

DESENHO DE PEPTÍDEOS BASEADOS NA CORRELAÇÃO ENTRE A
ESTRUTURA PRIMÁRIA E A ATIVIDADE BIOLÓGICA DE DEFENSINAS DE
PLANTAS, MECANISMO DE AÇÃO SOBRE LEVEDURAS PATOGÊNICAS E
TOXICIDADE SOBRE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

ESTÉFANY BRAZ TOLEDO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ABRIL DE 2021

DESENHO DE PEPTÍDEOS BASEADOS NA CORRELAÇÃO ENTRE A
ESTRUTURA PRIMÁRIA E A ATIVIDADE BIOLÓGICA DE DEFENSINAS DE
PLANTAS, MECANISMO DE AÇÃO SOBRE LEVEDURAS PATOGÊNICAS E
TOXICIDADE SOBRE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

ESTÉFANY BRAZ TOLEDO

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

Orientador: Prof. Dr. André de Oliveira Carvalho

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ABRIL DE 2021

DESENHO DE PEPTÍDEOS BASEADOS NA CORRELAÇÃO ENTRE A
ESTRUTURA PRIMÁRIA E A ATIVIDADE BIOLÓGICA DE DEFENSINAS DE
PLANTAS, MECANISMO DE AÇÃO SOBRE LEVEDURAS PATOGÊNICAS E
TOXICIDADE SOBRE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

ESTÉFANY BRAZ TOLEDO

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

Comissão examinadora:

Prof.^a Dr.^a Olga Lima Tavares Machado – UENF

Prof. Dr. Sérgio Henrique Seabra – UENF

Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Baracat Pereira – UFV

Prof. Dr. André de Oliveira Carvalho – UENF
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Sabemos que uma grande jornada valeu a pena, quando saímos dela mais fortes, com bons amigos e com o coração tranquilo. Os últimos quatro anos foram marcados com muitos desafios, boas risadas e muita aprendizagem. Pelos meus doze anos de UENF e, principalmente, pelos meus quatro anos de doutoramento, gostaria de agradecer:

A Deus por guiar meus caminhos e permitir que eu chegasse até aqui;

Aos meus pais, Carlos e Edna, pelo incentivo aos estudos, pelo amor e compreensão naqueles dias de ausência;

Ao meu companheiro de jornada, marido e melhor amigo, David, pelo apoio incondicional, por me acompanhar e estar sempre presente. Muitos dos resultados obtidos aqui foram possíveis graças à sua disponibilidade;

Aos colegas do laboratório, alunos, professores e técnicos, por todo auxílio e boas conversas;

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

Por fim agradeço aquele que renovou minhas esperanças na ciência sempre que o desespero chegava, meu orientador André. Uma das pessoas mais inteligentes e de bom coração que tive o prazer de conhecer. Com ele aprendi muito mais que desenhar peptídeos e diferentes técnicas de laboratório. Serei eternamente grata pelo apoio, pela disponibilidade, pela paciência e por conseguir tornar dias pesados em dias mais leves, às vezes acontecia o contrário, mas com toda certeza estes foram os mais significativos. André, você é luz! Gratidão pela oportunidade.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
SUMÁRIO	ii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Peptídeos Antimicrobianos.....	4
1.2 AMPs de Plantas.....	10
1.3 Defensina <i>VuDef₁</i>	18
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Material Biológico	23
3.2 Ensaio Antimicrobiano.....	23
3.3 Análise da Correlação entre a Estrutura Primária das Defensinas de Plantas e a Atividade Biológica	24
3.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória	25
3.5 Análise da Viabilidade Celular.....	25
3.6 Ensaio de Citotoxicidade em Células de Mamíferos	26
3.7 Ensaio para Determinação dos Mecanismos de Ação dos Peptídeos sobre as Leveduras	27
3.7.1 Determinação do Tempo de Morte	27
3.7.2 Análise da Atividade Antifúngica dos Peptídeos Desenhados na Presença de Agentes Antioxidantes.....	27

3.7.3	Padronização do Número de Células para os Ensaios de Microscopia Óptica	28
3.7.4	Análise das Células de Leveduras Incubadas com os Peptídeos por Microscopia Óptica.....	28
3.7.5	Análise da Produção Endógena de ROS.....	28
3.7.6	Análise da Funcionalidade Mitocondrial	29
3.7.7	Análise da Permeabilização de Membrana Plasmática	30
3.7.8	Análise da Atividade Antifúngica dos Peptídeos Sintéticos na Presença de um Inibidor de Caspase	30
3.7.9	Análise da Via de Necrose	31
3.8	Análise Estatística.....	31
4.	RESULTADOS	32
4.1	Atividade Antifúngica do Peptídeo DD	32
4.2	Desenho dos Peptídeos.....	32
4.3	Atividade Antifúngica dos Peptídeos RR e WR.....	39
4.4	Determinação da Concentração Mínima Inibitória	41
4.5	Determinação da Viabilidade Celular	42
4.6	Determinação da Citotoxicidade dos Peptídeos Desenhados sobre Células de Mamíferos.....	43
4.7	Análise dos Mecanismos de Ação dos Peptídeos.....	45
4.7.1	Determinação do Tempo de Morte	45
4.7.2	Análise da Atividade Antifúngica dos Peptídeos Desenhados na Presença de Agente Antioxidante	48
4.7.3	Análise da Atividade Antifúngica dos Peptídeos sobre um Número maior de Células	50
4.7.4	Alterações Citoplasmáticas das Células de Leveduras após Tratamento com os Peptídeos Desenhados	51
4.7.5	Análise da Ação dos Peptídeos sobre a Produção Endógena de ROS.....	55

