos se tornaram uma alternativa interessante diante aos fármacos atuais. O interesse por estas moléculas reflete em mais de 20 AMPs diferentes em todos os estágios clínicos de desenvolvimento (SIERRA *et al.*, 2017).

Pensando nas funções e estrutura dos AMPs de ocorrência natural, os peptídeos antimicrobianos projetados (dAMPs, do inglês *designed AMPs*) são peptídeos sintetizados em laboratório de forma racional, projetados a partir de AMPs de ocorrência natural. Eles apresentaram inúmeras variações ao repertório estrutural e apresentaram, portanto, maior eficiência, segurança, especificidade e possibilidade de ter sua toxicidade reduzida para células não alvos, em comparação com seus modelos naturais (CARY *et al.*, 2000; RAJASEKARAN *et al.*, 2012, 2018). Com isso, tornou-se evidente que os dAMPs dotados de mudanças estruturais resultaram na melhoria da estabilidade, menor degradação por proteases e na diminuição da toxicidade a células não alvo, combinado a uma redução acentuada nos custos de fabricação e compreensão do seu mecanismo de ação sobre o patógeno alvo, o que são medidas necessárias para a entrada de possíveis medicamentos no mercado (RAMESH *et al.*, 2016).

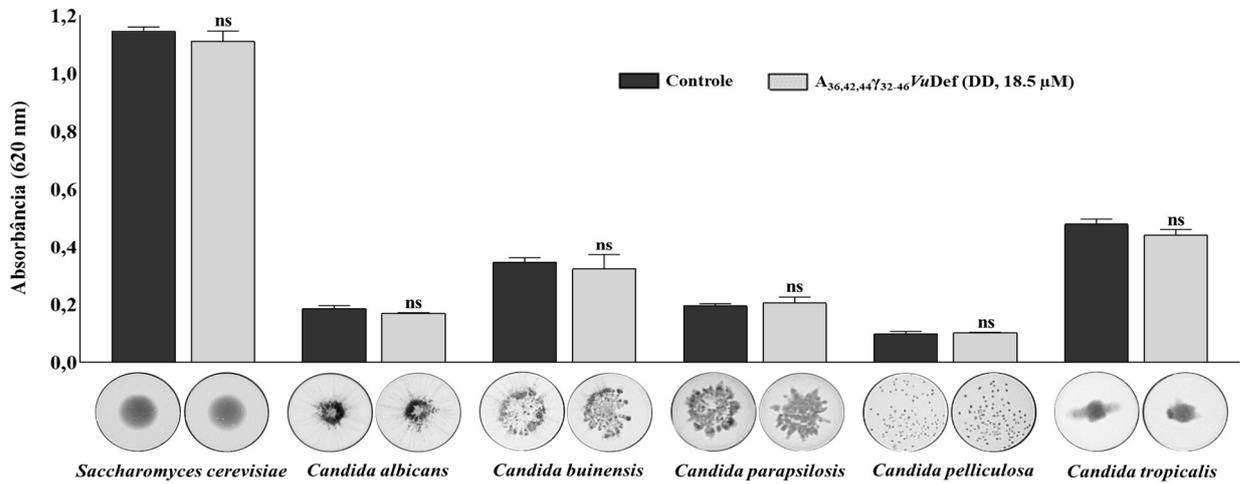
Nosso grupo vem estudando AMPs presentes na semente de *Vigna unguiculata* L. Walp. (feijão-de-corda), de onde foram isolados dois peptídeos ricos em cisteínas, uma defensina e uma LTP, ambas com atividade biológica *in vitro* contra os fungos fitopatogênicos *F. oxysporum* e *F. solani* e a levedura *S. cerevisiae* (CARVALHO *et al.*, 2001). Essa defensina foi clonada e caracterizada por CARVALHO *et al.* (2006), recebendo o nome de *VuDef*<sub>1</sub> (*Vigna unguiculata defensin one*, CARVALHO *et al.*, 2006). Seguindo os estudos, foi realizada a produção recombinante da *VuDef*<sub>1</sub> que mostrou atividade antimicrobiana sobre promastigotas de *Leishmania amazonenses*, um patógeno humano de relevância médica (SOUZA *et al.*, 2013). Posteriormente, foi desenhado um peptídeo baseado na região de alça das fitas  $\beta_2$  e  $\beta_3$  da *VuDef*<sub>1</sub>, a região do  $\gamma$ -core (ler 4º parágrafo da introdução defensinas de plantas), com 15 resíduos de aminoácidos (Figura 6A), cuja sequência é L<sub>32</sub>SGRARD<sub>37</sub>D<sub>38</sub>VRAWATR<sub>46</sub> e foi denominado A<sub>36,42,44</sub> $\gamma$ <sub>32-46</sub>*Vu*-Def (onde A<sub>36,42,44</sub> indica a troca dos resíduos de Cys por Ala que 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.  $\gamma$ <sub>32-46</sub> indica a posição que o peptídeo ocupa na estrutura primária da *VuDef*<sub>1</sub>. O peptídeo foi abreviado como DD por causa dos dois ácidos aspárticos adjacentes em sua estrutura). DD reteve a atividade biológica sobre *L. amazonenses* e ainda foi estudado seu mecanismo de ação sobre o protozoário, o qual demonstrou envolver perturbação da membrana,

produção endógena de ROS, perda do potencial de membrana mitocondrial e envolvimento de vias apoptóticas (SOUZA *et al.*, 2019). Mediante os resultados de DD sobre *L. amazonenses*, foi testada a atividade inibitória de DD sobre cinco espécies de leveduras de interesse clínico e também sobre a levedura modelo *S. cerevisiae*. No entanto, DD não apresentou atividade inibitória sobre elas (Figura 11) (TOLEDO *et al.*, 2021). Este resultado de inatividade de DD sobre as leveduras nos levou a melhorar sua atividade contra leveduras, desenhando novos peptídeos alterando seus parâmetros bioquímicos por meio de substituições de aminoácidos. Diante disso foi realizada uma enorme pesquisa em banco de dados que compilou uma análise da literatura de artigos que correlacionaram as estruturas primárias das defensinas de plantas e suas atividades biológicas, assim como correlacionando suas atividades a carga e hidrofobicidade (TOLEDO *et al.*, 2021). A partir deste estudo foram desenhados três novos peptídeos com modificações direcionadas na carga, hidrofobicidade e também na quiralidade. O trabalho apresentado aqui mostra parte dos resultados daquele estudo, avaliando a atividade biológica de um dos três peptídeos desenhados a partir da análise realizada com os dados da literatura e também um avanço em relação à elucidação do mecanismo de ação do peptídeo.

Esse peptídeo foi denominado como D-A<sub>36,42,44</sub>R<sub>37,38</sub>γ<sub>32-46</sub>Vu-Def (R<sub>37,38</sub> indica a posição da mudança de Asp para Arg e D para indicar a mudança na quiralidade e abreviado como D-RR). D-RR foi baseado na estrutura do γ-core da VuDef<sub>1</sub> (Figura 7A) e uma das diferenças com o peptídeo DD foi a troca de dois aminoácidos carregados negativamente, ácido aspártico (Asp), nas posições 37 e 38 por duas argininas (Arg). Esta troca o que fez com que a carga líquida de D-RR aumentasse de +2 para +6, e sua hidrofobicidade aumentasse de +21.98 para +18.32 kcal/mol (hidrofobicidade calculada de acordo com a escala de Wimley-White que quanto maior o valor positivo, mais hidrofílico é o peptídeo, e inversamente, maior valor negativo, mais hidrofóbico é o peptídeo). Estas alterações foram feitas porque as características de carga e hidrofobicidade pode ser o motivo da baixa atividade de DD, uma vez que pode resultar na repulsa de estruturas carregadas negativamente na parede celular dos fungos, ou constituintes da membrana (HANEY *et al.*, 2007; TOLEDO *et al.*, 2021).

Dando suporte a essa ideia, trabalhos com fungos demonstram a importância dos lipídeos, principalmente os de cargas negativas na interação de defensinas de plantas, e com isso mostrando o quanto os aminoácidos carregados positivamente da região de γ-core são importantes para essa interação (PARISI *et al.*, 2019). A outra mudança no DD foi em relação aos aminoácidos, neste caso foram usados aminoácidos na sua forma dextrógira (D-enantiômeros), pois estudos apontaram que em geral os aminoácidos na conformação D podem aumentar ou proteger os peptídeos das ações enzimáticas, mantendo sua atividade

antimicrobiana e, em geral, nesta configuração eles tendem a ser menos tóxicos para células de mamíferos (BRAUNSTEIN *et al.*, 2004; HAMAMOTO *et al.*, 2002; HONG *et al.*, 1999; MATSUZAKI, 2009; TOLEDO *et al.*, 2021; WEI e BOBEK, 2005; ZHU *et al.*, 2007).



**Figura 11:** Crescimento das leveduras na ausência (controle) e na presença do peptídeo sintético DD na concentração de 18,5  $\mu$ M por 24 h. As imagens dos fundos dos poços com o padrão de crescimento de cada espécie de levedura são mostradas abaixo das barras. A imagem é representativa de um ensaio em três. ns = não significativo em relação ao controle (Adaptado de TOLEDO *et al.*, 2021).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi testar a atividade inibitória do peptídeo sintético D-RR sobre leveduras, confrontar a ação inibitória de D-RR sobre leveduras com o fármaco de referência fluconazol e avaliar os mecanismos envolvidos nessa atividade.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar atividade antimicrobiana de D-RR sobre seis espécies de leveduras;
- Determinar a mínima concentração inibitória (MIC, do inglês *minimal inhibitory concentration*) do peptídeo sobre duas espécies de leveduras mais sensíveis e de maior relevância médica para estudos mais aprofundados;
- Estimar a viabilidade das células das duas espécies de leveduras escolhidas, após a determinação da MIC na ausência e presença de D-RR;
- Determinar a dose letal (DL<sub>100</sub>) do peptídeo sobre duas espécies de leveduras escolhidas;
- Confrontar as DL<sub>100</sub> determinadas com o antifúngico de referência fluconazol;
- Estimar a viabilidade celular das células de mamíferos macrófagos murinos e monócitos humanos, de frente para D-RR;
- Estudar da cinética de morte celular de *C. tropicalis*;
- Avaliar o potencial de D-RR em permeabilizar membranas plasmáticas de *C. tropicalis*;
- Avaliar a produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células de *C. tropicalis* na ausência e presença de D-RR;
- Analisar o potencial da membrana mitocondrial das células de *C. tropicalis* na ausência e presença de D-RR.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais biológicos

##### 3.1.1 Peptídeo sintético D-A<sub>36,42,44</sub>R<sub>37,38</sub>γ<sub>32-46</sub>Vu-Def

O peptídeo sintético D-A<sub>36,42,44</sub>R<sub>37,38</sub>γ<sub>32-46</sub>Vu-Def, abreviado como D-RR, utilizado neste trabalho foi baseado em uma sequência utilizada por SOUZA *et al.* (2019). A partir da sequência peptídica sintética original L<sub>32</sub>SGRARDDVRAWATR<sub>46</sub> foram feitas as seguintes alterações. Os Asp<sub>37</sub> e Asp<sub>38</sub> foram substituídos por Arg e todos os aminoácidos usados na síntese química foram na sua forma dextrógira (D-enantiômeros) (TOLEDO *et al.*, 2021). D-RR foi obtido comercialmente pela Biomatik (EUA), na forma de pó e foi dissolvido em água ultrapura mantendo a concentração final de 2 µg/µL. Aliquotas foram armazenadas em frascos de vidro contendo 500 µL e armazenadas a -70 °C, para o uso posterior.

##### 3.1.2 Microrganismos

As leveduras *Candida tropicalis* (CE017), *Candida albicans* (CE022), *Candida parapsilosis* (CE002), *Candida pelliculosa* (3974), *Candida buinensis* (3982) e *Saccharomyces cerevisiae* (1038) foram cultivadas e conservadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos do Centro de Biociências e Biotecnologia na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. As leveduras foram mantidas em ágar *Sabouraud* (10 g/L peptona de carne, 5 g/L peptona de caseína, 20 g/L D(+)-glicose e 17 g/L ágar) (Merck Millipore Brasil) a 30 °C, em seguida foram armazenadas a 4 °C e transferidas para novo meio a cada três meses.

#### 3.2 Ensaio de inibição da cultura de leveduras

O protocolo utilizado nesse ensaio foi feito de acordo com WIEGAND *et al.* (2008), SOARES *et al.* (2016) e SOUZA *et al.* (2019), com adaptações.

Para ter células de leveduras no início da fase logarítmica de crescimento para o ensaio, as células de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. buinensis*, *C. tropicalis* e *S. cerevisiae* foram retiradas do estoque em que estavam armazenadas em placas de cultura e individualmente replicadas por semeadura para um crescimento celular homogêneo em uma nova placa de Petri contendo ágar *Sabouraud*, e incubadas para o crescimento em uma estufa com temperatura de 30 °C por 24 h e então foram utilizadas para realização do ensaio de

inibição.

Com auxílio de uma alça de semeadura foi retirada uma alíquota de cada cepa das leveduras recém cultivadas e estas foram ressuspendidas em 1 mL de caldo *Sabouraud* (5 g/L peptona de carne, 5 g/L peptona de caseína, 20 g/L D(+)glicose) (Merck Millipore Brasil), desse volume foi retirada uma alíquota de 10 µL e esta foi utilizada para a contagem de células em câmara de Neubauer (Laboroptik, United Kingdom) com auxílio do microscópio óptico (Axio Imager.A2, Zeiss). A contagem obtida foi utilizada para as diluições celulares a serem usadas posteriormente.

O peptídeo sintético D-RR, foi preparado para o ensaio a partir de um estoque seguindo o mesmo padrão utilizado por SOUZA *et al.* (2019). Uma alíquota do peptídeo foi diluída em caldo *Sabouraud* para que ficasse na metade do volume final do ensaio antimicrobiano e esterilizada por filtração utilizando filtro Millex-GV 0,22 µm (Merck Millipore Brasil). Quando fosse montado o ensaio antimicrobiano esta alíquota diluída foi completada pela outra metade do volume final do ensaio (100 µL) em caldo *Sabouraud* resultando na concentração final do peptídeo de 18,5 µM.

O ensaio foi feito em microplacas de cultura de células de 96 poços (Nunc) (Thermo Scientific Brasil, São Paulo, Brasil) contendo o volume correspondente de meio *Sabouraud* contendo 2.000 células/mL (200 células/poço) de acordo com as suspensões celulares obtidas para cada cepa, mais o peptídeo D-RR na concentração descrita acima e o volume final foi completado para 100 µL com caldo *Sabouraud*. Os poços das amostras controles foram realizados na ausência do peptídeo. A microplaca foi incubada a 30 °C por um período de 24 h.

Após decorrido as 24 h, foi feita a análise do crescimento celular das leveduras por meio da densidade ótica (DO) por leitura em um leitor de microplacas (DG Vita EC DV9990DV6, Gio) em um comprimento de onda de 620 nm. Poços contendo apenas caldo *Sabouraud* foram considerados brancos. O gráfico de inibição foi montado com a DO pelo tempo de 24 h, sendo o controle de cada levedura considerado 100% de crescimento. Imagens em escala de cinza do fundo dos poços do ensaio foram obtidas pela câmera do Galaxy Note 9 (Samsung) em 24 h. Todo procedimento foi realizado sobre condições de assepsia, em câmara de fluxo laminar.

### **3.3 Determinação da mínima concentração inibitória de D-RR sobre leveduras**

O protocolo utilizado no trabalho foi de acordo com WIEGAND *et al.* (2008) e SOARES *et al.* (2016), com adaptações.

Após realização do ensaio antimicrobiano descrito no **item 3.2** foram escolhidas as leveduras *C. tropicalis* e *C. albicans* que apresentaram maior susceptibilidade em face de D-RR e maior relevância médica para continuidade dos estudos. Para a determinação da MIC para *C. tropicalis*, foi utilizado o protocolo do ensaio antimicrobiano descrito no **item 3.2**, modificando apenas a concentração do peptídeo para realização do ensaio. A escolha das concentrações foi proposta a partir dos resultados do teste inicial de inibição feito na concentração de 18,5  $\mu\text{M}$  e escolhidas as concentrações de 14, 18,5, 23, 27,5 e 32  $\mu\text{M}$ . O mesmo procedimento foi feito para *C. albicans*, mas com o acréscimo de 36,5  $\mu\text{M}$  às concentrações citadas para *C. tropicalis* e com a exclusão de 14  $\mu\text{M}$ .

Todo o ensaio foi realizado em triplicata e a MIC foi repetida mais três vezes para confirmação, em condições de assepsia, em câmara de fluxo laminar. Em 24 h foram adquiridas imagens dos fundos dos poços conforme descrito no **item 3.2**. A menor concentração em  $\mu\text{M}$  na qual a levedura não apresentou crescimento visível no fundo do poço a olho nu foi considerada a MIC.

#### **3.4 Ensaio da viabilidade celular, determinação da dose letal (DL<sub>100</sub>) sobre leveduras tratadas com D-RR e teste com fluconazol**

Depois da determinação da MIC, realizamos o teste de viabilidade celular para descobrir se o peptídeo D-RR causava a inibição do crescimento de *C. tropicalis* e *C. albicans* devido a ação fungicida ou fungistática. Para a determinação da viabilidade celular o volume total dos poços do ensaio da determinação da MIC e dos controles foram lavados uma vez em caldo *Sabouraud*, dispensados em placas de Petri contendo ágar *Sabouraud* e espalhados homogeneamente com uma alça de *Drigalski* por toda a placa. Após o espalhamento, as placas de Petri contendo as amostras foram incubadas em uma estufa a 30 °C por um período de 24 h. Após a incubação, as unidades formadoras de colônias (UFCs) foram determinadas por contagem das colônias formadas para a determinação do efeito fungicida (definida como perda da viabilidade celular, ou seja, a capacidade das células de levedura de se dividirem e, portanto, de formarem colônias em condições apropriadas) ou fungistático (inibição do crescimento sem causar perda da viabilidade). A dose letal (DL<sub>100</sub>) foi considerada a concentração de D-RR em que não houver crescimento de células das leveduras (formação de colônias), ou seja, houve perda da capacidade de divisão celular. Imagens em escala de cinza das placas de Petri do ensaio de viabilidade (DL<sub>100</sub>) foram obtidas pela câmera do Galaxy Note 9 (Samsung) em 24 h.