4.7.6	Análise da Funcionalidade Mitocondrial	59
4.7.7	Análise da Ação dos Peptídeos sobre a Permeabilização de Membrana Plasmática.....	65
4.7.8	Análise da Atividade de Caspases na Ação dos Peptídeos Desenhados.....	70
4.7.9	Análise da Via de Necrose	71
5.	DISCUSSÃO	79
6.	CONCLUSÕES	97
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
ANEXO 1.....		115
ANEXO 2.....		117
ANEXO 3.....		119

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Distribuição dos AMPs nos seis reinos, de acordo com o Antimicrobial Peptide Database (APD, 2020).....	5
Figura 2: Visão geral das principais famílias estruturais de AMPs.	7
Figura 3: Distribuição de AMPs por sua atividade biológica de acordo com o banco de dados APD (2020).....	8
Figura 4: Estrutura tridimensional de algumas famílias de AMPs de plantas.....	11
Figura 5: Sequências primária, secundária (A) e terciária (B) de defensinas de plantas.	12
Figura 6: (A) Arquitetura da <i>cis</i> -defensina (<i>NaD</i> ₁) e <i>trans</i> -defensina (β -defensina humana HBD-1). (B) Similaridade estrutural entre <i>cis</i> -defensinas de diferentes espécies.....	13
Figura 7: (A) Alinhamento da sequência de aminoácidos de defensinas de plantas. (B) Estrutura tridimensional de três defensinas de plantas.....	14
Figura 8: (A) Comparação das sequências de aminoácidos de dois grupos de defensinas de plantas que possuem atividade inibitória sobre α -amilase de insetos (grupo I) e que não possuem (grupo II). (B) Comparação das estruturas tridimensionais de dois grupos de defensinas de plantas que possuem atividade inibitória sobre α -amilase de insetos (<i>VrD</i> ₁ e γ -H) e que não possuem (<i>Ah</i> -AMP ₁ e <i>Rs</i> -AFP ₁).....	17
Figura 9: (A) Alinhamento das estruturas primárias das defensinas <i>Vu</i> -Defr (<i>Vigna unguiculata</i> , feijão-de-corda) e <i>VrD</i> ₂ (<i>Vigna radiata</i> , feijão mungu). (B) Modelo estrutural de <i>Vu</i> -Defr, baseado na estrutura tridimensional de <i>VrD</i> ₂ . (C) Etapas do desenho do peptídeo sintético. (D) Propriedades químicas do peptídeo sintético A _{36,42,44} Y ₃₂₋₄₆ <i>Vu</i> Def. (E) Crescimento de <i>L. amazonensis</i> na ausência (controle) e na presença de <i>Vu</i> -Defr e de A _{36,42,44} Y ₃₂₋₄₆ <i>Vu</i> Def.....	19
Figura 10: Crescimento das seis leveduras na ausência (controle) e presença de DD.....	32
Figura 11: Comparação das estruturas primárias de <i>Vu</i> Def ₁ e DD com algumas das defensinas que relataram a correlação entre a estrutura primária e a atividade biológica.....	37
Figura 12: Crescimento das seis leveduras na ausência (controle) e presença de RR (A) e WR (B)	40

Figura 13: Determinação da concentração mínima inibitória de RR sobre <i>C. tropicalis</i> (A) e de WR sobre <i>C. albicans</i> (B).....	41
Figura 14: Determinação da viabilidade celular de <i>C. tropicalis</i> tratada com RR (A) e de <i>C. albicans</i> tratada com WR (B).....	42
Figura 15: Determinação da viabilidade celular de <i>C. tropicalis</i> e <i>C. albicans</i> na ausência (controle) e na presença de fluconazol.....	43
Figura 16: Toxicidade sobre células de macrófagos murinos RAW 264.7 (A) e monócitos humanos THP-1 (B) após 24 h de tratamento com os peptídeos desenhados RR e WR. (C) 50% da concentração citotóxica (CC ₅₀) requerida para a redução da viabilidade celular em 50%, calculada por análise de regressão.....	45
Figura 17: Cinética da morte celular de <i>C. tropicalis</i> incubada com RR na concentração de 27,5 µM.....	46
Figura 18: Cinética da morte celular de <i>C. albicans</i> incubada com WR na concentração de 27,5 µM.....	48
Figura 19: Relação entre o estresse oxidativo e a morte de <i>C. tropicalis</i> (A) e <i>C. albicans</i> (B) induzida pelos peptídeos RR e WR, respectivamente.....	50
Figura 20: Determinação da viabilidade celular de <i>C. tropicalis</i> e <i>C. albicans</i> na ausência (controle) e na presença de RR e WR, respectivamente.....	51
Figura 21: Imagens de microscopia óptica das células de <i>C. tropicalis</i> (A) e <i>C. albicans</i> (B) na ausência (controle) e na presença de RR e WR, respectivamente.....	54
Figura 22: Produção de ROS em <i>C. tropicalis</i> tratada com RR. (A) A fluorescência verde indica a presença de ROS. (B) Número de células com estresse oxidativo, determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência	57
Figura 23: Produção de ROS em <i>C. albicans</i> tratada com o peptídeo WR. (A) A fluorescência verde indica a presença de ROS. (B) Número de células com estresse oxidativo, determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência.....	59
Figura 24: Funcionalidade mitocondrial de <i>C. tropicalis</i> tratada com RR por 1 h. (A) A fluorescência vermelha indica o potencial de membrana mitocondrial. (B) Número de células com mitocôndrias ativas, determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência.....	61