Determinada a DL<sub>100</sub> de D-RR para *C. tropicalis* e *C. albicans*, o ensaio de viabilidade

foi repetido na mesma concentração da  $DL_{100}$  de D-RR com o fluconazol, a fim de confrontar a atividade inibitória do peptídeo com a deste fármaco de uso clínico. Foram usados os mesmos parâmetros do ensaio de viabilidade descrito acima. Foram testadas amostras com fluconazol (Sigma-Aldrich) com as mesmas concentrações de  $DL_{100}$  determinada para D-RR para as duas leveduras. O fluconazol foi ressuspenso em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) na concentração de  $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (estoque). O controle, sem adição de fluconazol, foi feito com 0,4% de DMSO, mesma concentração final de DMSO nas amostras tratadas com fluconazol. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.5 Estudo da cinética de morte celular induzida por D-RR em *C. tropicalis*

A partir deste experimento, decidimos continuar apenas com a levedura mais sensível, e por isso, os testes abaixo foram feitos apenas para *C. tropicalis*. Uma vez confirmado o efeito fungicida de D-RR após realização do ensaio de viabilidade, estudamos a cinética de morte de *C. tropicalis* em frente do peptídeo sintético D-RR na sua  $DL_{100}$ . Foi utilizada a metodologia descrita no **item 3.2** para incubação das amostras e o plaqueamento foi feito como descrito no **item 3.4** com algumas modificações: Após o tempo inicial de incubação (0 h) e a cada 3 h até 21 h, foi feito o plaqueamento utilizando o volume inteiro dos poços dos controles e testes. Após 24 h do plaqueamento foram adquiridas imagens das placas de Petri conforme descrito no **item 3.2**. Esse ensaio foi realizado em triplicata.

A partir deste experimento, todos os testes descritos abaixo foram feitos com parâmetros pré-determinados da  $DL_{100}$  e do tempo de morte.

### 3.6 Análise por microscopia óptica de células *C. tropicalis* incubadas com D-RR

As células foram tratadas como descrito no **item 3.2** com a seguinte diferença: uma concentração de 40.000 cel/mL foram usadas no ensaio para permitir a sua visualização por microscopia óptica, e incubadas com  $23 \mu\text{M}$  do D-RR por 1 e 3 h. Após este período de incubação, as células foram transferidas para as lâminas por 5 min. As células foram então cobertas por lamínulas e analisadas em microscópio óptico (Axio Imager.A2, Zeiss) e visualizadas por contraste interferencial diferencial (DIC, do inglês *differential interference contrast*). As imagens das células foram adquiridas pela câmera AxioCAM MRc5 (Zeiss) e as imagens foram analisadas pelo software Axiovision, versão 4.0 (Zeiss). Como controle positivo as células foram aquecidas a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 min ou foram incubadas com 200 mM de ácido

acético por 30 min.

### 3.7 Estudo do efeito do peptídeo sintético D-RR sobre a permeabilização de membranas de *C. tropicalis*

A análise da capacidade de permeabilizar membranas das células de *C. tropicalis* tratadas com peptídeo sintético D-RR foi avaliada através da utilização do corante fluorescente Sytox green (Molecular Probes), segundo metodologia descrita por THEVISSSEN *et al.* (1999), com algumas modificações. Este corante fluoresce após interagir com ácidos nucleicos e penetra somente nas células com membranas comprometidas. Esse ensaio foi feito como no **item 3.6** com algumas modificações; as células foram incubadas por 30 min do seguinte modo: 15 min com D-RR, após estes 15 min foi adicionado o Sytox green (0,5  $\mu$ M concentração final em dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich)) e incubadas por mais 10 min e então as células foram transferidas para as lâminas por 5 min, dando um tempo total de incubação com o corante de 15 min. O microscópio estava equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção da fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450 – 490 nm e emissão de 500 nm). Controle foi realizado nos mesmos parâmetros citados acima, mas na ausência de D-RR. Para ajuste do microscópio e controle positivo, as células foram aquecidas a 100 °C por 1 min para permeabilização basal da membrana. Este controle positivo foi usado para ajuste dos parâmetros do microscópio para a captura das imagens como intensidade da fluorescência e tempo de exposição que foram os mesmos para todas as aquisições de imagens. A porcentagem de células permeabilizadas, uma indicação de permeabilização da membrana, foi determinada pela contagem do número de células vistas em campos aleatórios do contraste interferencial diferencial e visualizações fluorescentes (imagens analisadas, n=5) para cada amostra. A média de células visualizadas por DIC para cada ensaio (do controle e do teste) foi assumida como 100%.

Para diferenciar se o efeito sobre a membrana era uma ação direta do peptídeo D-RR ou se era um efeito secundário, o experimento foi feito na presença do antioxidante ácido ascórbico (Sigma-Aldrich). O ácido ascórbico foi diluído em água ultrapura estéril, a partir de um estoque de 1 M, armazenado no escuro em geladeira. Inicialmente foram feitos testes para descobrir qual era a concentração não tóxica para *C. tropicalis*. Este experimento foi feito como descrito no **item 3.4** e ao final do experimento, imagens em escala de cinza das placas de Petri foram obtidas como descrito no **item 3.4**. Para os ensaios de microscopia, o experimento foi feito como descrito no parágrafo acima, com as seguintes diferenças: o controle positivo e o

teste com ácido ascórbico (na concentração pré-determinada como descrito acima) foram realizados em uma repetição. As imagens foram adquiridas com o mesmo tempo de exposição. O controle e o tratado com D-RR foram realizados em 3 repetições independentes. Os cálculos da ANOVA unilateral e comparação par a par de Tukey foram feitos com o software GraphPad Prism (versão 8.0).

### **3.8 Ensaio da determinação da indução de Espécies Reativas de Oxigênio intracelular em *C. tropicalis***

Para verificar se no mecanismo de ação do peptídeo sintético D-RR está envolvida a indução de estresse oxidativo, foi realizado um ensaio com a sonda fluorescente 2',7' diclorofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA) como descrito por MELLO *et al.* (2011) com modificações. Esta sonda entra passivamente na célula onde então é desacetilada por esterases intracelulares em diclorofluorescina (DCFH). A DCFH é um produto não fluorescente que quando em contato com ROS é convertido em diclorofluoresceína (DCF). A DCF, por sua vez, possui característica fluorescente e é facilmente visualizada em microscópio óptico. Este ensaio foi feito como descrito no **item 3.7** com as seguintes modificações: as células foram incubadas com 20 µM da sonda H<sub>2</sub>DCFDA. Controle foi realizado apenas na presença da sonda. Para ajuste do microscópio e como controle positivo, a fim de comparar a indução de produção de ROS, as células foram incubadas com 200 mM de ácido acético por 30 min e adicionando a sonda para observação.

Para confirmar se o peptídeo D-RR induz estresse oxidativo a partir da produção de ROS e se o estresse oxidativo induzido por D-RR é o sinal que induz as células de *C. tropicalis* à morte, os experimentos da indução de ROS e da viabilidade, como descrito acima (descrito no **item 3.4**), foram repetidos na presença de 70 µM de ácido ascórbico. Para a microscopia, o experimento foi feito como descrito no parágrafo acima, mas com a presença do ácido ascórbico. A porcentagem de células com estresse oxidativo foi calculada como descrito no **item 3.7**. O controle positivo e o teste com ácido ascórbico foram realizados em uma repetição. As imagens foram adquiridas com o mesmo tempo de exposição. O controle e o tratado com D-RR foram realizados em 3 repetições independentes. Os cálculos da ANOVA unilateral e comparação par a par de Tukey foram feitos com o software GraphPad Prism (versão 8.0). Para verificar se o estresse oxidativo induzido por D-RR é o sinal que induz as células de *C. tropicalis* à morte, realizamos o ensaio na presença do ácido ascórbico (70 mM), esse ensaio foi feito como descrito no **item 3.4**. Esse ensaio foi realizado em duplicata.

### 3.9 Análise da funcionalidade mitocondrial das de *C. tropicalis* tratadas com D-RR

A funcionalidade mitocondrial de *C. tropicalis* quando em presença do peptídeo sintético D-RR foi avaliada através de um ensaio com a sonda Rodamina 123 (Sigma-Aldrich). A Rodamina 123 é uma sonda fluorescente catiônica que tem a capacidade de marcar as mitocôndrias ativas na célula viva devido à alta afinidade ao potencial elétrico das membranas, a energização mitocondrial induz a extinção da fluorescência RH-123 e a taxa de decaimento da fluorescência é proporcional ao potencial da membrana mitocondrial. Este ensaio foi descrito como no **item 3.7**, com as seguintes diferenças: as células foram incubadas por 1 h na presença de D-RR, após esse tempo, foi adicionado a sonda Rodamina 123 na concentração de 20  $\mu\text{M}$ . O controle positivo foi realizado na presença de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) a 2% por 15 min a temperatura ambiente, para causar a perda da funcionalidade mitocondrial e o controle foi realizado na ausência de D-RR. Em seguida, as células foram analisadas por DIC no microscópio óptico equipado com um filtro de fluorescência (comprimento de onda de excitação de 506 nm, comprimento de onda de emissão de 530 nm).

### 3.10 Ensaio de viabilidade celular de células de mamíferos diante do peptídeo sintético D-RR.

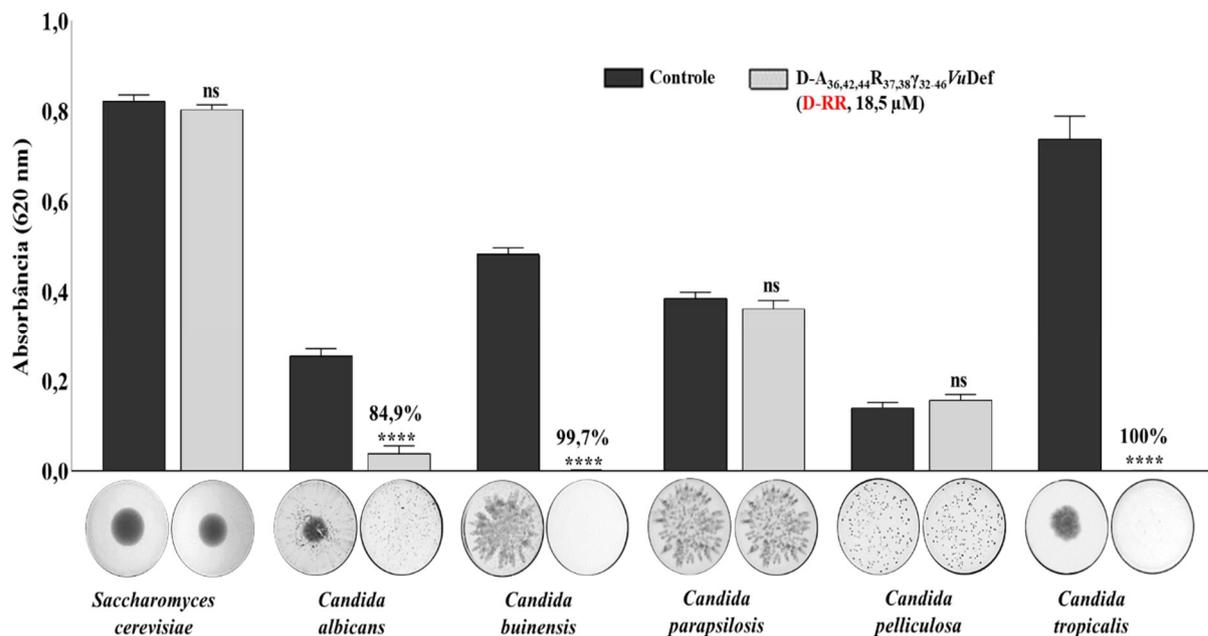
Para estudar a viabilidade das células de mamíferos, macrófagos murinos RAW 264.7 (*American Type Culture Collection*, ATCC TIB-71) e monócitos humanos THP-1 (ATCC TIB-202) foram cultivadas em DMEM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino e gentamicina (50  $\mu\text{g/mL}$ ) em 5% de  $\text{CO}_2$  a 37 °C. As células foram semeadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços separadamente e incubadas com D-RR nas concentrações de 14, 18,5, 23, 27,5, 36,5 e 50  $\mu\text{M}$  por 24 h a 37 °C em 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 24 h de incubação, 10  $\mu\text{L}$  de reagente brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (5 mg/mL, Sigma-Aldrich) foram adicionados e incubados por mais 2 h a 37 °C em 5% de  $\text{CO}_2$ . A solução de MTT foi removida e 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol acidificado foram adicionados para solubilizar o corante formazan cristalino formado. A absorbância (ABS) foi medida a 570 nm e a absorbância para correção de fundo foi determinada a 620 nm. Células não tratadas foram usadas como controle positivo (DO  $1,94 \pm 0,05$ , viabilidade celular -  $98,8 \pm 2,1\%$ ) e células tratadas com detergente Triton X-100 a 1% como controle negativo (DO  $0,14 \pm 0,03$ , viabilidade celular - 0%). A concentração citotóxica de 50% ( $\text{CC}_{50}$ ) foi definida como a

concentração ( $\mu\text{M}$ ) necessária para a redução da viabilidade celular em 50%, calculada por análise de regressão (MOODLEY *et al.*, 2014).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Inibição do crescimento de leveduras pelo peptídeo sintético D-RR.

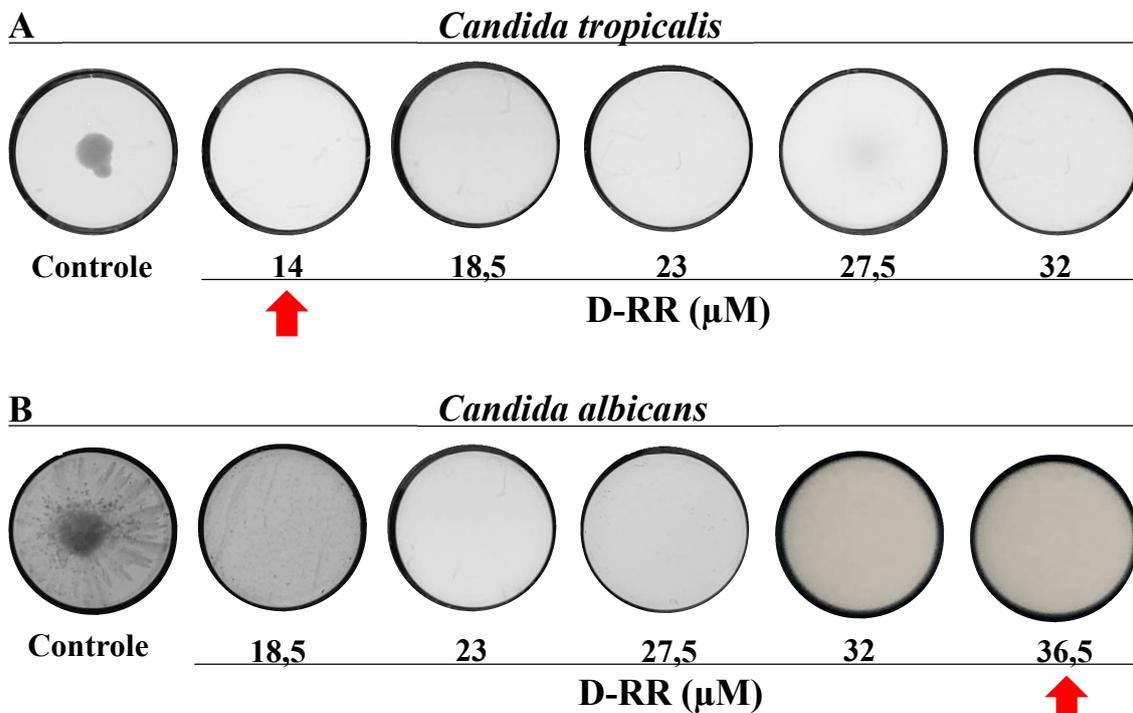
Inicialmente a atividade antimicrobiana do peptídeo sintético D-RR foi confrontada sobre as leveduras em sua concentração de 18,5  $\mu\text{M}$  (concentração usada anteriormente por SOUZA *et al.* 2019). A leitura de absorvância mostrou que D-RR apresentou inibição significativa de 100% para *C. tropicalis*, seguido de uma inibição de 99,7% para *C. buinensis* e 84,9 % para *C. albicans*, como mostrado na figura 12. Ao observarmos os fundos dos poços da placa de 96 poços, a inibição foi compatível com a diminuição da massa de células (Figura 12). As demais leveduras testadas, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa* e *S. cerevisiae*, não foram inibidas significativamente e também não apresentaram alterações no padrão de crescimento no fundo do poço da placa (Figura 12). Diante dos resultados obtidos da forte atividade antimicrobiana e da relevância médica, para continuação dos experimentos escolhemos as leveduras *C. tropicalis* e *C. albicans*.



**Figura 12:** Crescimento das leveduras na ausência (controle) e na presença do peptídeo sintético D-RR na concentração de 18,5  $\mu\text{M}$ . A porcentagem de inibição do crescimento das leveduras é mostrada acima das barras dos testes e as imagens dos fundos dos poços com o padrão de crescimento de cada espécie de levedura são mostradas abaixo das respectivas barras. O ensaio é representativo de um de três. Os asteriscos indicam significância estatística ( $P > 0,05$ ) e ns = não significativo em relação ao controle.

#### 4.2 Mínima concentração inibitória de D-RR de diante das células de *C. tropicalis*

A MIC<sub>100</sub>, foi determinada a partir de concentrações seriadas da concentração inicial de 18,5  $\mu\text{M}$  que apresentou resultado no ensaio anterior. Diante disso, o peptídeo D-RR teve sobre a levedura *C. tropicalis* a MIC<sub>100</sub> determinada de 14  $\mu\text{M}$  (seta vermelha), pois foi a menor concentração em que não apresentou crescimento visível a olho nu, como mostrado na figura 13 (A). Já para a levedura *C. albicans*, a concentração na qual não foi observado o crescimento de células foi 36,5  $\mu\text{M}$  (seta vermelha) como demonstrado na figura 13 (B). Para as outras concentrações testadas uma pequena massa de células foi observada no fundo dos poços, mas esta não foi capturada pela resolução da câmera.