Figura 25: Funcionalidade mitocondrial de <i>C. tropicalis</i> tratada com RR por 5 h. (A) A fluorescência vermelha indica o potencial de membrana mitocondrial. (B) Número de células com mitocôndrias ativas, determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência.....	63
Figura 26: Funcionalidade mitocondrial de <i>C. albicans</i> tratada com WR por 20 min e 1 h. (A) A fluorescência vermelha indica o potencial de membrana mitocondrial. (B) Número de células com mitocôndrias ativas, determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência.....	65
Figura 27: Permeabilização de membrana plasmática de <i>C. tropicalis</i> tratada com RR. (A) A fluorescência verde indica a permeabilização de membrana. (B) Número de células permeabilizadas determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência.....	68
Figura 28: Permeabilização de membrana plasmática de <i>C. albicans</i> tratada com WR. (A) A fluorescência verde indica a permeabilização de membrana. (B) Número de células permeabilizadas determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência.....	70
Figura 29: Análise do envolvimento de caspases na morte de <i>C. tropicalis</i> (A) e <i>C. albicans</i> (B) induzida pelos peptídeos RR e WR, respectivamente.....	71
Figura 30: Necrose de <i>C. tropicalis</i> tratada com RR por 1 h. (A) A fluorescência vermelha indica a necrose celular. (B) Número de células necrosadas determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência.....	74
Figura 31: Necrose de <i>C. tropicalis</i> tratada com RR por 6 h. (A) A fluorescência vermelha indica a necrose celular. (B) Número de células necrosadas determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência.....	76
Figura 32: Necrose de <i>C. albicans</i> tratada com RR por 20 min e 1 h. (A) A fluorescência vermelha indica a necrose celular. (B) Número de células necrosadas determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência.....	78
Figura 33: Visão geral da ação antioxidante do ácido ascórbico (Adaptado de Lima <i>et al.</i> , 2016) e da N-acetil-L-cisteína (NAC) (Adaptado de Aldini <i>et al.</i> , 2018).....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMP - Peptídeo antimicrobiano (do inglês *antimicrobial peptides*);
- APD - Banco de dados de peptídeos antimicrobianos (do inglês *Antimicrobial Peptide Database*);
- CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês *Centers of Disease Control and Prevention*);
- DIC - Contraste interferencial diferencial (do inglês *differential interference contrast*);
- DL - Dose letal;
- GAFFI – Fundo de Ação Global para Infecções Fúngicas (do inglês *Global Action Fund for Fungal Infections*);
- GlcCer – Glicosilceramida;
- HIV - Vírus da imunodeficiência humana (do inglês *human immunodeficiency virus*);
- H₂DCFDA - 2',7'- Diacetato de diclorodihidrofluoresceína (do inglês *2',7' dichlorodihydrofluorescein diacetate*);
- LTPs - Proteínas transportadoras de lipídeos (do inglês *lipid transfer proteins*);
- PI₍₃₎P - Fosfatidilinositol (3)-fosfato (do inglês *phosphatidylinositol (3)-phosphate*);
- PI_(4,5)P₂ - Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (do inglês *phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate*);
- MIC - Concentração mínima inibitória (do inglês *minimal inhibitory concentration*);
- M(IP)₂C - Manosildiinositol fosforilceramida (do inglês *mannosyl-diinositol phosphorylceramide*);
- MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (do inglês *methicilin resistant Staphylococcus aureus*);
- MTT - Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio;
- NAC - N-acetil-L-cisteína;
- PA - Ácido fosfatídico (do inglês, *phosphatidic acid*);
- ROS - Espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*);
- UFC - Unidades formadoras de colônia;
- UTI - Unidade de tratamento intensivo;
- Z-VAD-FMK - Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone.

- **Abreviaturas dos peptídeos antimicrobianos**

Ah-AMP₁ (*Aesculus hippocastanum* L., castanha-da-índia);
*alf*AFP (*Medicago sativa* L., alfafa);
*Ap*Def₁ (*Adenantha pavonina* L., carolina);
*Bc*Def (*Brugmansia x candida*, floripondio);
Cp-tionina₂ (*Vigna unguiculata* (L.) Walp., feijão-de-corda);
Ct-AMP₁ (*Clitoria ternatea* L., ervilha azul);
*Def*Sm₂ (*Silybum marianum* (L.) Gaertn., cardo-mariano)
Dm-AMP₁ (*Dahlia merckii* Lehm., dália);
*EAFP*₂ (*Eucommia ulmoides* Oliv., oliveira);
Ec-AMP₁ (*Echinochloa crus-galli* (L.) P.Beauv., capim-arroz);
Fabatina (*Vicia faba* L., feijão-fava);
Hordotionina (*Hordeum vulgare* L., cevada);
Hs-AFP₁ (*Heuchera sanguinea* Engelm., planta coral);
Kalata B1 (*Oldenlandia affinis* (Roem. & Schult.) DC, kalata);
LTP1 (*Triticum aestivum* L., trigo);
*Ms*Def₁ (*Medicago sativa* L., alfafa);
*Mt*Def₂, *Mt*Def₄; *Mt*Def₅ (*Medicago truncatula* Gaertn., luzerna);
*NaD*₁ e *NaD*₂ (*Nicotiana alata* Link & Otto, tabaco);
*Nm*Def₁ (*Nicotiana megalosiphon* Van Heurck & Muell.Arg., tabaco);
NoD173 (*Nicotiana occidentalis* H.-M.Wheeler, tabaco-nativo);
*Oef*Def (*Olea europaea* L., oliveira);
*Os*AFP₁ (*Oryza sativa japonica*, arroz);
PAFP-S (*Phytolacca americana* L., uva-de-rato);
*PgD*₅ (*Picea glauca* (Moench) Voss, pinheiro-do-Canadá);
*PhD*₁ e *PhD*₂ (*Petunia hybrida* hort. ex E.Vilm., petúnia);
*PsD*₁ (*Pisum sativum* L., ervilha);
Purotionina1 e *Purotionina2* (*Triticum aestivum* L., trigo);
*PvD*₁ e *PvD*₂ (*Phaseolus vulgaris* L., feijão);
Rs-AFP₁ e *Rs*-AFP₂ (*Raphanus sativus* L., rabanete);
*Sd*₅ (*Saccharum officinarum* L., cana-de-açúcar);
*Slα*₁, *Slα*₂ e *Slα*₃ (*Sorghum bicolor* (L.) Moench, sorgo);
SPE10 (*Pachyrhizus erosus*, nabo-mexicano);

TPP3 (*Solanum lycopersicum* L., tomate);
TvD₁ (*Tephrosia villosa* (L.) Pers., feijãozinho-bravo);
VrD₁ e VrD₂ (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek, feijão mungu);
VuDef₁ (*Vigna unguiculata* (L.) Walp., feijão-de-corda);
β-Purotionina (*Triticum aestivum* L., trigo);
γ-H (*Hordeum vulgare* L., cevada).

RESUMO

A resistência fúngica aos fármacos disponíveis é uma grave ameaça à saúde pública, demandando o desenvolvimento de novos antifúngicos. Neste contexto, o desenho e a síntese de peptídeos baseados em peptídeos antimicrobianos têm se mostrado promissores, por que permitem alterações nos resíduos de aminoácidos resultando na melhoria da atividade antifúngica. Nós temos trabalhado com a defensina de planta *VuDef₁* de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (feijão-de-corda). De seu γ -core, região responsável pela atividade biológica da molécula, foi sintetizado um peptídeo de 15 aminoácidos, denominado $A_{36,42,44}Y_{32-46}$ *VuDef* (abreviado DD). DD, na concentração de 18,5 μ M, possui atividade inibitória sobre *Leishmania amazonensis* tão potente quanto a *VuDef₁* inteira. Devido à atividade inibitória de DD sobre *L. amazonensis* nós o testamos, nas mesmas condições, sobre leveduras patogênicas. No entanto, DD foi inativo. O objetivo deste trabalho foi melhorar a atividade inibitória de DD sobre leveduras alterando seus parâmetros bioquímicos por substituições direcionadas em seus aminoácidos. Inicialmente foi feita uma busca em banco de dados sobre artigos que correlacionavam a estrutura primária e a atividade biológica das defensinas de plantas. A análise da comparação das estruturas primárias das defensinas com *VuDef₁* e DD, nos indicou tanto a posição favorável quanto o aminoácido a ser alterado e dois novos peptídeos foram desenhados. Estes peptídeos foram testados por ensaio de inibição do crescimento, avaliado por absorbância (620 nm), na mesma concentração e sobre as mesmas leveduras testadas para DD e foram escolhidas as leveduras mais sensíveis para cada peptídeo para os demais ensaios. Por ensaios antimicrobianos foram determinadas a concentração inibitória mínima, a dose letal (DL_{100}) e o tempo de morte. O efeito antifúngico dos peptídeos foi confrontado ao fármaco de referência fluconazol e a toxicidade sobre células de mamíferos foi avaliada na DL_{100} determinada para as leveduras. Com os parâmetros de DL_{100} e tempo de morte, foi estudado o mecanismo de ação por microscopias ópticas e de fluorescência com sondas específicas para a produção de espécies reativas de oxigênio, permeabilização de membrana, funcionalidade mitocondrial e via de morte celular. Adicionalmente, testes de viabilidade foram realizados na presença de ácido ascórbico e de um inibidor de caspases, para verificar o envolvimento do estresse oxidativo e caspases na morte celular induzida pelos peptídeos, respectivamente. Nossos resultados mostraram que os peptídeos desenhados, com

aumento na carga líquida (RR) e na hidrofobicidade (WR), apresentaram melhora na atividade antifúngica ao inibir mais espécies de levedura e com melhor potência em relação a DD. *Candida tropicalis* e *Candida albicans* foram escolhidas para os demais testes para RR e WR, respectivamente. O peptídeo RR apresentou DL₁₀₀ de 27,5 µM e tempo de morte de 6 h sobre *C. tropicalis*, enquanto o peptídeo WR apresentou DL₁₀₀ de 27,5 µM e tempo de morte de 1 h sobre *C. albicans*. Além disso, RR e WR apresentaram melhor atividade que o fluconazol e baixa toxicidade para monócitos humanos e macrófagos murinos na mesma DL₁₀₀ e tempo de morte determinados para as leveduras. Por análises microscópicas foram observadas vacuolização/granulação do citoplasma das leveduras. RR e WR induziram o aumento do estresse oxidativo, a permeabilização de membrana e possível alteração da funcionalidade mitocondrial no tempo estudado. Caspases não participam da via de morte induzida pelos peptídeos e há marcação positiva para iodeto de propídio. Estes resultados indicam que a morte das leveduras está ocorrendo por necrose. Nosso estudo fornece evidências experimentais de que mudanças direcionadas na estrutura primária de peptídeos baseados no γ -core das defensinas de plantas pode ser uma boa ferramenta para a síntese de novos compostos que podem ser úteis como fármacos alternativos aos antifúngicos existentes.