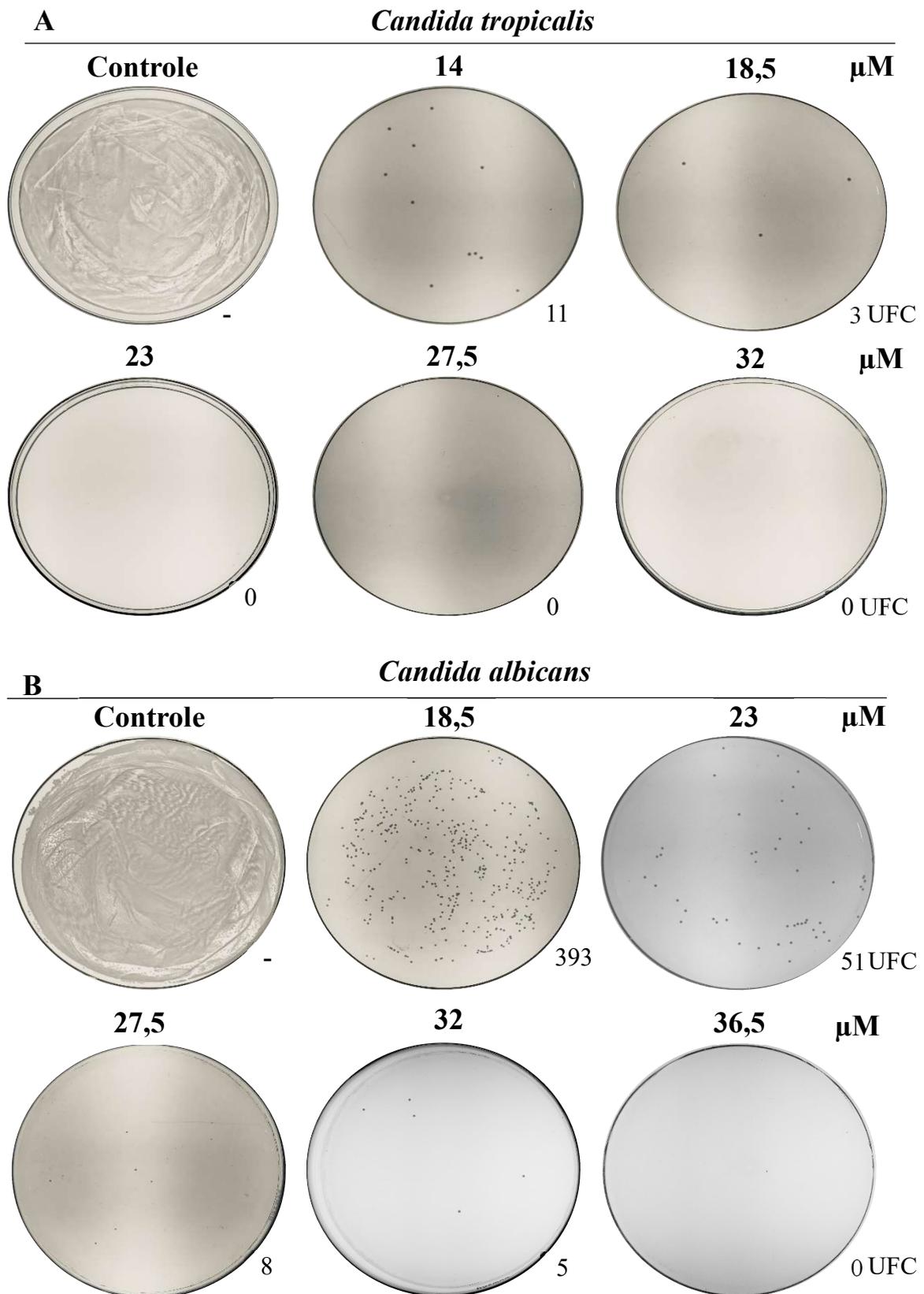
**Figura 13:** Imagens do fundo dos poços ao final do ensaio de 24 h para determinação da mínima concentração inibitória das leveduras diante do peptídeo sintético D-RR. (A) Para *Candida tropicalis* - nenhuma das concentrações testadas apresentaram crescimento visível, sendo considerado 14  $\mu\text{M}$  a MIC<sub>100</sub> (seta vermelha). (B) Para *Candida albicans* - a concentração de 36,5  $\mu\text{M}$  não apresentou crescimento visível no fundo do poço, sendo considerada a MIC<sub>100</sub> (seta vermelha). Para as outras concentrações testadas uma pequena massa de células foi observada no fundo dos poços que não foi capturada pela resolução da câmera. n=3.

#### 4.3 Efeito de D-RR sobre a viabilidade celular de *C. tropicalis*, determinação da (DL<sub>100</sub>)

### **e teste com fluconazol**

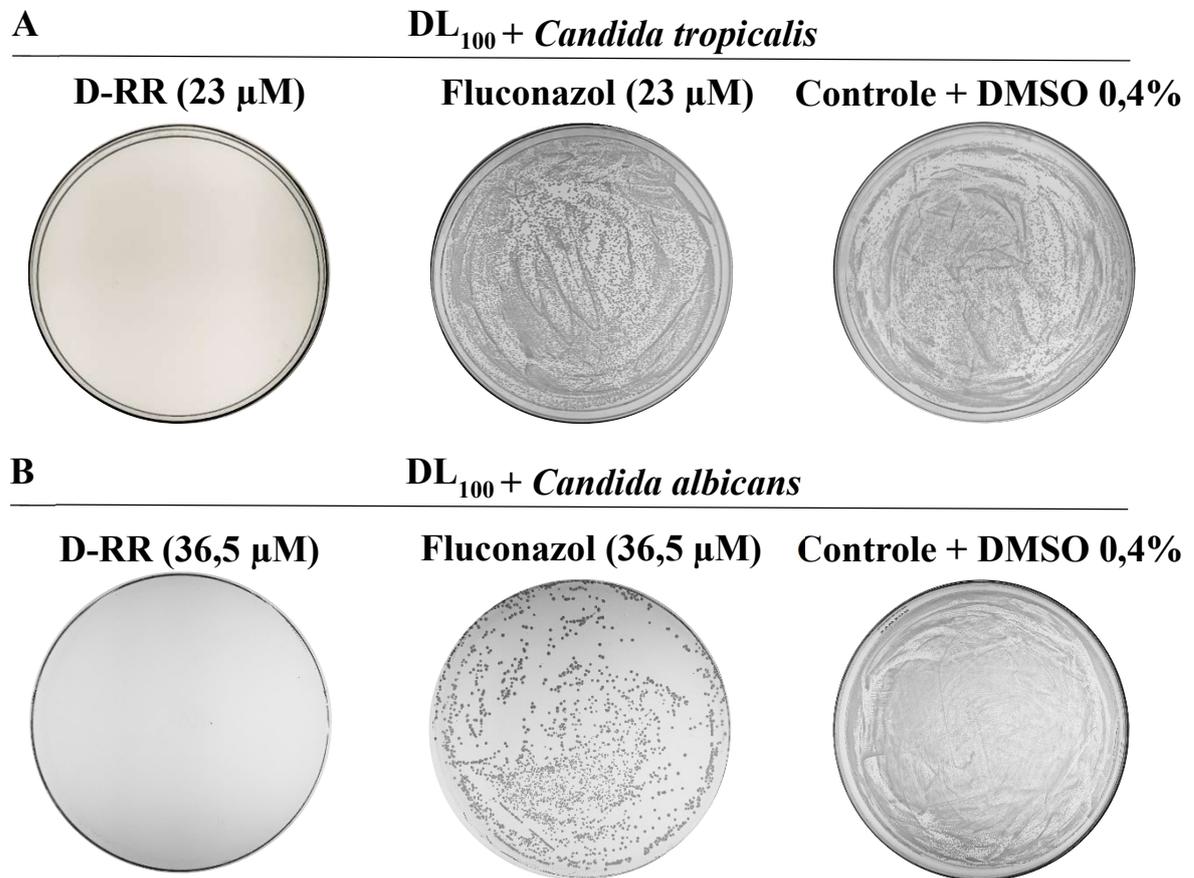
Depois de determinada a MIC<sub>100</sub>, os conteúdos dos poços dos controles e dos respectivos testes foram dispensados em placa de Petri para determinar a viabilidade celular (Figura 14). As células de *C. tropicalis* quando tratadas com o D-RR na concentração da MIC<sub>100</sub> (14 µM), não apresentaram a perda total da viabilidade celular. Por isso concentrações maiores foram testadas e na concentração de 23 µM, apresentou a perda total da viabilidade celular, deste modo essa concentração foi considerada a dose letal (DL<sub>100</sub>) (Figura 14A). Por sua vez, as células de *C. albicans* apresentaram a perda total da viabilidade celular na mesma concentração de sua MIC<sub>100</sub>, assim consideramos sua DL<sub>100</sub> na concentração de 36,5 µM (Figura 14B). Nossos resultados sugerem que D-RR tem efeito fungicida em *C. tropicalis* e *C. albicans*, quando tratados com sua DL<sub>100</sub>.

Após determinadas as DL<sub>100</sub> para ambas as leveduras, confrontamos atividade de D-RR com fluconazol, uma droga de referência no mercado para tratamento antifúngico. Como mostrado na figura 15 o fluconazol quando utilizado nas mesmas concentrações da DL<sub>100</sub> determinadas para D-RR para ambas as leveduras não foi capaz de causar a perda de viabilidade das mesmas. Com isso nossos resultados sugerem que o D-RR apresentou um maior efeito fungicida que o fluconazol quando confrontados na mesma concentração.



**Figura 14:** Imagens das placas de Petri mostrando as colônias de leveduras após 24 h de tratamento com D-RR. (A) Efeito fungicida e  $DL_{100}$  na concentração de 23  $\mu\text{M}$  para células de *Candida tropicalis*. (B) Efeito fungicida e

DL<sub>100</sub> na concentração de 36,5 µM para células de *Candida albicans*, n=3. UFC = Unidade Formadora de Colônias. (-) indica o número excessivo de colônias para ser contado.



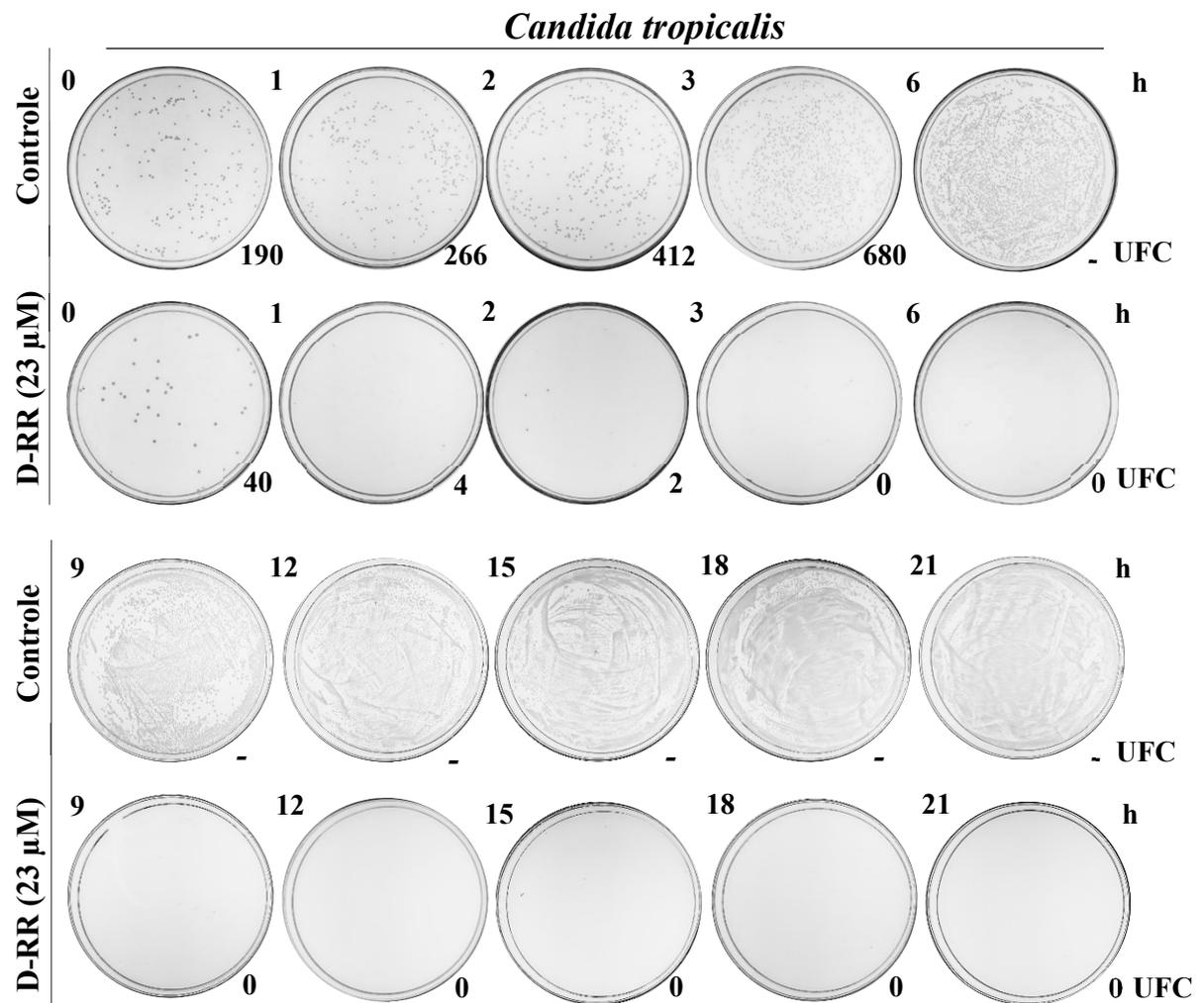
**Figura 15** Imagens das placas de Petri mostrando as colônias de leveduras após 24 h de tratamento com D-RR na sua DL<sub>100</sub>. (A) Viabilidade celular para *C. tropicalis* à frente de D-RR em sua dose letal (DL<sub>100</sub>) e confrontado com fluconazol, na mesma concentração. (B) Viabilidade celular para *C. albicans* à frente de D-RR em sua dose letal (DL<sub>100</sub>) e confrontado com fluconazol, na mesma concentração. Os controles sem a presença do DMSO, estão na figura 14. n=2.

#### 4.4 Cinética de morte celular induzida por D-RR em *C. tropicalis*

Por conta do parâmetro de DL<sub>100</sub> determinado onde D-RR apresentou uma atividade antifúngica melhor, com a DL<sub>100</sub> de 23 µM, a partir deste experimento, decidimos continuar apenas com a levedura mais sensível e com grande relevância médica, e por isso, os ensaios abaixo foram feitos apenas para *C. tropicalis*.

Após confirmado o efeito fungicida do peptídeo com a realização do ensaio de viabilidade, estudamos a cinética de morte para determinar o tempo mínimo em que o peptídeo sintético D-RR, na sua  $DL_{100}$ , leva para causar a perda de viabilidade da população original de *C. tropicalis* no ensaio. Como demonstrado na figura 16, logo após o contato com D-RR (tempo 0 h) já é observada uma queda do número de células viáveis de 79% da população, seguida por uma queda de 97,6% com 1 h, 99,6% com 2 h e 100% após 3 h de incubação. Portanto, após o contato inicial, D-RR induz a morte da população original de *C. tropicalis* no ensaio em 3 h.

Os demais experimentos foram realizados com os parâmetros determinados na  $DL_{100}$  e com tempo de 3 h.

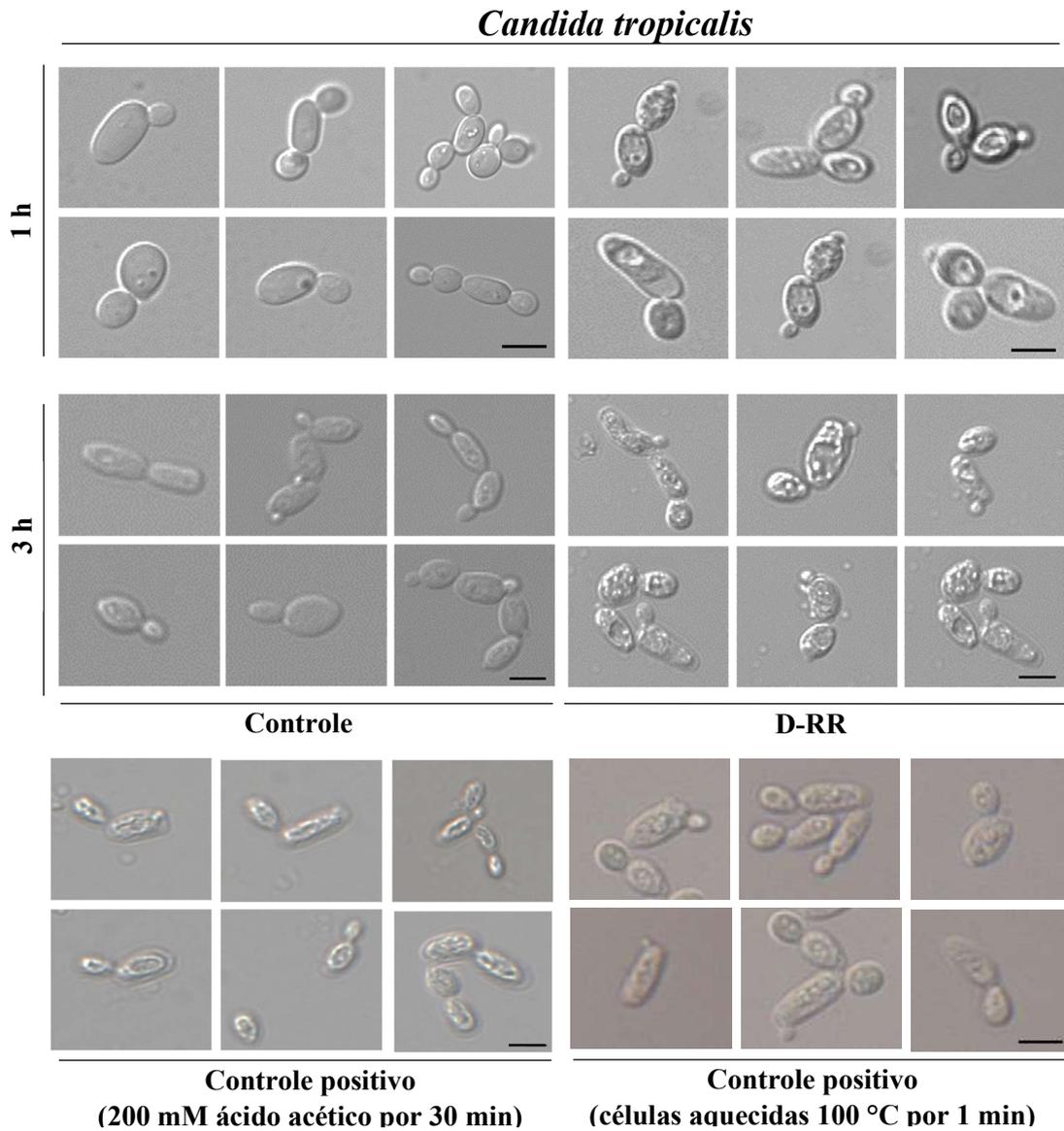


**Figura 16:** Cinética de morte celular de *Candida tropicalis* incubada com D-RR. Imagens das placas de Petri onde as células de *C. tropicalis* foram incubadas com D-RR por 21 h. Observe que nas placas de Petri contendo as amostras de teste, o número de colônias viáveis diminuiu com o aumento do tempo até que a população celular inicial completa perdesse a viabilidade com 3 h de contato. Acima das imagens da placa de Petri são mostrados o

tempo de incubação e abaixo das imagens são mostradas as unidades formadoras de colônias (UFC) em cada intervalo de tempo e (-) indica o número excessivo de colônias para ser contado, n=3.