ABSTRACT

Fungal resistance to available drugs is a serious threat to public health, requiring the development of new antifungals. In this context, the design and synthesis of peptides based on antimicrobial peptides has shown to be promising, because it allows changes in amino acid residues resulting in the improvement of the antifungal activity. We have been working with the plant defensin *VuDef*₁ from seeds of *Vigna unguiculata* (L.) Walp (cowpea). From its γ -core, the region responsible for the biological activity of the molecule, a 15 amino acid peptide, called *A*_{36,42,44}*Y*₃₂₋₄₆ *VuDef* (abbreviated DD), was synthesized. DD, at the concentration of 18,5 μ M, has inhibitory activity on *Leishmania amazonensis* as potent as the entire *VuDef*₁. Due to the inhibitory activity of DD on *L. amazonensis* we tested it, at the same conditions, on pathogenic yeasts. However, DD was inactive. The objective of this work was to improve the inhibitory activity of DD against yeasts by changing its biochemical parameters by targeted substitutions in its amino acids. Initially, a database search was performed on articles that correlated the primary structure and biological activity of plant defensins. The comparison of the primary structures of the defensins with *VuDef*₁ and DD, indicated both the favorable position and the amino acid to be changed and two new peptides were designed. These peptides were tested by growth inhibition assay, evaluated by absorbance (620 nm), on the same yeasts tested for DD and the most sensitive yeasts were chosen for each peptide for further assays. By antimicrobial assays were determined the minimum inhibitory concentration, the lethal dose (DL₁₀₀) and the time of death. The antifungal effect of the peptides was faced to the reference drug fluconazole and the toxicity on mammalian cells was evaluated in the DL₁₀₀ determined for the yeasts. With the parameters of DL₁₀₀ and time of death, the mechanism of action was studied by optical and fluorescence microscopies with specific probes for the production of reactive oxygen species, membrane permeabilization, mitochondrial functionality and cell death pathway. In addition, viability tests were performed in the presence of ascorbic acid and a caspase inhibitor, to verify the involvement of oxidative stress and caspases in cell death induced by the peptides, respectively. Our results showed that the designed peptides, with an increase in net charge (RR) and hydrophobicity (WR), showed improvement in their antifungal activity by inhibiting more yeast species and with better potency in relation to DD. For further tests *Candida tropicalis* and *Candida albicans* were chosen for RR and WR, respectively. RR has a DL₁₀₀ of 27.5 μ M and a

time of death of 6 h on *C. tropicalis*, while the WR has a DL₁₀₀ of 27.5 μM and a time of death of 1 h on *C. albicans*. Besides, RR and WR presented better activity than fluconazole and low toxicity to human monocytes and murine macrophages. Microscopic analyzes showed vacuolization/granulation of the yeasts cytoplasm. RR and WR induced an increase in oxidative stress, membrane permeabilization and possible change in mitochondrial functionality in the studied time. Caspases do not participate in the peptide-induced death pathway and there is positive staining for propidium iodide. These results indicate that yeast death is occurring due to necrosis. Our study provides experimental evidence that targeted changes in the primary structure of peptides based on the γ-core of plant defensins can be a good tool for the synthesis of new compounds that may be useful as alternative drugs to existing antifungals.

1. INTRODUÇÃO

As doenças fúngicas têm sido um dos tópicos mais negligenciados pelas autoridades de saúde pública, matando mais de 1,5 milhão e afetando mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo. As doenças causadas por protozoários, bactérias e vírus foram reconhecidas como importantes questões de saúde pública durante séculos, no entanto as infecções fúngicas invasivas só foram reconhecidas como medicamente importantes na década de 1980 (Rodrigues e Nosanchuk, 2020). A mudança nesse cenário ocorreu devido ao aumento no número de pacientes imunocomprometidos, com asma, síndrome da imunodeficiência adquirida, câncer, que passaram por transplante de órgãos e terapias com corticosteroides. Estes pacientes são altamente suscetíveis às infecções fúngicas, adquirindo-as com frequência (Bongomin *et al.*, 2017; Rodrigues e Nosanchuk, 2020).

Em geral, as doenças fúngicas podem ser agudas graves, como as infecções fúngicas da córnea (ceratite) que afeta cerca de 1,4 milhão de pessoas, deixando mais de 600.000 cegos anualmente (Brown *et al.*, 2020); recorrentes, como a candidíase vulvovaginal que afeta cerca de 138 milhões de mulheres anualmente (Denning *et al.*, 2018); ou crônicas, como aspergilose pulmonar com cerca de 552 milhões de casos registrados anualmente (Hammond *et al.*, 2020). Levantamentos feitos pelo Fundo de Ação Global para Infecções Fúngicas (GAFFI, do inglês *Global Action Fund for Fungal Infections* (2020)) apontam que mais de 300 milhões de pessoas sofrem de infecção fúngica grave em todo o mundo. A mortalidade associada a estas infecções é semelhante à tuberculose e três vezes maior que a malária. Além disso, quase 1 bilhão de pessoas têm micoses cutâneas todos os anos, o que torna essa doença quase tão comum quanto dores de cabeça e cáries dentárias, estando entre as 10 causas mais comuns de consultas ambulatoriais (Ashraf *et al.*, 2020). O diagnóstico precoce e preciso permite a terapia antifúngica imediata, evitando o aumento do número de mortes, podendo salvar mais de 80% dos pacientes. No entanto, o diagnóstico costuma ser atrasado ou está indisponível, causando morte, doença crônica séria ou cegueira de mais de 25 milhões de pessoas todos os anos (Bongomin *et al.*, 2017; Rodrigues e Nosanchuk, 2020).

A aspergilose pulmonar associada à influenza é uma complicação fúngica emergente da influenza grave, ocorrendo em até 20% dos pacientes em unidade de

tratamento intensivo (UTI) com influenza, com alta mortalidade (51%) em comparação aos pacientes em UTI com influenza sem aspergilose (28%) (Beer *et al.*, 2020). Embora existam poucas publicações, estudos recentes têm mostrado que os pacientes com COVID-19, especialmente os gravemente enfermos ou imunocomprometidos com internação hospitalar mais longa em UTI, têm maior probabilidade de sofrer de infecções fúngicas invasivas (Chen *et al.*, 2020; Hoenigl, 2020). Na Alemanha, por exemplo, a aspergilose pulmonar invasiva associada a COVID-19 foi encontrada em cinco de 19 pacientes em estado crítico de síndrome respiratória aguda (Koehler *et al.*, 2020). Em um estudo realizado por Yang e colaboradores (2020), foi relatado que cinco de 99 pacientes com COVID-19, tratados em Wuhan na China, em janeiro de 2020, estavam com coinfeções fúngicas causadas por *Aspergillus*, *Candida glabrata* e *Candida albicans*. Três meses depois, foi relatado que nove pacientes, dos 27 com COVID-19 na UTI, estavam com aspergilose pulmonar invasiva. Em um hospital de Barcelona, 7 pacientes de um total de 989 com COVID-19, tiveram infecções fúngicas causadas por *Aspergillus fumigatus* (3 pacientes) e por *C. albicans* (4 pacientes). Esses pacientes estavam gravemente enfermos, recebiam suporte de ventilação mecânica e altas doses de corticosteroide (Garcia-Vidal *et al.*, 2021).

Além do que foi relatado, o surgimento acelerado de microrganismos patogênicos multirresistentes tem se tornado um grande problema de saúde pública, principalmente quando associados a outras doenças (Du *et al.*, 2020; Costa-de-Oliveira e Rodrigues, 2020; Koehler *et al.*, 2020). As infecções fúngicas invasivas causadas por fungos resistentes estão associadas a altas taxas de mortalidade, levando a óbito cerca de um milhão e meio de pessoas todos os anos ao redor do planeta (Brown *et al.*, 2012; Galocha *et al.*, 2019). Neste cenário, as manifestações clínicas mais comuns estão relacionadas aos fungos do gênero *Aspergillus* e *Candida* (CDC, 2019; Perlin *et al.*, 2017).

Em ambiente hospitalar, a *C. albicans* é a principal espécie responsável por infecções invasivas com risco de morte. No entanto, casos de resistência em várias espécies de *Candida* que não *C. albicans* tem sido cada vez mais relatados (Arendrup e Patterson, 2017; Perlin *et al.*, 2017). Pfaller e colaboradores (2019) avaliaram a atividade de antifúngicos sobre vários isolados invasivos de *Candida* coletados em 135 centros médicos em todo o mundo (1997–2016). Esta análise feita dos últimos

20 anos revelou que há um acelerado aumento nos casos de infecções invasivas causadas por espécies resistentes de *C. glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. Além disso, infecções causadas pela espécie emergente e multirresistente *Candida auris* têm sido cada vez mais relatada em infecções nosocomiais (Du *et al.*, 2020).

A *C. auris* foi isolada inicialmente no canal auditivo de um paciente hospitalizado no Japão em 2009 (Sato *et al.*, 2009) e, até os dias atuais, já foram relatados surtos em vários países em seis continentes diferentes (Lone e Ahmad, 2019). Esta espécie mostrou ser resistente a várias classes de antifúngicos, como os azóis, anfotericina B e equinocandinas, causando infecções invasivas graves com altas taxas de mortalidade, chegando a 75% (Lockhart *et al.*, 2017). Embora *C. auris* seja menos virulenta que *C. albicans* em modelos animais de candidíase sistêmica, *C. auris* comumente exibe fenótipos resistentes e capacidade de formar biofilmes, podendo persistir em equipamentos médicos e também na pele humana por longos períodos sem causar sintomas evidentes. Tais características impedem que os antifúngicos atinjam seus alvos celulares (Horton *et al.*, 2020; Lionakis e Hohl, 2020).

Surtos de infecções por *C. auris* associadas a COVID-19 também têm sido relatadas. No México, dos 52 pacientes internados em UTIs, 12 estavam com infecções associadas à *C. auris*. Todos os pacientes afetados estavam sob ventilação mecânica, tinham cateteres venosos centrais de inserção periférica, cateteres urinários e permanência hospitalar prolongada (20–70 dias). Cinco deles morreram. Além disso, os testes de suscetibilidade antifúngica mostraram que todos os isolados possuíam resistência a pelo menos um antifúngico e 8 deles eram multirresistentes (Villanueva-Lozano *et al.*, 2021). Em um hospital do Líbano, 13 pacientes com *C. auris* foram identificados, sete deles estavam com COVID-19 antes da infecção fúngica e destes, cinco vieram a falecer (Allaw *et al.*, 2021). Os fatores de risco clássicos comumente encontrados nestes pacientes incluem diabetes mellitus, uso de múltiplos antibióticos, insuficiência renal e uso de cateteres venosos centrais, mas outros fatores especificamente associados à COVID-19, como o uso excessivo de corticosteroides, contribuem para a candidemia associada a esta doença. Nestes casos a detecção rápida e a notificação dos casos são essenciais, uma vez que ainda não se sabe ao certo como a coinfeção fúngica impacta na mortalidade dos pacientes (Allaw *et al.*, 2021; Villanueva-Lozano *et al.*, 2021).