#### **4.5 Diferenças citoplasmáticas em células de *C. tropicalis* incubadas com D-RR**

Ao dar início as microscopias de fluorescência, percebemos algumas diferenças entre as células tratadas e não tratadas. Diante disso analisamos por microscopia óptica as células de *C. tropicalis* tratadas com D-RR na concentração de 23  $\mu$ M por 1 e 3 h e como mostrado na figura 17, há alterações bem evidentes no citoplasma indicando que o citoplasma das células tratadas está granuloso, como também pode ser visto nas células do controle positivo. Esse resultado sugere que D-RR pode causar alterações estruturais em *C. tropicalis*, que devem ser estudadas através de microscopia eletrônica de transmissão.



**Figura 17:** Imagens de microscopia óptica das células de *Candida tropicalis* incubadas por 1 e 3 h na ausência (controle) e na presença de 23 μM do peptídeo D-RR. Note o citoplasma granulado das células tratadas com D-RR como nas células dos controles positivos. Barras = 5 μm.

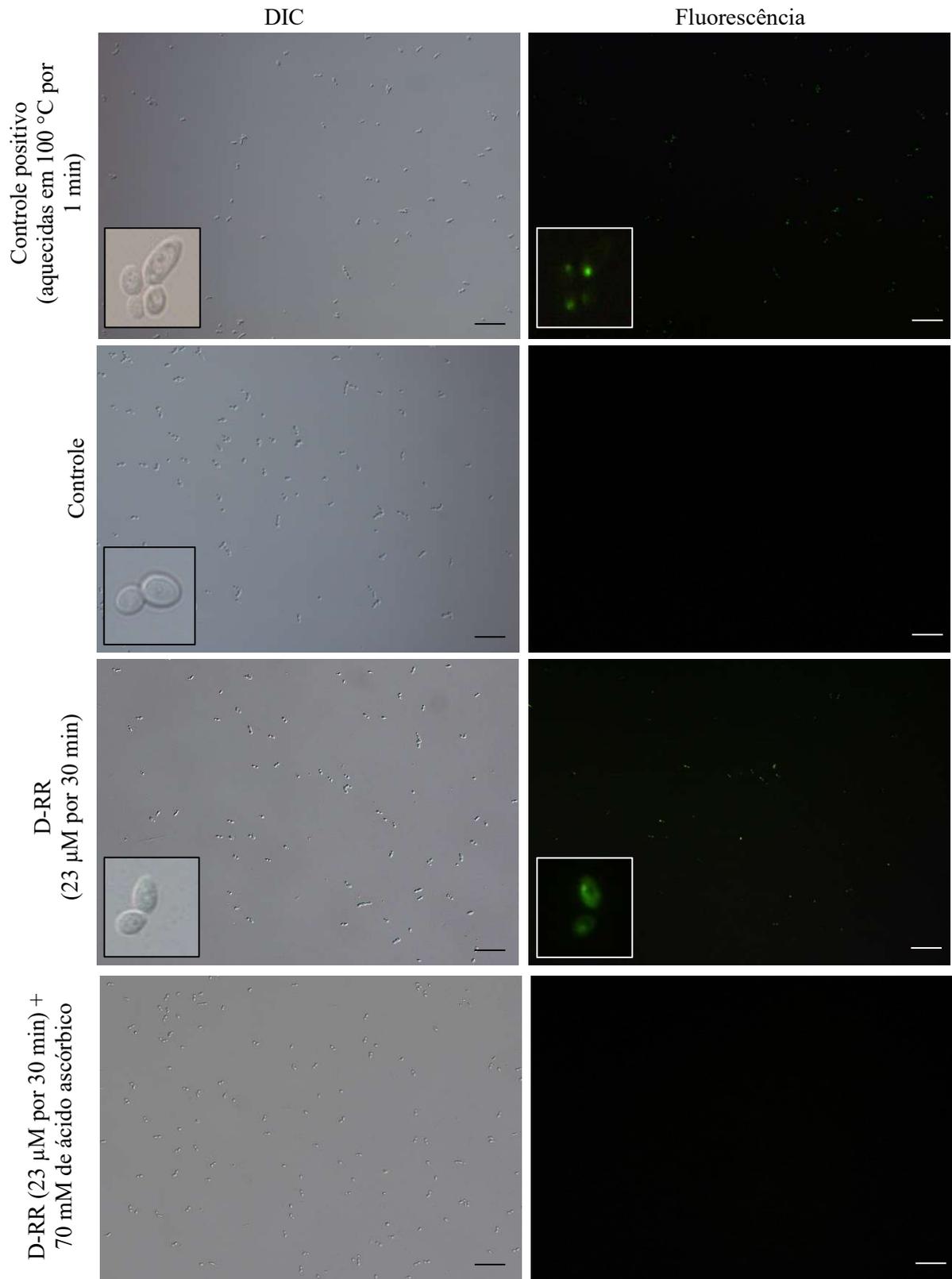
#### 4.6 Efeito do peptídeo sintético D-RR na permeabilização de membranas de *C. tropicalis*

Para observar se o peptídeo sintético D-RR causa a permeabilização da membrana das células de *C. tropicalis*, utilizamos a sonda fluorescente Sytox green. Como mostrado na figura 18, observamos que as células de *C. tropicalis*, ao serem incubadas com 23 μM do peptídeo sintético D-RR por 30 min, apresentou 55,7% de células de *C. tropicalis* fluorescentes, já as leveduras na ausência de D-RR apresentaram apenas 1% das células permeabilizadas. Diante

disso sugerimos que D-RR ao interagir com *C. tropicalis* ocasiona o evento de permeabilização de membrana.

Para verificar se houve um possível envolvimento de ROS na permeabilização resultante do tratamento com D-RR, esse ensaio foi repetido na presença de ácido ascórbico e como pode ser observado na figura 18, as células não foram permeabilizadas. Esse resultado sugere que a permeabilização da membrana é um evento indireto da interação de D-RR com *C. tropicalis*, uma vez que o aumento de ROS pode ser o responsável pela permeabilização da membrana plasmática da célula.

A

*Candida tropicalis*

Continua na próxima página

**B**

Amostras	Número de células em DIC	Número de células fluorescentes	Porcentagem de células permeabilizadas (%)
Controle positivo ( <i>C. tropicalis</i> aquecidas)	70,2±25,2 <sup>a</sup>	68±24,38 <sup>a</sup>	96,08 <sup>a</sup>
Controle	91,6±14,13 <sup>a</sup>	1±1 <sup>b</sup>	1,09 <sup>b</sup>
<i>C. tropicalis</i> + D-RR	69±5,2 <sup>a</sup>	38±16,98 <sup>a</sup>	55,7 <sup>a</sup>
<i>C. tropicalis</i> + D-RR + 70 mM ácido ascórbico	99,6±36,5 <sup>a</sup>	0,4±0,8 <sup>b</sup>	0,80 <sup>b</sup>

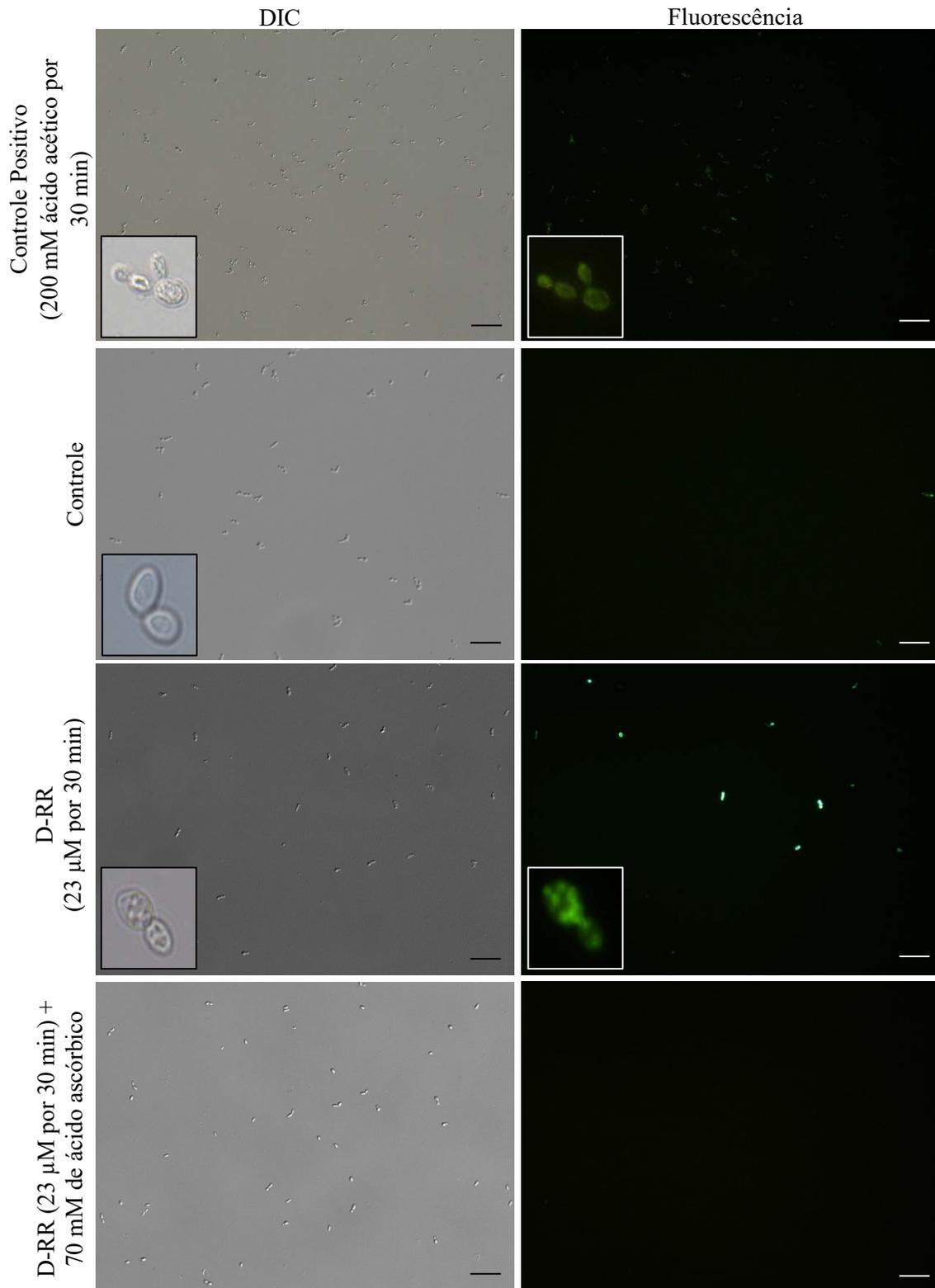
**Figura 18:** Permeabilização de membrana de células de *Candida tropicalis* induzida por D-RR. (A) Imagens de microscopia de fluorescência das células de *C. tropicalis* incubadas com a sonda fluorescente Sytox Green para determinação da permeabilização de membrana a fluorescência verde indica a presença de células permeabilizadas. A imagem dentro da caixa mostra detalhes das células e da fluorescência em um aumento de 630x, as caixas que não foram mostradas, não apresentaram células florescentes. (B) A porcentagem de células permeabilizadas determinada pelo número de células em cinco campos aleatórios das visualizações de DIC e fluorescência das amostras obtidas a partir do ensaio de permeabilização de membranas. A média de células visualizadas por DIC para cada amostra foi considerada como 100%. Letras diferentes denotam diferenças significativas, por ANOVA unilateral e comparação par a par de Tukey ( $P < 0,05$ ) entre todos os testes e seus respectivos controles. Controle positivo e ensaio com ácido ascórbico ( $n=1$ ), controle e D-RR ( $n=3$ ). Barras = 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.7 Efeito do peptídeo sintético D-RR na produção endógena de ROS em *C. tropicalis*

A produção endógena de ROS em células *C. tropicalis* na presença do peptídeo sintético D-RR foi investigada na presença da sonda fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA. As células de *C. tropicalis* ao serem incubadas com 23  $\mu\text{M}$  de D-RR por 30 min, tempo escolhido porque em 1 h de incubação para determinarmos o tempo de morte já conseguimos observar uma queda significativa da população, apresentava 73,2% das células sob estresse oxidativo quando comparadas às células controle na ausência do peptídeo, como mostrado na figura 19. O resultado demonstrado sugere que o peptídeo D-RR ao interagir com as células de *C. tropicalis* induz a produção de ROS endógena ocasionando o estresse oxidativo das células. As imagens foram capturadas com o mesmo tempo de exposição e intensidade de fluorescência, inicialmente ajustados para o controle positivo, células tratadas com ácido acético. O sinal de fluorescência observado para as células tratadas com D-RR se mostra mais intenso e com um

padrão de distribuição dentro da célula diferente do controle positivo que é mais difuso (Figura 19).

Para confirmar se realmente a produção de ROS está envolvido como o mecanismo que leva a morte celular, realizamos um experimento na presença de 70 mM de ácido ascórbico, que é um captador de ROS amplamente conhecido. Esta concentração foi determinada a partir de um teste com diferentes concentrações (Resultado não mostrado). Como consequência deste tratamento com o antioxidante, as células desse ensaio apresentaram apenas 1,17 % de células sob estresse oxidativo, como mostrado na figura 17. Este dado de proteção ao estresse oxidativo na presença do antioxidante é corroborado com a viabilidade celular, pois quando plaqueadas após as 3 h que D-RR leva para matar toda a população de células do ensaio, o antioxidante preveniu a morte de 48,3% das células (Figura 20). Ou seja, ROS parece desempenhar um papel importante na morte celular e esse resultado sugere que a produção de ROS endógena é um evento direto da interação com o peptídeo sintético D-RR.

A *Candida tropicalis*

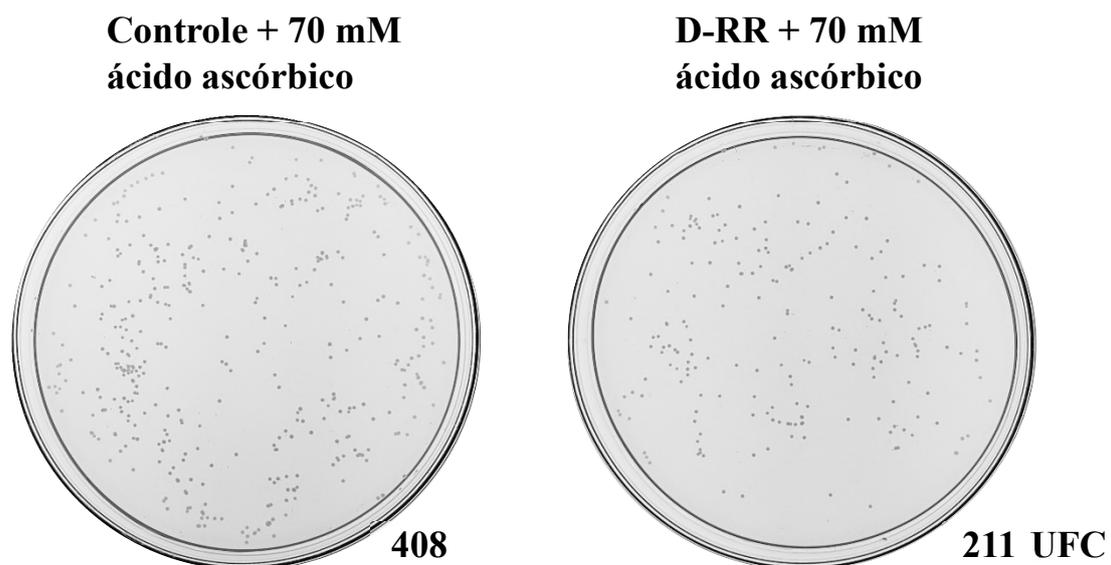
Continua na próxima pagina

**B**

Amostras	Número de células em DIC	Número de células fluorescentes	Porcentagem de células com estresse oxidativo (%)
Controle positivo (200 mM ácido acético)	74,8±47,55 <sup>a</sup>	73,2±47,14 <sup>a</sup>	97,80 <sup>a</sup>
Controle	51,6±12,15 <sup>a</sup>	3,4±1,3 <sup>b</sup>	6,5 <sup>b</sup>
<i>C. tropicalis</i> + D-RR	26±8,1 <sup>a</sup>	18,8±5,8 <sup>a</sup>	72,3 <sup>a</sup>
<i>C. tropicalis</i> + D-RR + 70 mM ácido ascórbico	51±22,0 <sup>a</sup>	0,6±0,8 <sup>b</sup>	1,17 <sup>b</sup>

**Figura 19:** Estresse oxidativo em células de *Candida tropicalis* induzido por D-RR. (A) Imagens de microscopia de fluorescência das células de *C. tropicalis* incubadas com a sonda fluorescente 2',7' diclorofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA) para determinação de ROS. A fluorescência verde indica a presença de células com estresse oxidativo. A imagem dentro da caixa mostra detalhes das células e da fluorescência em um aumento de 630x; as caixas que não foram mostradas, não apresentaram células fluorescentes. (B) Porcentagem de células com estresse oxidativo determinada pelo número de células em cinco campos aleatórios das visualizações de DIC e fluorescência das amostras obtidas no ensaio ROS. A média do número de células no campo claro de cada amostra foi considerada 100%. Letras diferentes denotam diferenças significativas, por ANOVA unilateral e comparação par a par de Tukey (P <0,05) entre todos os testes e seus respectivos controles. Controle positivo e ensaio com ácido ascórbico (n=1), controle e D-RR (n=3). Barras = 20 µm.