Para tornar a situação ainda mais preocupante, existem apenas quatro classes principais de medicamentos disponíveis para o tratamento sistêmico de infecções invasivas causadas por *Candida*, são eles os azóis (como o fluconazol), os polienos (como a anfotericina B), as equinocandinas (como a caspofungina) e o análogo da pirimidina flucitosina. Entre essas classes de medicamentos, apenas o fluconazol e as equinocandinas são recomendados como agentes de primeira linha para candidíase invasiva (Arendrup e Patterson, 2017). Diante deste fato, quando uma classe de antifúngicos se torna ineficaz no tratamento de uma infecção fúngica devido à resistência, as opções terapêuticas disponíveis se tornam ainda mais limitadas. Além disso, o uso indevido e sem controle dos medicamentos antifúngicos disponíveis, com ênfase especial em medicamentos fungistáticos, como o fluconazol, tem aumentado a prevalência de espécies fúngicas resistentes (Lone e Ahmad, 2019).

Atualmente, a resistência a todas as classes de drogas antifúngicas já foi caracterizada na maioria das espécies de fungos que infectam humanos, inclusive em *Candida* (Berman e Krysan, 2020). O surgimento destas cepas multirresistentes é uma grande preocupação, sendo fundamental que esforços sejam feitos na vigilância global para detectar, caracterizar e relatar espécies patogênicas emergentes (Pfaller *et al.*, 2019). Além disso, torna-se evidente a necessidade em desenvolver e testar novos antifúngicos que tenham amplo espectro de atuação, baixa toxicidade para os seres humanos e atuem de forma alternativa aos antifúngicos existentes, tanto para contornar o problema da resistência disseminada entre agentes infecciosos quanto para combater novos patógenos emergentes como *C. auris* (Lone e Ahmad, 2019).

Diante deste problema, o uso de peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) como possíveis agentes terapêuticos tem sido proposto (Wang *et al.*, 2019; Ghosh *et al.*, 2019; Ullivarri *et al.*, 2020).

1.1 Peptídeos Antimicrobianos

Os AMPs são moléculas filogeneticamente antigas e amplamente encontradas na natureza, sendo descritas em bactérias, protozoários, fungos, plantas e animais (**Figura 1**) (Mookherjee *et al.*, 2020). O interesse sobre os AMPs se iniciou na década de 80, quando estudos começaram a identificar e caracterizar suas propriedades antimicrobianas. Entre estes estudos, destacam-se os trabalhos de Steiner e colaboradores (1981), que isolaram a cecropina da hemolinfa de mariposa da seda

Hyalophora cecropia e esta apresentou forte atividade antibacteriana; os trabalhos de Selsted e colaboradores (1985), que caracterizaram as defensinas, isoladas de macrófagos de coelho, e mostraram sua forte atividade antibacteriana; e o trabalho de Zasloff (1987), que isolou a magainina da pele do sapo africano *Xenopus laevis* e demonstrou sua capacidade de inibir o crescimento de bactérias, fungos e protozoários. A partir de então, vários estudos mostraram que os AMPs são componentes essenciais da imunidade inata de diversos organismos (Pasupulete *et al.*, 2012).

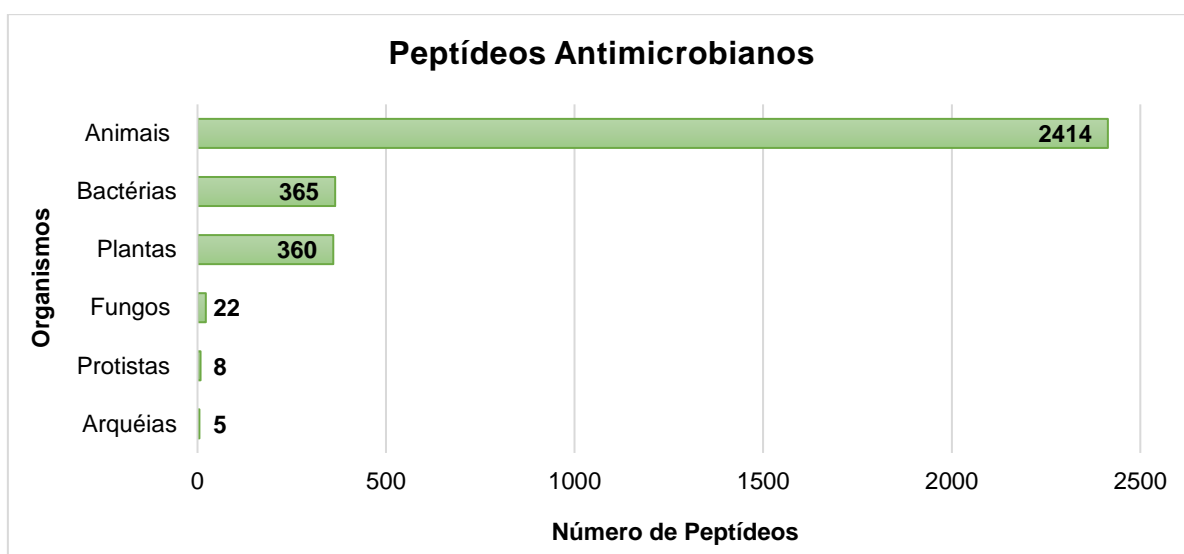


Figura 1: Distribuição dos AMPs nos seis reinos, de acordo com o *Antimicrobial Peptide Database* (APD, 2020). Este banco de dados contém 3.257 AMPs registrados.