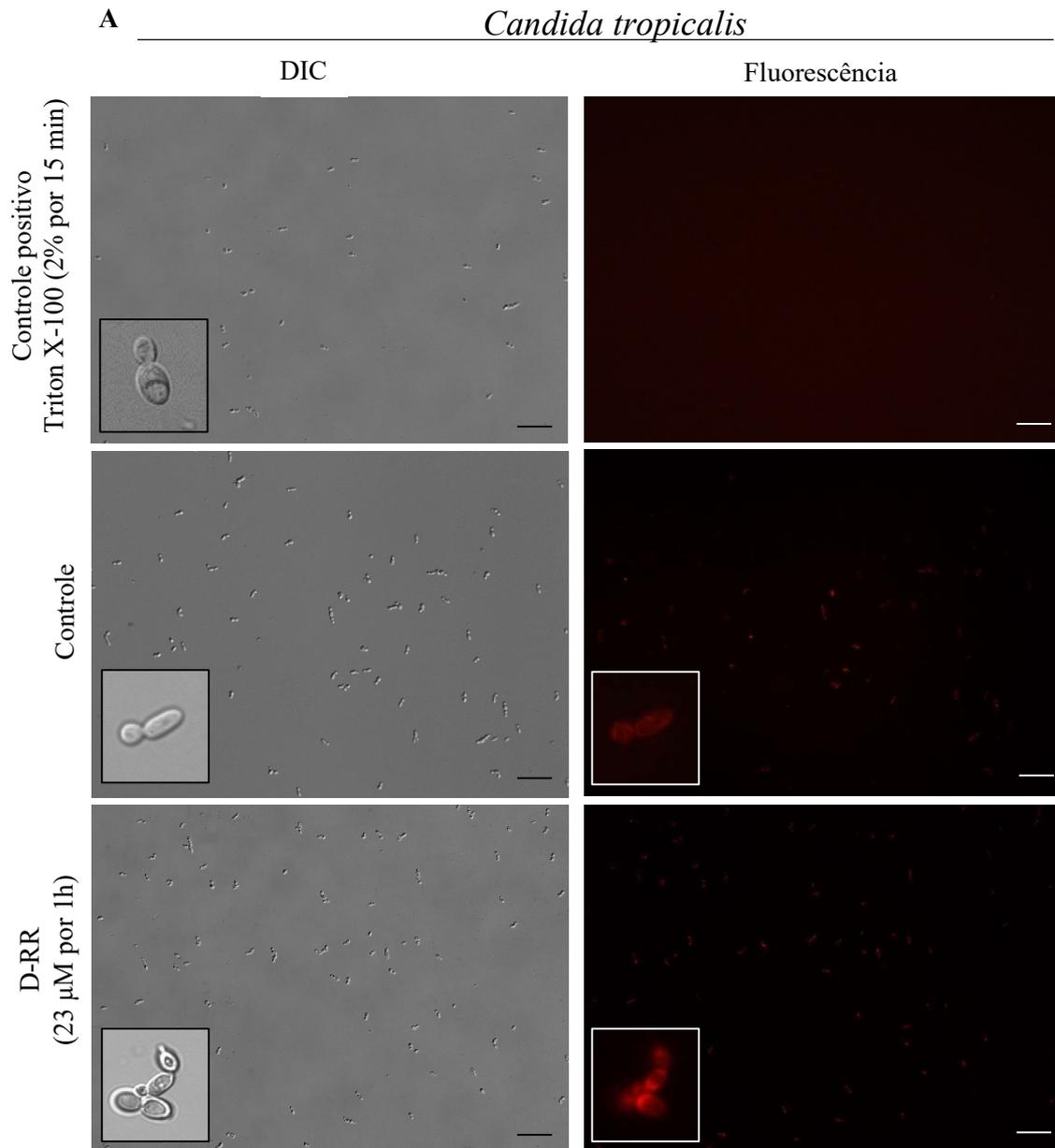
### *Candida tropicalis*



**Figura 20:** Imagens das placas de Petri mostrando as colônias de leveduras após de tratamento com D-RR na presença de 70 mM do antioxidante ácido ascórbico por 3 h. Note que o tratamento com ácido ascórbico preveniu a morte de 48,3% das células. Imagem representativa de um experimento. UFC, unidades formadoras de colônias. n=2.

#### **4.8 Efeito do peptídeo sintético na funcionalidade mitocondrial de *C. tropicalis***

Analisamos a funcionalidade mitocondrial através da sonda fluorescente Rodamina 123. Como demonstrado na figura 21, as células tratadas com D-RR não perderam a funcionalidade mitocondrial apresentando 95,2% das células fluorescentes. Podemos observar, que quando comparamos o sinal de fluorescência do tratado e do controle, que o sinal de fluorescência é mais forte nas células tratadas com D-RR, ressaltando que todas as imagens foram obtidas com o mesmo tempo de exposição e intensidade de fluorescência. Assim, nossos resultados sugerem uma forte atividade das mitocôndrias em *C. tropicalis* tratadas com peptídeo D-RR para o tempo estudado.

**B**

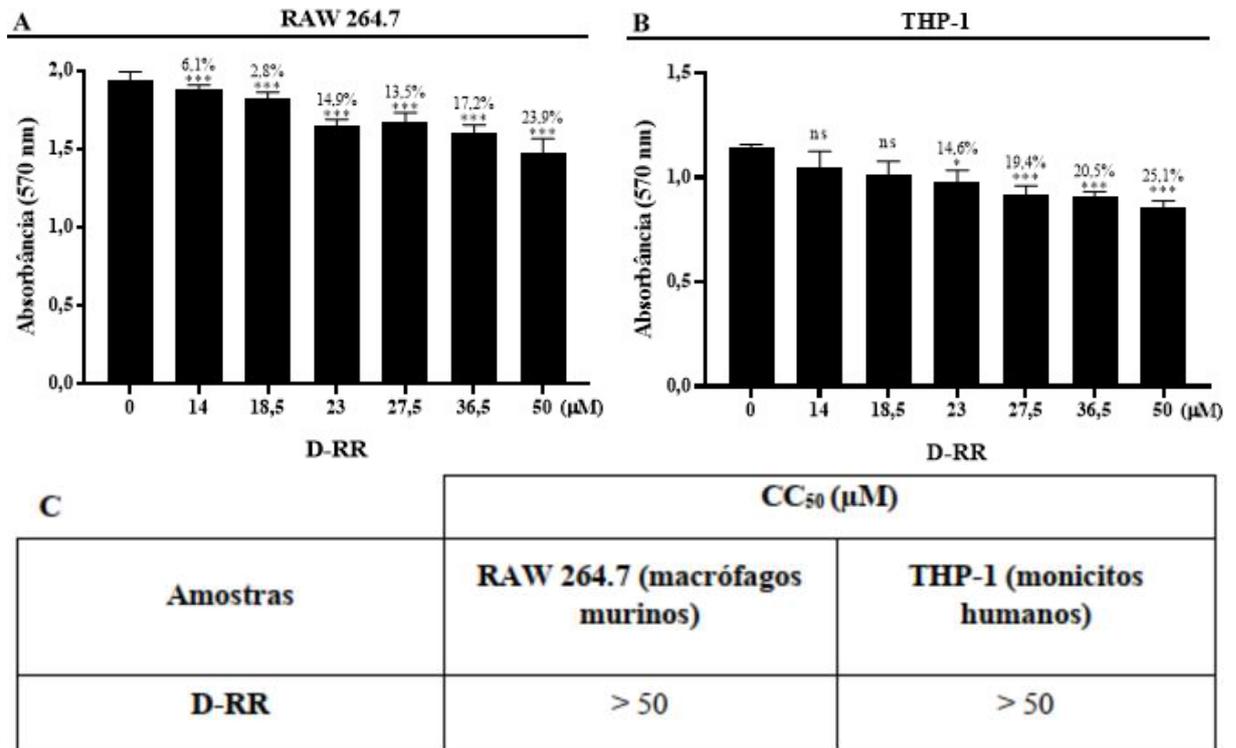
Amostras	Número de células em DIC	Número de células fluorescentes	Porcentagem de células com mitocôndrias funcionais (%)
Controle positivo ( <i>C. tropicalis</i> + Triton 2% por 15 min)	31,2±11,38	2,8±3,2	8,9 <sup>a</sup>
Controle	70,6±40,32 <sup>a</sup>	70,6±40,32 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>
<i>C. tropicalis</i> + D-RR	67,8±10,35 <sup>a</sup>	64,6±10,13 <sup>a</sup>	95,2 <sup>b</sup>

**Figura 21:** Funcionalidade mitocondrial em células de *Candida tropicalis* induzido por D-RR. (A) Imagens de microscopia de fluorescência das células de *C. tropicalis* incubadas com a sonda fluorescente Rodamina 123 para determinação da funcionalidade mitocondrial. A fluorescência vermelha indica a presença de células com

mitocôndrias funcionais. A imagem dentro da caixa mostra detalhes das células e da fluorescência em um aumento de 630x, as caixas que não foram mostradas, não apresentaram células fluorescentes. (B) Porcentagem de células com mitocondrias funcionais determinada pelo número de células em cinco campos aleatórios das visualizações de DIC e fluorescência das amostras obtidas do ensaio de funcionalidade mitocondrial. A média de células visualizadas em DIC para cada amostra foi considerado como 100%. Letras diferentes denotam diferenças significativas, por ANOVA unilateral e comparação par a par de Tukey ( $P < 0,05$ ) entre todos os testes e seus respectivos controles. Controle positivo (n=1), controle e D-RR (n=3). Barras = 20  $\mu\text{m}$ .

#### **4.9 Viabilidade celular de células de mamíferos macrófagos murinos e monócitos humanos em frente de D-RR**

Testamos a toxicidade do peptídeo D-RR para duas linhagens de células de mamíferos. O peptídeo D-RR apresentou baixa toxicidade para ambos os tipos de celulares estudados (Figura 22), conforme indicado pela baixa redução da atividade metabólica. Para D-RR, na  $DL_{100}$  determinado para *C. tropicalis* (23  $\mu\text{M}$ ), a atividade metabólica dos macrófagos murinos foi inibida em 14,9% e dos monócitos humanos foi inibida em 14,6%. Usando a  $DL_{100}$  determinada para *C. albicans* (36,5  $\mu\text{M}$ ), macrófagos murinos e monócitos humanos foram inibidos metabolicamente em 17,2 e 20,5%, respectivamente. Mesmo na concentração mais alta testada, de 50  $\mu\text{M}$ , que é muito maior do que o  $LD_{100}$  de D-RR para as leveduras testadas, D-RR reduziu a atividade metabólica de macrófagos murinos e monócitos humanos em 23,9 e 25,1%, respectivamente (Figura 22). A concentração citotóxica de 50% ( $CC_{50}$ ) para peptídeo D-RR para as duas linhagens celulares foi superior a 50  $\mu\text{M}$  (Figura 22C). Portanto, esses resultados sugerem que D-RR tem uma baixa toxicidade para as células de mamíferos testadas.



**Figura 22:** Viabilidade de células RAW 264.7 e THP-1 em resposta ao peptídeo sintético D-RR. As curvas de dose resposta das células RAW 264.7 (A) e THP-1 (B) foram construídas após 24 h de tratamento com D-RR. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico baseado em MTT. O valor da densidade óptica (DO) dos ensaios de MTT foi traçado em relação ao controle positivo ( $1,94 \pm 0,05$  DO), células não tratadas. Células tratadas com Triton X-100 foram usadas como controle negativo da viabilidade celular ( $0,14 \pm 0,03$  DO). (C) Valores de concentração citotóxica (CC<sub>50</sub>) de D-RR sobre macrófagos RAW 264,7 e culturas de monócitos THP-1 por ensaio de MTT. As barras para cada amostra referem-se às concentrações testadas em ordem crescente. Os resultados apresentados são valores médios obtidos em três experimentos, cada um feito em duplicata. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo não tratado ( $0 \mu\text{M}$ ) determinado pelo teste de Tukey.

## 5. DISCUSSÃO

As defensinas de plantas são conhecidas desde o início da década de 90 (COLILLA et al., 1990; MENDEZ *et al.*, 1990) e seu mecanismo de ação contra fungos vem sendo estudado durante três décadas, e ainda não foi completamente elucidado (HAYES et al., 2018; PARISI et al., 2019; SOARES *et al.*, 2016). Neste trabalho estudamos a atividade antimicrobiana de um peptídeo chamado D-RR, derivado do  $\gamma$ -core de defensina de *V. unguiculata*, sobre leveduras.

Em um primeiro momento, investigamos o potencial antimicrobiano de D-RR, sobre as seis leveduras: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa* e *C. buinensis*, visto o aumento considerável na incidência de infecções causadas por leveduras deste gênero, (FISHER *et al.*, 2018) e *S. cerevisiae*, considerada um organismo modelo. Os nossos ensaios demonstraram uma forte atividade antifúngica de D-RR testada nas mesmas condições de DD, que apresentou inibições para *C. tropicalis*, *C. buinensis* e *C. albicans*, diferente do que foi observado para DD (Figura 11 da Introdução; Figura 12). As modificações realizadas pontualmente em regiões específicas da estrutura primária de D-RR aumentando sua carga líquida positiva e sua mudança na conformação (quiralidade) foi suficiente para uma melhora em sua atividade antifúngica quando comparado ao peptídeo original DD (TOLEDO *et al.*, 2021; Figura 11; Figura 12). A mudança de quiralidade e a síntese de peptídeos com D-aminoácidos em análogos mais curtos do peptídeo Bactenecin7 (derivado de catelicidina de grânulos de neutrófilos bovinos) resultou na perda completa da atividade antibacteriana, mas melhorou a atividade antifúngica frente *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme* (ABIRAJ *et al.*, 2002). O mesmo pode ser visto com o peptídeo cíclico GS<sub>14</sub> (derivado da gramicidina S) que foi essencialmente inativo contra a levedura *C. albicans*, mas todos os 14 peptídeos sintetizados com aminoácidos na conformação D (D-enantiômeros) exibiram atividade antifúngica variando de moderada a forte (CHEN *et al.*, 2007). Curiosamente, a estrutura primária do  $\gamma$ -core de MtDef<sub>4</sub> (defensina de *Medicago truncatula*, luzerna), mas não a estrutura primária do  $\gamma$ -core de MsDef<sub>1</sub> (defensina de *Medicago sativa*, alfafa), possui atividade antifúngica sobre *F. oxysporum*, sendo MtDef<sub>4</sub> mais hidrofóbico e com maior carga líquida positiva que MsDef<sub>1</sub> (SAGARAM *et al.*, 2011). Este resultado demonstra que peptídeos projetados de forma racional melhoram a atividade antimicrobiana, e podem ser cada vez mais motivos de estudo. Um fato importante é que nem sempre há sucesso na síntese de peptídeos sintéticos, como aconteceu com GMA<sub>1</sub> e GMA<sub>1</sub>-L, derivados do  $\gamma$ -core de MsDef<sub>1</sub> que perderam sua atividade biológica quando comparados com a defensina original e GMA<sub>4</sub>-L derivados de MtDef<sub>4</sub>, que teve sua atividade reduzida (MUÑOZ *et al.*, 2014; SAGARAM *et*

*al.*, 2011). O mesmo aconteceu também para  $\gamma_{33-41}PvD_1$  derivados de  $PvD_1$  (defensina de *Phaseolus vulgaris*, feijão comum) que perdeu sua atividade (MELLO *et al.*, 2019). Os quatro peptídeos citados tinham quantidade de aminoácidos inferiores a 15 resíduos, diferente de D-RR que tem 15 resíduos, o que pode ter influenciado na perda da atividade inibitória sobre fungos. Outros peptídeos como  $\gamma_{31-45}PvD_1$ ,  $\gamma_{33-41}PvD_1^{++}$ , derivados da defensina  $PvD_1$ , apresentaram atividade inibitória superior a 50% sobre levedura *C. albicans* em concentrações superiores que 150  $\mu\text{M}$  (MELLO *et al.*, 2019). Em comparação, D-RR apresentou atividade superior a 50% de inibição sobre *C. albicans* e *C. tropicalis* abaixo da concentração de 18,5  $\mu\text{M}$ , confirmando assim sua forte atividade antifúngica em baixas concentrações, mostrando ter vantagem terapêutica e reforçando a ideia que peptídeos sintéticos podem ser mais eficientes que os naturais (RAJASEKARAN *et al.*, 2018).

Seguindo os estudos com D-RR, escolhemos as duas leveduras, *C. tropicalis* e *C. albicans*, devido ao maior interesse clínico e porque apresentaram o maior percentual de inibição de acordo com o primeiro ensaio antimicrobiano. O próximo passo da pesquisa foi determinar a  $\text{MIC}_{100}$  de D-RR para cada levedura. Nossos resultados indicam que a  $\text{MIC}_{100}$  para *C. tropicalis* foi de 14  $\mu\text{M}$  e para *C. albicans* foi de 36,5  $\mu\text{M}$  (Figura 13). Em outro trabalho com o objetivo de identificar as regiões da defensina  $OsAFP_1$  (defensina de *Oryza sativa japonica*, arroz) associadas à atividade antifúngica, foram projetados oito peptídeos (peptídeos 1–8), mas suas MICs não puderam ser determinadas porque estavam acima da concentração máxima testada de 25  $\mu\text{M}$ , diferente da defensina original que sua  $\text{MIC}_{100}$  era de 4  $\mu\text{M}$  (OCHIAI *et al.*, 2018). Outros peptídeos desenhados apresentaram  $\text{MIC}_{100}$  mais altas em relação a D-RR sobre *C. albicans*, como:  $\gamma_{31-45}PvD_1^{++}$  de 73,4  $\mu\text{M}$  (MELLO *et al.*, 2019). Determinar a  $\text{MIC}_{100}$  em estudos clínicos é de suma importância para avaliar o potencial antimicrobiano de novas substâncias, assim como a avaliação da vulnerabilidade, e também a resistência microbiana, fortalecendo assim os estudos para possível alvos terapêuticos (SOARES *et al.*, 2016; WIEGAND *et al.*, 2008).

Após determinação da  $\text{MIC}_{100}$ , o volume final dos poços foi dispensado sobre placas de Petri. O resultado mostrou que a concentração considerada a  $\text{MIC}_{100}$  para *C. tropicalis* permitiu a formação de 11 UFC (Figura 14A). Autores como SOARES *et al.* (2016) sugerem a partir de um estudo com a defensina  $ApDef_1$  (defensina de *Adenanthera pavonina*, olho-de-dragão) sobre *S. cerevisiae* que em concentrações mais baixas, as células da levedura podem montar uma resposta de defesa que reverte a via que leva à morte celular induzida por  $ApDef_1$ . Devido a esta observação, pode gerar um erro na interpretação dos resultados relacionados nos mecanismos de morte celular. Essas respostas de defesa também foram observadas na ação de

DmAMP<sub>1</sub> e na ação de RsAFP<sub>2</sub> sobre *S. cerevisiae* ativando a via de integridade da parede celular (CWI, do inglês *cell wall integrity*). Já a ação de NaD<sub>1</sub> sobre *C. albicans* foi observada como resposta a ativação da via alta osmolaridade/glicerol (HOG, do inglês *high osmolarity/glycerol*) (HAYES *et al.*, 2013, 2018; PARISI *et al.*, 2019). Com isso é de suma importância utilizar a concentração letal do agente antimicrobiano para o entendimento de vias que levam o microrganismo à morte, pois assim evitam que vias de sinalização de morte sejam confundidas com vias de sinalização de resposta da recuperação dos mesmos (SOARES *et al.*, 2016). Diante disso, determinamos a DL<sub>100</sub> de D-RR como 23 µM (Figura 14A), apresentando assim um efeito fungicida sobre *C. tropicalis*. O resultado foi interpretado da mesma forma para *C. albicans*, apresentando a DL<sub>100</sub> na concentração 36,5 µM (Figura 14B), confirmando também um efeito fungicida. Este resultado é comparável à de outras defensinas como NaD<sub>1</sub>, DmAMP<sub>1</sub> e a OsAFP<sub>1</sub> que inibiram completamente o crescimento celular de *C. albicans*, demonstrando também um efeito fungicida (HAYES *et al.*, 2013; OCHIAI *et al.*, 2018). O resultado fungicida de D-RR para as duas espécies de leveduras do gênero *Candida* é uma importante característica quando se pensa no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, visto que compostos fungistáticos tem uma maior chance de selecionar de modo mais rápido a resistência em microrganismos (LEVY E BONNIE, 2004; KOTACZKOWSKA e KOTACZKOWSKI, 2016; VIEIRA *et al.*, 2015; ONYEWU *et al.*, 2003).

Uma vez determinada a DL<sub>100</sub> de D-RR para as leveduras estudadas, um ensaio foi feito confrontando os resultados da DL<sub>100</sub> de D-RR com o fármaco fluconazol, um dos principais antifúngicos usados para o controle de candidíases (COWEN *et al.*, 2002; FORD *et al.*, 2015; ROBBINS *et al.*, 2016). Esses compostos sintéticos heterocíclicos exercem atividade antifúngica bloqueando a síntese de ergosterol, um constituinte chave da membrana celular de fungos, que leva a perda da estabilidade da membrana causando permeabilidade e também perda de função das enzimas ligadas à membrana, levando assim ao acúmulo de intermediários esteróis tóxicos (LIU *et al.*, 2020). O fluconazol foi confrontado nas mesmas concentrações de D-RR em sua DL<sub>100</sub> determinada para *C. tropicalis* (23 µM) e *C. albicans* (36,5 µM). Nossos resultados indicam que o fluconazol não foi capaz de inibir a formação de colônias (Figura 15). Portanto, fluconazol teve um efeito fungistático sobre as leveduras o que é uma limitação adicional dos azólicos, pois apenas inibem o crescimento de *Candida* sem matar esses patógenos. Deste modo impõem forte pressão de seleção direcional e favorecendo seleção de resistência (LIU *et al.*, 2020). Um exemplo alarmante, é a resistência do patógeno emergente *C. auris* ao fluconazol, como mostrado em um estudo de 350 isolados clínicos em hospital da Índia demonstrando que 90% desses isolados apresentaram suscetibilidade reduzida ao

fluconazol (CHOWDHARY *et al.*, 2018). O número de agentes antifúngicos é limitado e a maioria disponível são fungistáticos. Com isso, a descoberta de novos antifúngicos com melhor atividade fungicida e atividade de amplo espectro contra fungos resistentes a drogas é urgente (CAMPOY E ADRIO, 2017). Neste sentido os resultados de D-RR, que apesar de não serem testados para cepas resistentes, apresentam efeito fungicida para cepas do gênero *Candida*, sendo assim um novo candidato a para o desenvolvimento de novos compostos antifúngicos.

Um outro resultado importante de D-RR foi a baixa toxicidade para duas linhagens de células de mamíferos, macrófagos murinos RAW 264.7 e monócitos humanos THP-1 (Figura 22), como demonstrado pela baixa redução metabólica apresentada pelas células testadas. A concentração citotóxica de 50% (CC<sub>50</sub>) de D-RR para as duas linhagens celulares foi superior a 50 µM (Figura 22C), muito acima da utilizada para inibição das leveduras. Este resultado indica a capacidade de diferenciação entre leveduras e células de mamíferos por D-RR, o que é de grande relevância quando se trata de pesquisa para descoberta de um novo fármaco. Nossos resultados estão de acordo com diversos estudos de defensinas que também não apresentam toxicidade para células de mamíferos como a defensina *RsAFP<sub>2</sub>* (de sementes de *Raphanus sativus* L., rabanete), eficaz contra candidíase murina (TAVARES *et al.*, 2008), a defensina *PsD<sub>1</sub>* (das sementes de *Pisum sativum*, ervilha) que não interage com membranas ricas em colesterol, limitando os efeitos colaterais nas células de mamíferos (GONÇALVES *et al.*, 2012), e o peptídeo recombinante *rHsAFP1* (defensina de *Heuchera sanguinea*, sinos de coral) que foi considerado não tóxico para as células HepG2 humanas (VRIENS *et al.*, 2015). As membranas fúngicas compartilham muitas características com as membranas dos mamíferos, com apenas algumas diferenças, como no conteúdo de esfingolípídios, fosfatidilinositol (PI) e o esterol, principal sendo o ergosterol (RAUTENBACH *et al.*, 2016). Estes dados podem explicar a seletividade das defensinas que se ligam preferencialmente ao lípídio II (WILMES *et al.*, 2011), os esfingolípídios fúngicos manosildiinositol fosforilceramida (M(IP)<sub>2</sub>C) (THEVISSSEN *et al.*, 2003a) e glucosilceramida (GlcCer) (THEVISSSEN *et al.*, 2003b), ácido fosfatídico (PA) (KVANSAKUL *et al.*, 2016; PAYNE *et al.*, 2016) e fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PI(4,5)P<sub>2</sub>) (BAXTER *et al.*, 2015; POON *et al.*, 2014). Estes dados podem explicar o baixo efeito citotóxico de defensinas para células de mamíferos, o que as tornam fortes candidatas para o uso terapêutico (CARVALHO E GOMES 2011; LAY *et al.*, 2019). Nossos resultados em conjunto sugerem que D-RR é um bom candidato para o desenvolvimento de drogas antifúngicas para *Candida*.

Os mecanismos de ação das defensinas que levam à inibição dos fungos ainda não foram totalmente elucidados. Estes também podem variar de defensina para defensina, e até

mesmo da própria defensina em relação a outro microrganismo, sendo, portanto, mais complexos do que a simples permeabilização de membrana induzida por muitos AMPs (PARISI *et al.*, 2019). Pelos motivos expostos acima, decidimos utilizar os parâmetros iniciais já determinados como a MIC<sub>100</sub>, DL<sub>100</sub> e tempo de morte, para dar continuidade aos trabalhos para as possíveis caracterizações de mecanismos de ação de D-RR sobre a levedura *C. tropicalis*. Adicionalmente, *C. tropicalis* tem apresentado aumento da resistência aos azóis, e principalmente o fluconazol, e como mecanismo de resistência apresenta a atividade de bombas de efluxo e alterações na biossíntese do ergosterol (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Para esta espécie de levedura também tem sido observado o aumento, em uma escala global, de candidêmias em pacientes imunocomprometidos (KOTHAVADE *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2016). Todos estes fatores tornam *C. tropicalis* com grande relevância para a saúde pública.

A princípio, com base no efeito fungicida de D-RR, determinamos o tempo em que D-RR em sua DL<sub>100</sub>, após o contato inicial com *C. tropicalis*, levou a morte celular da levedura. A partir de 0 h (contato inicial) já foi possível observar que uma subpopulação de células de *C. tropicalis* morreu, conforme indicado pela redução de 79% das UFCs e nenhuma formação de colônias com 3 h de contato. Diante deste resultado descartamos a possibilidade do ciclo celular fazer parte do mecanismo de ação de D-RR sobre *C. tropicalis*, uma vez que não houve uma queda gradual da população ao longo do tempo. Resultados contrastantes foram reportados para a defensina *ApDef*<sub>1</sub>, que apresentou uma perda gradual da população de *S. cerevisiae*, levando à morte total da população com 18 h. Por outro lado, as células sincronizadas com hidroxiurea (HU), que é um inibidor da divisão celular especificamente na fase G<sub>1</sub>/S por inibir a síntese de DNA, morreram com 3 h o que indica um possível envolvimento do ciclo celular no processo de morte (SOARES *et al.*, 2016). Corroborando com este dado do possível comprometimento do ciclo celular, foi demonstrado para a defensina *PsD*<sub>1</sub>, via triagem pelo método de sistema duplo híbrido em levedura, a interação com uma proteína relacionada com o ciclo celular (cyclina F) do fungo *Neurospora crassa* (LOBO *et al.*, 2007). Alguns peptídeos após a interação com a célula alvo, causam a morte muito rápida, como mostrado para D-RR com 3 h para *C. tropicalis* (Figura 16). Estudos mostram que alguns peptídeos têm esta propriedade de matar as células alvo de forma muito rápida, como a histatina 5 (peptídeo antifúngico da saliva humana), que levou as células de *C. albicans* à morte e liberação de todo o seu ATP, mas continuaram a respirar por 1,5 h (HELMERHORST *et al.*, 2001). Células de *C. albicans* tratadas por 2 h com pleurocidina (isolada da secreção da mucosada pele do peixe *Pleuronectes americanus*, linguado do inverno) sofrem estresse oxidativo pelo aumento de ROS intracelulares. O peptídeo também afeta o potencial de membrana mitocondrial, ativa metacaspase e induz

externalização da fosfatidilserina (CHO *et al.*, 2011). Outros peptídeos como a gomesina (isolada de hemócitos de *Acanthoscurria gomesiana*, tarântula) também é de ação rápida uma vez que ela aumenta a quantidade de iodeto de propídio em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y logo 1 h após o tratamento, o que sugere morte celular necrótica (SOLETTI *et al.*, 2010).

Outro mecanismo de ação relatado para AMPs em geral, assim como para as defensinas de plantas, é a permeabilização de membrana. Essas alterações na permeabilidade da membrana podem gerar uma entrada de  $\text{Ca}^{+2}$ , efluxo de  $\text{K}^{+}$  e colapso no potencial de membrana, sendo este último responsável por manter funções fisiológicas vitais de restauração e manutenção da célula, e também essa desregulação pode gerar um aumento de gasto de energia da célula (COOLS *et al.*, 2017; THEVISSSEN *et al.*, 2004). Para verificar se esse evento de permeabilização está presente na interação de D-RR com *C. tropicalis*, utilizamos para o ensaio a sonda fluorescente SYTOX Green. Esta sonda consegue entrar apenas em células com membranas estruturalmente comprometidas se tornando fluorescente ao se ligar a ácidos nucleicos (THEVISSSEN *et al.*, 1999). D-RR foi capaz de causar permeabilidade das membranas em 55,7% das células de *C. tropicalis* (Figura 18). Defensinas como *DmAMP*<sub>1</sub>, *MsDEF*<sub>1</sub>, *NaD*<sub>1</sub>, *PsD*<sub>1</sub> e *PvD*<sub>1</sub>, já citadas acima, apesar de terem mecanismos de interação e ação diferentes (ver item 1.4 da Introdução) causam o efeito de permeabilização de membranas nos microrganismos testados (LOBO *et al.*, 2007; MELLO *et al.*, 2011; SAGARAM *et al.*, 2011; THEVISSSEN *et al.*, 2007; VAN DER WEERDEN *et al.*, 2008). Esse efeito de permeabilização de membrana vem sendo discutido ao longo de anos, pois acreditava-se que a permeabilização da membrana era a principal causa da atividade antimicrobiana das defensinas (THEVISSSEN *et al.* 1999). Só que um estudo realizado por AERTS *et al.* (2007), mostrou que a defensina *RsfAFP*<sub>2</sub> em determinadas concentrações não interage e nem causa vazamento de carboxifluoresceína de pequenas vesículas uni lamelares com composição lipídica contendo glucosilceramida (GlcCer), o esfingolípido conhecido como alvo de ligação desta defensina de plantas na membrana de *C. albicans* (THEVISSSEN *et al.*, 2003b). Este resultado sugere que a permeabilização de membrana pode não ser o alvo primário das defensinas e de seus peptídeos derivados. Outros autores demonstraram que as defensinas podem ter outros alvos intracelulares como *NaD*<sub>1</sub> que entra no citoplasma do fitopatógeno *Fusarium oxysporum* onde a interação com alvos intracelulares leva à produção de ROS, seguida da permeabilização da membrana plasmática, granulação do citoplasma e morte celular (VAN DER WEERDEN *et al.*, 2008, 2010). Essa granulosidade no citoplasma também pode ser observada na interação de D-RR (Figura 17), além de um citoplasma vacuolizado, o que foi visto também em

promastigotas de *Leishmania amazonensis* por DD (SOUZA *et al.*, 2019). Estes dados sugerem que D-RR também possa possuir alvos intracelulares. Resultados de microscopia eletrônica de transmissão demonstraram danos estruturais nas mitocôndrias de células de *S. cerevisiae* tratadas com *ApDef*<sub>1</sub> além de apresentarem condensação da cromatina e fragmentação do DNA (SOARES *et al.*, 2017). Na ação da histatina 5 em *C. albicans* também puderam ser observados através de microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de fluorescência, microscopia eletrônica de varredura de alta resolução, modificações como: o desarranjo da membrana intracelular, inchaço mitocondrial, organelas em desordem e uma grande cavidade central com corpos deformados deslocados para a periferia da célula (ISOLA *et al.*, 2007). Corroborando com os dados da literatura discutidos anteriormente, SOARES *et al.* (2016) sugeriram que a permeabilização de membrana seja um efeito secundário ao aumento endógeno da produção de ROS na interação da defensina *ApDef*<sub>1</sub> com a levedura *S. cerevisiae*. Para verificar se o mesmo ocorria em *C. tropicalis*, fizemos o ensaio de permeabilização e viabilidade na presença do antioxidante ácido ascórbico. Nossos resultados indicam que as células de *C. tropicalis* eram protegidas do efeito de permeabilização da membrana e também da morte induzida por D-RR, como mostrado nas figuras 18 e 20. Os resultados corroboram com os dados da literatura que indicam o efeito de permeabilização ser secundário, causado não pela interação do peptídeo com a membrana, mas por um aumento da produção endógena de ROS (AERTS *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2017; VAN DER WEERDEN *et al.*, 2008, 2010).

A partir deste resultado da permeabilização de membrana ser um efeito secundário, nós verificamos se há produção de ROS através do marcador fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA nas células tratadas com D-RR no qual se mostrou positivo (Figura 19). As moléculas reativas como o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e o radical hidroxil (OH<sup>•</sup>) normalmente são geradas durante o metabolismo celular (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009). Quando a célula não consegue se desintoxicar do acúmulo delas sofre vários danos celulares, diretos ou indiretos, como oxidação de proteínas, carboidratos, lipídeos, além de danos ao DNA (SHACKELFORD *et al.*, 2000). Esse efeito de incremento na produção de ROS é visto para diversas defensinas como a *RsAFP*<sub>2</sub> que após se acoplar com o esfingolipídio de membrana, GlcCer, em *C. albicans* gera danos para proteínas, lipídios e DNA, induzindo a morte celular programada ou apoptose (AERTS *et al.*, 2007). Essa indução de estresse oxidativo por *NaD*<sub>1</sub> também foi registrada para *C. albicans* (HAYES *et al.*, 2014), *ApDef*<sub>1</sub> para a levedura *S. cerevisiae* descrita acima (SOARES *et al.*, 2016) e a defensina *PvD*<sub>1</sub> também levou a indução de ROS para a levedura *C. albicans* e o fungo *F. oxysporum* (MELLO *et al.*, 2011). Observado o estresse oxidativo induzido por D-RR sobre a *C. tropicalis*, a fim de determinar se de fato o

estresse oxidativo induzido por D-RR é o sinal que induz as células de *C. tropicalis* à morte repetimos o ensaio de viabilidade na presença de ácido ascórbico, um composto antioxidante amplamente conhecido, que elimina ROS. Na presença do ácido ascórbico as células de *C. tropicalis* não têm indução de estresse oxidativo (Figura 19), assim como há redução na perda de viabilidade das células (Figura 20). Estes resultados indicam que há outros possíveis mecanismos de ação envolvidos e apoia o que foi sugerido, que a permeabilização de membrana seja um efeito secundário ao aumento endógeno da produção de ROS em *C. tropicalis* induzida por D-RR.

Devido ao resultado da forte indução de ROS e do fato de as mitocôndrias representarem o principal sítio de metabolismo oxidativo da célula e seu envolvimento na produção e degradação de ROS (KOWALTOWSKI et al., 2009), resolvemos estudar a funcionalidade mitocondrial de *C. tropicalis* após a interação com D-RR através da sonda fluorescente Rodamina 123. Como observado na figura 21, quando se compara com o controle, o tratamento com D-RR após 1 h de incubação há um aumento da intensidade da fluorescência, considerando que o tempo de exposição das capturas das imagens é o mesmo, pode indicar um aumento na atividade da mitocôndria. O controle positivo realizado com Triton X-100, como esperado devido ao efeito que tem de causar lise de membranas, mostrou perda da funcionalidade mitocondrial. Defensinas como LpDef<sub>1</sub>, isolada de semente de *Lecythis pisonis* (sapucaia) causaram a perda da funcionalidade mitocondrial em *C. albicans* (VIEIRA et al., 2015) assim como o peptídeo  $\gamma_{33-41}PvD_1^{++}$  derivado do  $\gamma$ -core de PvD<sub>1</sub> em *C. buinensis* (MELLO et al., 2019). Um resultado diferente foi observado para a atividade da defensina HsAFP<sub>1</sub> sobre a levedura *S. cerevisiae* que requer mitocôndrias funcionais e uma cadeia respiratória funcional, uma vez que a levedura tratada com a azida sódica (que bloqueia o fluxo de elétrons no complexo IV (*citocromo oxidase*) da cadeia transportadora de elétrons, evitando assim a produção de ATP) fez com que o peptídeo perdesse sua atividade (AERTS et al., 2011). Também foi observado que cepas de *S. cerevisiae* com deleções de genes mitocondriais são resistentes a NaD<sub>1</sub> (BLEACKLEY et al., 2014). Isso nos levanta a hipótese que D-RR também possa depender de mitocôndrias funcionais para sua atividade fungicida, o que devemos estudar futuramente.

Os resultados apresentados por D-RR indicam que esse peptídeo pode ser um bom candidato para o desenvolvimento de substâncias para o tratamento antifúngico. No entanto, há muito ser entendido em sua interação e seu mecanismo de ação sobre *C. tropicalis*, uma vez que, como discutido ao longo deste trabalho, os peptídeos podem ser divididos em dois grupos, os que conseguem ter sua atividade mediada sem entrar na célula e os que atravessam a parede celular e a membrana plasmática e entram no citoplasma (PARISI et al., 2019). Diante disso,

pretendemos avaliar sua interação com a membrana, por meio do potencial de membrana e baixa temperatura como realizado por SOARES *et al.* (2016), observar o papel da endocitose e dos canais de poliaminas como descrito por BLEACKLEY *et al.* (2014) e HAYES *et al.* (2018), além do papel do fluxo de íons (ANDRÉS *et al.*, 2008; BAEV *et al.* 2002). Também será estudado se há a internalização do mesmo por meio da sintetização de D-RR marcado com corante fluorescente 5-carboxifuloresceína. Uma vez que D-RR apresentou permeabilização da membrana de *C. tropicalis*, investigaremos qual o papel dela na morte celular, observando o extravasamento de substâncias citoplasmáticas, se a estabilização osmótica protege a célula da morte. Também avaliaremos se há respostas de defesa celular com a ativação das vias CWI ou HOG (HAYES *et al.*, 2013, 2018). Observaremos o envolvimento de alvos intracelulares como as mitocôndrias, porque por nossos resultados indicam que elas estavam funcionais após o tratamento com D-RR. Esta manutenção da atividade mitocondrial sugere a hipótese de que sua atividade antifúngica de D-RR pode ser dependente da atividade mitocondrial. Essa complexidade dos mecanismos de ação das defensinas requer muito tempo e estudo, é o que justifica essas moléculas serem tão eficazes durante milênios e serem alvos de desenvolvimento de agentes antifúngicos tanto para uso clínico e com também para uso na agricultura (PARISI *et al.*, 2019).

## 6. CONCLUSÕES

As análises realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho nos permitem concluir que:

- O peptídeo sintético D-RR, alterado em carga e quiralidade, apresentou uma melhora na sua atividade biológica em comparação ao peptídeo original DD;
- D-RR apresentou atividade antifúngica contra *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. buinensis*;
- Sobre as leveduras testadas *C. tropicalis* e *C. albicans*, o efeito inibitório de D-RR foi fungicida com DL<sub>100</sub> de 23 e 36,5 µM;
- D-RR, quando confrontado com fluconazol nas mesmas DL<sub>100</sub> para as leveduras *C. tropicalis* e *C. albicans*, apresentou uma atividade melhor que a droga comercial;
- D-RR apresentou uma baixa atividade citotóxica à frente das células de mamíferos macrófagos murinos RAW 264.7 e monócitos humanos THP-1;
- D-RR apresentou tempo de morte de 3 h após contato inicial com as células de *C. tropicalis* do ensaio antimicrobiano;
- D-RR causou mudanças estruturais nas células de *C. tropicalis*;
- O tratamento com a D-RR induziu o aumento da produção endógena de ROS pelas células de *C. tropicalis*;
- O estresse oxidativo foi observado como envolvido na atividade fungicida de D-RR sobre células de *C. tropicalis*;
- A atividade fungicida de D-RR causou a permeabilização da membrana plasmática de *C. tropicalis*;
- A permeabilização da membrana plasmática foi vista como um evento indireto na morte celular de *C. tropicalis* frente D-RR;
- Não foi observada a perda da funcionalidade mitocondrial das células de *C. tropicalis* tratadas com D-RR;
- Os dados apresentados indicam que o peptídeo D-RR pode ser um possível candidato a fármaco.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABI-SAID D, ANAISSIE E, UZUN O, PINZCOWSKI H, VARTIVARIAN S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clinical Infectious Diseases**. 1997 v. 24, p. 1122-1128.
- ABIRAJ K, PRAKASHA GOWDA AS & CHANNE GOWDA D. Synthesis of shorter active analogues of bactenecin7: The effect of change of N-terminal configuration on antimicrobial activity. **Letters in Peptide Science**. 2002. 9, 283–290.
- AERTS AM, FRANC IE, OIS, MEERT EM, LI QT, CAMMUE BP, THEVISSSEN K, 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**. 2007. 13 (4) 243–247.
- AERTS AM, CARMONA-GUTIERREZ D, LEFEVRE S, GOVAERT G, FRANC I.E. , OIS, MADEO F, SANTOS R, CAMMUE BP, THEVISSSEN K. The antifungal plant defensina *RsAFP2* from *radish* induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. **FEBS Letters**. 2009. 583 (15) 2513–2516.
- AERTS AM, BAMMENS L, GOVAERT G, CARMONA-GUTIERREZ D, MADEO F, CAMMUE B, THEVISSSEN K. The antifungal plant defensin *HsAFP1* from *Heuchera sanguinea* induces apoptosis in *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**. 2011. 1–9.
- ANDRÉS MT, VIEJO-DÍAZ M, FIERRO JF. Human *lactoferrin* induces apoptosis-like cell death in *Candida albicans*: Critical role of  $K^+$  - channelmediated  $K^+$  efflux. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2008. 52, 4081–4088.
- BAEV D, LI XS, DONG J, KENG P, EDGERTON M. Human salivary histatin 5 causes disordered volume regulation and cell cycle arrest in *Candida albicans*. **Infection and Immunity**. 2002. 70(9):4777-4784.
- BAXTER A, HULETT M, POON IK. The phospholipid code: a key component of dying cell recognition, tumor progression and host-microbe interactions. **Cell Death & Differentiation**. 2015. 22 (12)1893–1905.
- BENKO-ISEPPON AM, GALDINO SL, CALSA TJR, KIDO EA, TOSSI A, BELARMINO LC, CROVELLA S. Overview on plant antimicrobial peptides. **Current Protein and Peptide Science**. 2010; 11:181-188.
- BLEACKLEY MR, WILTSHIRE JL, PERRINE-WALKER F, VASA S, BURNS RL, VAN DER WEERDEN NL AND ANDERSON MA. 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**. 2014. 58, 2688–2698.
- BLEACKLEY MR, PAYNE JA, HAYES BM, DUREK T, CRAIK DJ, SHAFEE TM, POON IK, HULETT MD, VAN DER WEERDEN NL, ANDERSON MA *Nicotiana glauca* defensin chimeras reveal differences in the mechanism of fungal and tumor cell killing and an enhanced antifungal variant. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2016. 60(10):6302-6312.
- BRAUNSTEIN A, PAPO N, SHAI Y. In vitro activity and potency of an intravenously injected antimicrobial peptide and its DL amino acid analog in mice infected with bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2004. 48(8):3127-3129.

- BROEKAERT WF, TERRAS FR, CAMMUE BP, & OSBORN RW. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. **Plant physiology**. 1995. 108(4), 1353–1358.
- BROEKAERT WF, CAMMUE BPA, DE BOLLE MFC, THEVISSSEN K, DE SAMBLANX GW, OSBORN RW, NIELSON K. Critical Reviews in Plant Sciences Antimicrobial Peptides from Plants Antimicrobial Peptides from Plants. **Critical Review in Plant Sciences**. 1997. v. 16, n. 3, p.297–323.
- BOWDISH DME, DAVIDSON DJ, HANCOCK REWH. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. **Current Protein and Peptide Science**. 2005. 6:35-51.
- CAMPOY S, ADRIO JL, Antifungals. **Biochemical Pharmacology**. 2017. V133, Pages 86-96.
- CARVALHO AO, MACHADO OLT, DA CUNHA M, SANTOS IS, GOMES VM. Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**. 2001; 39: 137-46.
- CARVALHO AO, FILHO GAS, FERREIRA BS, BRANCO AT, OKOROKOVAFAÇANHA AL, GOMES VM. Cloning and characterization of a *Cdna* encoding a cowpea seed defensin and analysis of its expression. **Protein & Peptide Letters**. 2006; 13: 1029-1036.
- CARVALHO AO, GOMES VM. Plant defensins—Prospects for the biological functions and biotechnological properties. **Peptides**. 2009. v. 30, n. 5, p.1007-1020.
- CARVALHO AO, GOMES VM. Plant defensins and defensin-like peptides - biological activities and biotechnological applications. **Current Pharmaceutical Design**. 2011. Dec; 17(38): 4270–4293.
- CARY JW, RAJASEKARAN K, JAYNES JM, CLEVELAND TE, Transgenic expression of a gene encoding a synthetic antimicrobial peptide results in inhibition of fungal growth in vitro and in planta. **Plant Science**. 2000 171-181.
- CHEN PY, CHUANG YC, WU UI, SUN HY, WANG JT, SHENG WH, LO HJ, WANG HY, CHEN YC, CHANG SC. Clonality of Fluconazole-Nonsusceptible *Candida tropicalis* in Bloodstream Infections, Taiwan, 2011-2017. **Emerging Infectious Diseases**. 2019 Sep;25(9):1660-1667.
- CHEN Y, GUARNIERI MT, VASIL AI, VASIL ML, MANT CT, HODGES RS. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2007. Apr;51(4):1398-1406.
- CHO J, LEE DG. Oxidative stress by antimicrobial peptide pleurocidin triggers apoptosis in *Candida albicans*. **Biochimie**. 2011 Oct;93(10):1873-1879.
- CHOWDHARY A, PRAKASH A, SHARMA C, KORDALEWSKA M, KUMAR A, SARMA S, *et al*. A Multicentre Study of Antifungal Susceptibility Patterns Among 350 *Candida auris* Isolates (2009–17) in India: Role of the ERG11 and FKS1 Genes in Azole and Echinocandin Resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 2018. 73, 891–899.
- COLILLA FJ, ROCHER A, MENDEZ E.  $\gamma$ -Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. **FEBS Letters**. 1990. 270, 191–194.

- COOLS TL, STRUYFS C, CAMMUE B, THEVISSSEN K. Antifungal plant defensins: increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections. **Future Microbiology**. 2017. v. 12, n. 5, p.441-454.
- COSTA-DE-OLIVEIRA S, RODRIGUES AG. *Candida albicans* Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal. **Microorganisms**. 2020, 8, 154.
- COWEN LE, ANDERSON JB, KOHN LM. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. **The Annual Review of Microbiology**. 2002; 56:139-165.
- DE FRANCESCO MA, PICCINELLI G, GELMI M, GARGIULO F, RAVIZZOLA G, PINSI G, PERONI L, BONFANTIC, CARUSO A. Invasive candidiasis in Brescia, Italy: Analysis of species distribution and antifungal susceptibilities during seven years. **Mycopathologia**, 2017.
- DE SAMBLANX GW, GODERIS IJ, THEVISSSEN K. Mutational analysis of a plant defensin from radish (*Raphanus sativus L.*) reveals two adjacent sites important for antifungal activity. **Journal of Biological Chemistry**. 1997; 272: 1171-1179.
- DOI AM, PIGNATARI ACC, EDMOND MB, MARRA AR, CAMARGO LFA, *et al.* Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **Plos One**. 2016. 11(1): e0146909.
- FAN L, SUN J, ZHOU M, ZHOU J, LAO X, ZHENG H, XU H. DRAMP: a comprehensive data repository of antimicrobial peptides. **Scientific Reports**. 2016. 14;6:24482.
- FISHER MC, HAWKINS J, SANGLARD D, GURR SJ. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**. 2018; 360(6390): 739–742.
- FRANCO OL. Peptide promiscuity: An evolutionary concept for plant defense. **FEBS Letters**. 2011. 585:995-1000.
- FORD CB, FUNT JM, ABBEY D, ISSI L, GUIDUCCI C, MARTINEZ DA, DELOREY T, LI B, WHITE TC, CUOMO C, RAO RP, BERMAN J, THOMPSON DA, REGEV A. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. **eLife**. 2015; 4:e00662.
- FORSBERG K, WOODWORTH K, WALTERS M, BERKOW EL, JACKSON B, CHILLER T, VALLABHANENI S. *Candida auris*: The recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. **Medical Mycology**. 2019. 57(1):1–12.
- FU J, DING Y, WEI B, WANG L, XU S, QIN P, WEI L, JIANG L. Epidemiology of *Candida albicans* and non-*C.albicans* of neonatal candidemia at a tertiary care hospital in western China. **BioMed Central infectious diseases**. 2017. 17: 329.
- FUNDO DE AÇÃO GLOBAL PARA INFECÇÕES FÚNGICAS (GAFFI) [Internet]. [citado em 21 de setembro de 2020]. Disponível em: <https://www.gaffi.org/why/fungal-disease-frequency/>.
- GACHOMO EW, SHONUKAN OO, KOTCHONI SO. A iniciação molecular e subsequente aquisição de resistência a doenças nas plantas. **African Journal of Biotechnology**. 2003. 2, 26–32.

- GACHOMO EW, SEUFFERHELD MJ, KOTCHONI SO. A melanização de apressórios é crítica para a patogenicidade de *Diplocarpon rosae*. **Molecular Biology**. 2010. Rep. 37, 3583–3591.
- GIULIANI A, PIRRI G, NICOLETTO SF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. **Central European Journal of Biology**. 2007. v. 1, p. 01-33.
- GONÇALVES S, TEIXEIRA A, ABADE J, DE MEDEIROS LN, KURTENBACH E AND SANTOS NC. Evaluation of the membrane lipid selectivity of the pea defensin PsD<sub>1</sub>. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**. 2012. 1818, 1420–1426.
- HAMAMOTO K, KIDA Y, ZHANG Y, SHIMIZU T, KUWANO K. Antimicrobial activity and stability to proteolysis of small linear cationic peptides with D-amino acid substitutions. **Microbiology and Immunology**. 2002. 46(11):741-749.
- HANEY EF, LAU F, VOGEL HJ. Solution structures and model membrane interactions of lactoferrampin, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2007. 1768(10):2355-2364.
- HAYES BME, BLEACKLEY MR, WILTSHIRE JL, ANDERSON MA, TRAVEN A, VAN DER WEERDEN NL. 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**. 2013. 57, 3667–3675.
- HAYES BME, ANDERSON MA, TRAVEN A, VAN DER WEERDEN NL, BLEACKLEY MR. Activation of stress signalling pathways enhances tolerance of fungi to chemical fungicides and antifungal proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 2014. 71 (14) 2651–2666.
- HAYES BME, BLEACKLEY MR, ANDERSON MA, VAN DER WEERDEN NL. The plant defensin NaD1 enters the cytoplasm of *Candida albicans* via endocytosis, **Journal Fungi (Basel)**. 2018. 4(1): 20.
- HEGEDUS N, MARX F. Antifungal proteins: More than antimicrobials? **Fungal Biology Reviews**, v. 26, p. 132-145, 2013.
- HELMERHORST EJ, TROXLER RF, OPPENHEIM FG. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2001 Dec 4;98(25):14637-14642.
- HOLASKOVA E, GALUSZKA P, FREBORT I, OZ MT. Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. **Biotechnology Advances**. 2015. [S.L.], v. 33, n. 6, p. 1005-1023.
- HONG SY, OH JE, AND K.-H. LEE. Effect of D-amino acid substitution on the stability, the secondary structure, and the activity of membraneactive peptide. **Biochemical Pharmacology** 1999. 58:1775–1780.
- HOSKIN DW, RAMAMOORTHY A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**. 2008. v. 1778, n. 2, p.357-375.
- IZADPANAH A, GALLO RL. Antimicrobial peptides. **Journal of the American Academy of Dermatology**. 2005. 52: 381-390.

- ISOLA R, ISOLA M, CONTI G, LANTINI MS, RIVA A. Histatin-induced alterations in *Candida albicans*: a microscopic and submicroscopic comparison. **Microscopy Research and Technique**. 2007. Jul;70(7):607-616.
- JANSSEN BJC, SCHIRRA HJ, LAY FT, ANDERSON MA, CRAIK DJ. Structure of *Petunia hybrida* defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds, **Biochemistry**. 2003. 42 (27) 8214–8222.
- JENSSEN H, HAMILL P & AND HANCOCK REW. Peptide antimicrobial agents. **Journal of Clinical Microbiology Rev.**, 2006.
- KANG X, DONG F, SHI C, ZHENG H *et al.* DRAMP 2.0, an updated data repository of antimicrobial peptides. **Scientific Data**. 2019; 6(1): 148.
- KOTACZKOWSKA A, KOTACZKOWSKI M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 2016.
- KOTHAVADE RJ, KURA MM, VALAND AG, PANTHAKI MH. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**. 2010 Aug;59(Pt 8):873-880.
- KOWALTOWSKI AJ, DE SOUZA-PINTO NC, CASTILHO RF, VERCESI AE. Mitochondria and reactive oxygen species. **Radical Free Biology and Medicine**. 2009 Aug 15;47(4):333-343.
- KVANSAKUL M, LAY FT, ADDA CG, VENEER PK, BAXTER AA, PHAN TK, POON IK, HULETT MD. Binding of phosphatidic acid by *NsD7* mediates the formation of helical defensin–lipid oligomeric assemblies and membrane permeabilization, **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2016. 113 (40)11202–11207.
- LACERDA AF, VASCONCELOS EAR, PELEGRINI PB AND GROSSI DE SA MF. Antifungal defensins and their role in plant defense. **Frontiers in Microbiology**. 2014. 5, 1–10.
- LAY FT, RYAN GF, CARIA S, PHAN TK, VENEER PK, WHITE JA, KVANSAKUL M, HULETT MD. Structural and functional characterization of the membrane-permeabilizing activity of *Nicotiana occidentalis* defensin *NoD173* and protein engineering to enhance oncolysis. **FASEB Journal**. 2019. 33(5):6470-6482.
- LIU S, FAN L, SUN J, LAO X, ZHENG H. Computational resources and tools for antimicrobial peptides. **Jounal Peptides Science**. 2017 Jan;23(1):4-12.
- LIU S, BAO J, LAO X, ZHENG H. Novel 3D Structure Based Model for Activity Prediction and Design of Antimicrobial Peptides. **Scientific Reports**. 2018 Jul 25;8(1):11189.
- LIU W, YUAN L, WANG S. Recent Progress in the Discovery of Antifungal Agents Targeting the Cell Wall. **Journal of Medicinal Chemistry**. 2020. 63 (21),12429-12459.
- LIU YJ, CHENG CS, LAI SM, HSU MP, CHEN CS, LYU PC. Solution Structure of the Plant Defensin *VrD<sub>1</sub>* From Mung Bean and Its Possible Role in Insecticidal Activity Against Bruchids. **Proteins: Structure, Function and Genetics**. 2006. 63, 777–786.
- LEI J, SUN L, HUANG S, ZHU C, LI P, HE J, MACKAY V, COY DH, & HE Q. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **American journal of translational research**. 2019 11(7), 3919–3931.

- LEVY CE. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em serviços de Saúde. São Paulo: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 2004. 64p.
- LEVY SB AND BONNIE M. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**. 2004. 10, S122–S129.
- LOBO DS, PEREIRA IB, FRAGEL-MADEIRA L, MEDEIROS LN, CABRAL LM, FARIA J, BELLIO M, CAMPOS RC, LINDEN R AND KURTENBACH E. Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. **Biochemistry**. 2007. 46, 987–996.
- MARÓTI G, KERESZT A, KONDOROSI E, MERGAERT P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. **Research In Microbiology**. 2011 v. 162, n. 4, p.363-374.
- MATSUZAKI K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2009. 1788:1687–1692.
- MELLO EO, RIBEIRO SFF, CARVALHO AO, SANTOS IS, DA CUNHA M, SANTACATARINA C, GOMES VM. Antifungal Activity of *PvD1* Defensin Involves Plasma Membrane Permeabilization, Inhibition of Medium Acidification, and Induction of ROS in Fungi Cells. **Current Microbiology**. 2011. 62, 1209–1217.
- MELLO EO, TAVEIRA GB, CARVALHO AO, GOMES VM. Improved smallest peptides based on positive charge increase of the  $\gamma$ -core motif from *PvD1* and their mechanism of action against *Candida* species. **International Journal of Nanomedicine**. 2019. 14:407-420.
- MENDEZ E, MORENO A, COLILLA F, PELAEZ F, LIMAS GG, MENDEZ R, SORIANO F, SALINAS M, HARO C. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin,  $\gamma$ -hordothionin, from barley endosperm, **European Journal of Biochemistry**. 1990. 194 (2) 533–539.
- MENEGUETTI BT, DOS SANTOS ML, OSHIRO KGN, NOGUEIRA ML, CARVALHO CME, FRANCO OL *et al.* Antimicrobial peptides from fruits and their potential use as biotechnological tools—A review and outlook. **Frontiers in Microbiology**. 2017. v. 7, n. 1, p.1-13.
- MOODLEY S, KOORBANALLY NA, MOODLEY T, RAMJUGERNATH D, PILLAY M. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay is a rapid, cheap, screening test for the in vitro anti-tuberculous activity of chalcones. **Journal of Microbiological Methods**. 2014. 104:72-78.
- MUÑOZ A, CHU M, MARRIS PI, SAGARAM US, KAUR J, SHAH DM, READ ND. Specific domains of plant defensins differentially disrupt colony initiation, cell fusion and calcium homeostasis in *Neurospora crassa*. **Molecular Microbiology**. 2014. 92(6):1357-1374.
- NAWROT R, BARYLSKI J, NOWICKI G, BRONIARCZYK J, BUCHWALD W, GOŹDZICKA-JÓZEFIAK A. Plant antimicrobial peptides. **Folia Microbiologica (Praha)**. 2014. 59(3):181-96.
- OCHIAI A, OGAWA K, FUKUDA M, OHORI M, KANAOKA T, TANAKA T, TANIGUCHI M, SAGEHASHI Y. Rice defensin *OsAFP1* is a new drug candidate against human pathogenic fungi. **Scientific Reports**. 2018. 8:11434.

- OLIVEIRA JS, PEREIRA VS, CASTELO-BRANCO DSCM, CORDEIRO RA, SIDRIM JJC, BRILHANTE RSN, ROCHA MFG. The yeast, the antifungal, and the wardrobe: a journey into antifungal resistance mechanisms of *Candida tropicalis*. **Canadian Journal of Microbiology**. 2020 Jun;66(6):377-388.
- ONYEWU C, BLANKENSHIP JR, DEL POETA M, HEITMAN J. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors Against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2003; 47:956-64.
- PAYNE JA, BLEACKLEY MR, LEE TH, SHAFEE TM, POON IK, HULETT MD, AGUILAR MI, VAN DER WEERDEN NL, ANDERSON MA. The plant defensin *NaD1* introduces membrane disorder through a specific interaction with the lipid, phosphatidylinositol 4,5 biphosphate, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**. 2016. 1858 (6) 1099–1109.
- PARISI K, SHAFEE TMA, QUIMBAR P, VAN DER WEERDEN NL, BLEACKLEY MR, ANDERSON MA. The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. 2019. Biol. 88, 107–118.
- POON IK, BAXTER AA, LAY FT, MILLS GD, ADDA CG, PAYNE JA, PHAN TK, RYAN GF, WHITE JA, VENEER PK, VAN DER WEERDEN NL, ANDERSON MA, KVANSAKUL M, HULETT MD. Phosphoinositide-mediated oligomerization of a defensin induces cell lysis. **Elife**. 2014. 3:e01808.
- PUSHPANATHAN M, GUNASEKARAN P, RAJENDHRAN J. Antimicrobial peptides: versatile biological properties. **International Journal of Peptides**. 2013.
- RAJASEKARAN K, CARY JW, CHLAN CA, JAYNES JM, Strategies for controlling plant diseases and mycotoxin contamination using antimicrobial synthetic peptides, *in*: K.Rajasekaran, J.W. Cary, J.M. Jaynes, E. Montesinos (Eds.) ACS Symposium Book Series #1095: Small Wonders: **Peptides for Disease Control**. 2012, pp. 295-315.
- RAJASEKARAN K, SAYLER RJ, SICKLER CM, MAJUMDAR R, JAYNES, CARY JW. Control of *Aspergillus flavus* growth and *aflatoxin* production in transgenic maize kernels expressing a *tachypleisin*-derived synthetic peptide, AGM182. **Plant Science**. 2018.
- RAMAMOORTHY V, CAHOON EB, LI J, THOKALA M, MINTO RE, SHAH DM. Glucosylceramide synthase is essential for alfalfa defensin-mediated growth inhibition but not for pathogenicity of *Fusarium graminearum*. **Molecular Microbiology**. 2007. 66(3):771-786.
- RAMESH S, GOVENDER T, KRUGER HG, DE LA TORRE BG, AND ALBERICIO F. Short Antimicrobial peptides (SAMPs) as a class of extraordinary promising therapeutic agents. **Journal of Peptide Science**. 2016. 22: 438– 451.
- RAUTENBACH M, TROSKIE AM, VOSLOO JA. Antifungal peptides: To be or not to be membrane active, **Biochimie**. 2016. 130,132-145.
- ROBBINS N; WRIGHT GD; COWEN LE. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. **Microbiology Spectrum**. 2016. v. 4, n. 5, p. 1–20.
- ROBBINS N, CAPLAN T, COWEN LE. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. **Annual Review of Microbiology**. 2017. v. 71, n. 1, p. 753–775.

- ROSCIA G, FALCIANI C, BRACCI L, PINI A. The development of antimicrobial peptides as new antibacterial drugs. **Current Protein and Peptide Science**. 2013. n.14, p. 641-649.
- SAGARAM US, PANDURANGI R, KAUR J, SMITH TJ, SHAH DM. Structure-activity determinants in antifungal plant defensins *MsDef<sub>1</sub>* and *MtDef<sub>4</sub>* with different modes of action against *Fusarium graminearum*. **PLoS ONE**. 2011. 6(4):e18550.
- SAGARAM US, EL-MOUNADI K, BUCHKO GW, BERG HR, KAUR J, PANDURANGI RS, SMITH TJ, SHAH DM. Structural and functional studies of a phosphatidic acid-binding antifungal plant defensin *MtDef<sub>4</sub>*: Identification of an RGFRRR motif governing fungal cell entry. **PLoS ONE** 8. 2013. (12):e82485.
- SALAS CE, BADILLO-CORONA JA, RAMÍREZ-SOTELO G, OLIVER-SALVADOR C. Biologically active and antimicrobial peptides from plants. **BioMed Research International**. 2015. 2015:102129.
- SCHAAPER WMM, POSTHUMA GA, PLASMAN HH, SIJTSMA L, FANT F, BORREMANS FAM, *et al.* Synthetic peptides derived from the *b2–b3 loop* of *Raphanus sativus* antifungal protein 2 that mimic the active site. **Journal of Peptide Science** 2001. 57:409–18.
- SHACKELFORD RE, KAUFMANN WK, PAULES RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. **Radical Free Biology and Medicine**. 2000. 28, 1387–404.
- SIERRA JM, FUSTÉ E, RABANAL F, VINUESA T, VIÑAS M. An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development. **Expert Opinion on Biological Therapy**. 2017. (), 1–14.
- SILVA ON, MULDER KC, BARBOSA AE, OTERO-GONZALEZ AJ, LOPEZ-ABARRATEGUI C, REZENDE TM, DIAS SC, FRANCO OL. Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**. 2011. 22;2:232.
- SILVA FP, MACHADO MCC. Antimicrobial peptides: Clinical relevance and therapeutic implications. **Peptides**. 2012. n. 36, p. 308-314.
- SILVA JAM, DIAMOND G. Antimicrobial Peptides from Fish. **Pharmaceuticals**. 2014. n. 7, p. 265-310.
- SIMONSEN SM, SANDO L, ROSENGREN KJ, WANG CK, COLGRAVE ML, DALY NL, CRAIK DJ. Alanine scanning mutagenesis of the prototypic cyclotide reveals a cluster of residues essential for bioactivity. **Journal of Biological Chemistry**. 2008 Apr 11;283(15):9805-9813.
- SHABIR U, ALI S, MAGRAY AR, GANAI B A, FIRDOUS P, HASSAN T, NAZIR R. Fish antimicrobial peptides (AMP's) as essential and promising molecular therapeutic agents: a review. **Microbial Pathogenesis**. 2018 [S.L.], v. 114, p. 50-56.
- SHAFEE TM, LAY FT, HULETT MD AND ANDERSON MA. The defensins consist of two independent, convergent protein superfamilies. **Molecular Biology and Evolution**. 2016. 33, 2345–2356.
- SHAFEE TM, LAY FT, PHAN TK, ANDERSON MA, HULETT MD. Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 2017. 74(4):663–682.

- SOARES JR, DE MELO EJT, DA CUNHA M, FERNANDES KVS, TAVEIRA GB, PEREIRA LS, PIMENTA S, TRINDADE FG, REGENTE M, PINEDO M, *et al.* Interaction between the plant *ApDef1* defensin and *Saccharomyces cerevisiae* results in yeast death through a cell cycle- and caspase-dependent process occurring via uncontrolled oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**. 2016. S0304-4165(16)30327-0.
- SOLETTI RC, DEL BARRIO L, DAFFRE S, MIRANDA A, BORGES HL, MOURA-NETO V, LOPEZ MG, GABILAN NH. Peptide gomesin triggers cell death through L-type channel calcium influx, MAPK/ERK, PKC and PI3K signaling and generation of reactive oxygen species. **Chemico-Biological Interactions**. 2010 Jul 30;186(2):135-43.
- SOUZA GS, NASCIMENTO VV, CARVALHO LP, MELO EJT, FERNANDES KV, MACHADO OLT, *et al.* Activity of recombinant and natural defensins from *Vigna unguiculata* seeds against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**. 2013 135(1): 116–125.
- SOUZA GS, DE CARVALHO LP, DE MELO EJT. *et al.* A synthetic peptide derived of the  $\beta 2$ – $\beta 3$  loop of the plant defensin from *Vigna unguiculata* seeds induces *Leishmania amazonensis* apoptosis-like cell death. **Amino Acids**. 2019. 51, 1633–1648.
- SPELBRINK RG, DILMAC N, ALLEN A, SMITH TJ, SHAH DM, HOCKERMAN GH. Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. **Plant Physiology**. 2004. 135(4):2055-2067.
- TAM JP, WANG S, WONG KH AND TAN WL. Antimicrobial peptides from plants. **Pharmaceuticals**. 2015. 8, 711–757.
- TAVARES PM, THEVISSSEN K, CAMMUE BP, FRANÇOIS IE, BARRETO-BERGTER E, TABORDA CP, MARQUES AF, RODRIGUES ML, NIMRICHTER L In vitro activity of the antifungal plant defensin *Rs*-AFP<sub>2</sub> against *Candida* isolates and its in vivo efficacy in prophylactic murine models of candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2008. 52(12):4522-4525.
- TERRAS FR, EGGERMONT K, KOVALEVA V, RAIKHEL NV, OSBORN RW, KESTER A, REES SB, TORREKENS S, VAN LEUVEN F, & VANDERLEYDEN J. Cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. **The Plant Cell Online**. 1995. v. 7, n. 5, p.573-588.
- THEVISSSEN K, GHAZI A, DE SAMBLANX GW, BROWNLEE C, OSBORN RW AND BROEKAERT W F. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. **The Journal of Biological Chemistry**. 1996. 271, 15018–15025.
- THEVISSSEN K, TERRAS FR, & BROEKAERT WF. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. **Applied and Environmental Microbiology**, 1999. v. 65, n. 12, p.5451-5458.
- THEVISSSEN K, OSBORN RW, ACLAND DP AND BROEKAERT WF. Specific binding sites for an antifungal plant defensin from *Dahlia* (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity. **Molecular plant-microbe interactions**. 2000. MPMI 13, 54–61.
- THEVISSSEN K, FRANÇOIS IEJA, TAKEMOTO JY, FERKET KKA, MEERT EMK, CAMMUE BPA. *Dm*AMP1, an antifungal plant defensin from *dahlia* (*Dahlia merckii*), interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae*, **FEMS Microbiology Letters**. 2003a. 226 (1)169–173.

- THEVISSSEN K, FERKET KK, FRANÇOIS IE, CAMMUE BP, Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components, **Peptides**. 2003b. 24 (11) 1705–1712.
- THEVISSSEN K, WARNECKE DC, FRANÇOIS IEJA, LEIPELT M, HEINZ E, OTT C, ZÄHRINGER U, THOMMA BPHJ, FERKET KKA, CAMMUE BPA. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. **The Journal of Biological Chemistry**. 2004. 279(6):3900-3905.
- THEVISSSEN K, KRISTENSEN HH, THOMMA BPHJ, CAMMUE BPA, FRANÇOIS IEJA. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. **Drug Discovery Today**. 2007. 12, 966–971.
- TOLEDO EB, LUCAS DR, SIMÃO TLBV. *et al.* Design of improved synthetic antifungal peptides with targeted variations in charge, hydrophobicity and chirality based on a correlation study between biological activity and primary structure of plant defensin  $\gamma$ -cores. **Amino Acids**. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02929-x>
- TSUI C, KONG EF, JABRA-RIZK MA. Patogênese do biofilme de *Candida albicans*. **Pathogens and Disease**. 2016; 74 (4).
- TUKENMEZ ET, BILGIN H, GURUN HP, DOGRU A, OZBEN B, CERIKCIOGLU N, KORTEN V. Risk factors, characteristics, and outcomes of candidemia in an adult intensive care unit in Turkey. **Am Journal of Infection Control**. 2017.
- VAN DER WEERDEN NL, LAY FT AND ANDERSON MA. The plant defensin, *NaD1*, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum hyphae*. **Journal of Biological Chemistry**. 2008. 283, 14445–14452.
- VAN DER WEERDEN NL, HANCOCK REW, ANDERSON MA, Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin *NaD1* occurs through a cell wall-dependent process, **Journal of Biological Chemistry**. 2010. 285 (48) 37513–37520.
- VIEIRA ME, VASCONCELOS IM, MACHADO OL, GOMES VM, CARVALHO AO. 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**. 2015. 47(9):716–729.
- VRIENS K, CAMMUE BPA AND THEVISSSEN K. Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. **Molecules**. 2014. 19, 12280–12303.
- VRIENS K, COOLS TL, HARVEY PJ, CRAIK DJ, SPINCEMAILLE P, CASSIMAN D, BRAEM A, VLEUGELS J, NIBBERING PH, DRIJFHOUT JW, DE CONINCK B, CAMMUE BP, THEVISSSEN K. Synergistic activity of the plant defensin *HsAFP1* and caspofungin against *Candida albicans* biofilms and planktonic cultures. **PLoS ONE**. 2015. 10(8):e0132701.
- WANG H, XU YC, and HSUEH PR. Epidemiology of candidemia and antifungal susceptibility in invasive *Candida* species in the Asia-Pacific region. **Future Microbiology**. 2016. 11:11, 1461-1477.
- WEERDEN NVD, BLEACKLEY M, ANDERSON M. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides, **Cellular and Molecular Life Sciences**. 2013. 1–26.
- WEI GX, AND BOBEK LA. Human salivary *MUC7* 12-mer-L and 12-mer-D peptides: antifungal activity in saliva, enhancement of activity with protease inhibitor cocktail or

- EDTA, and cytotoxicity to human cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2005. 49:2336–2342.
- WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK REW, Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols** 3. 2008.163–175.
- WILMES M, CAMMUE BPA, SAHL HG AND THEVISSSEN K. Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation. **Natural Product Reports**. 2011. 28, 1350.
- YOUNT NY, YEAMAN MR. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2004. 101(19):7363-7368.
- ZHU WL, NAN YH, HAHM KS, AND SHIN SY. Cell selectivity of an antimicrobial peptide melittin diastereomer with D-amino acid in the leucine zipper sequence. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. 2007 40:1090–1094.