A expressão dos AMPs difere dependendo do tipo de célula e tecido, mas, na maioria dos casos, os AMPs são expressos por genes específicos, de forma constitutiva ou induzidos por fatores externos específicos (Lai e Gallo, 2009; Wang *et al.*, 2019). Em organismos multicelulares, por exemplo, alguns AMPs expressos constitutivamente são armazenados em altas concentrações como precursores inativos e liberados localmente nos locais de infecção após uma clivagem proteolítica que os tornam ativos, enquanto a expressão de outros é induzida em resposta a padrões moleculares associados a patógenos ou citocinas. Alguns AMPs ainda, se originam como produtos de clivagem de proteínas maiores (Bals 2000; Mahlapuu *et al.*, 2016).

Apesar de possuírem uma grande diversidade em sua sequência, estrutura e fontes, existem algumas propriedades comuns a quase todos eles e que são fundamentais para a sua atividade biológica. Em geral, os AMPs são moléculas pequenas, com menos de 100 resíduos de L-aminoácidos, que podem ser estabilizadas por pontes dissulfeto formadas por resíduos de cisteínas. Estas pontes dissulfeto contribuem para a formação de uma estrutura tridimensional resistente às variações de temperatura, pH e à degradação química e proteolítica (Wang *et al.*, 2019). Com base em sua composição de aminoácidos, tamanho e estruturas conformacionais, os AMPs podem ser classificados em quatro famílias principais: família α , com peptídeos lineares que apresentam estrutura α -hélice (**Figura 2A**); família β , com peptídeos apresentando ao menos um par de fitas β estabilizadas por pontes dissulfeto (**Figura 2B**); família $\alpha\beta$, com peptídeos que apresentam α -hélice e folhas β estabilizadas por pontes dissulfeto (**Figura 2C**); e família não- $\alpha\beta$, com peptídeos que não apresentam nem α -hélice ou folhas β , mas uma estrutura estendida ou em *loop* (**Figura 2D**) (Rončević *et al.*, 2019).

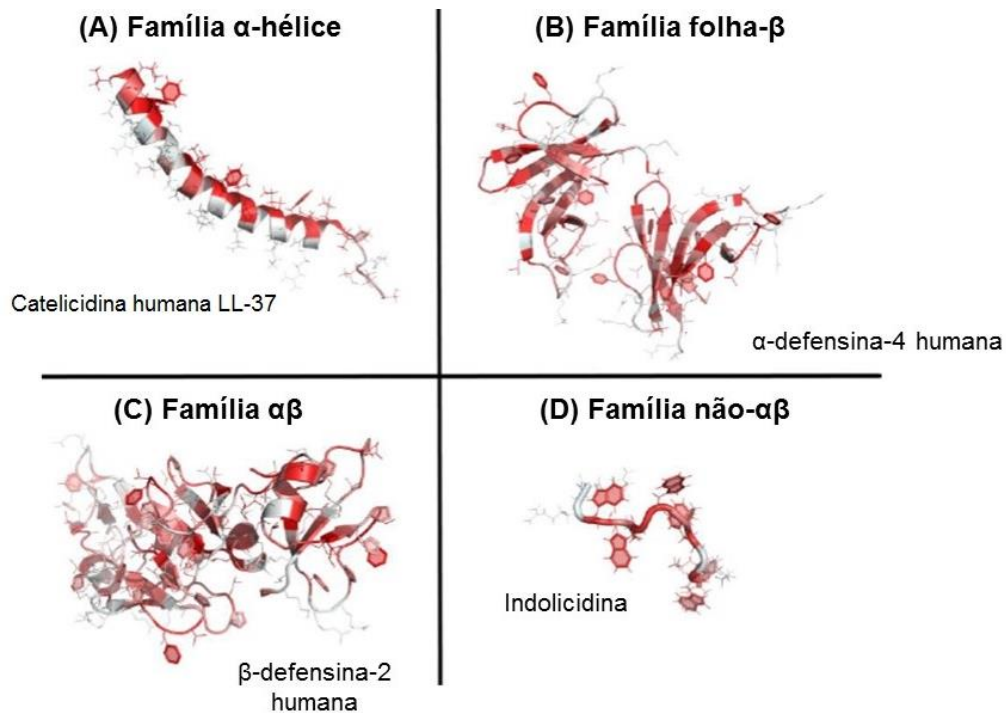


Figura 2: Visão geral das principais famílias estruturais de AMPs. Os aminoácidos foram coloridos de acordo com a escala de hidrofobicidade de Eisenberg (cinza claro – hidrofílico; vermelho – hidrofóbico). Adaptado de Rončević *et al.* (2019).

Em relação às suas características biofísicas, em geral, os AMPs possuem em sua estrutura aminoácidos catiônicos, como lisina e arginina, que garantem carga líquida positiva (+2 a +9) em pH fisiológico, aminoácidos hidrofóbicos, que normalmente compõem 50% da sequência, e estrutura anfipática (Nawrot *et al.*, 2014; Bahar e Ren, 2013; Wang *et al.*, 2019). Tais características permitem a interação com membranas microbianas, garantindo aos AMPs um amplo espectro de atividade antimicrobiana, inclusive sobre microrganismos patogênicos resistentes, diversos mecanismos de ação, que diferem dos antimicrobianos convencionais, e baixa toxicidade para células de mamíferos (Lei *et al.*, 2019). Além disso, já foi descrito que estas moléculas possuem atividade antiparasitária, atuam como antitumorais, no processo de cicatrização de feridas e na sinalização celular (**Figura 3**) (Kumar *et al.*, 2018; Mookherjee *et al.*, 2020; Srivastava *et al.*, 2021).

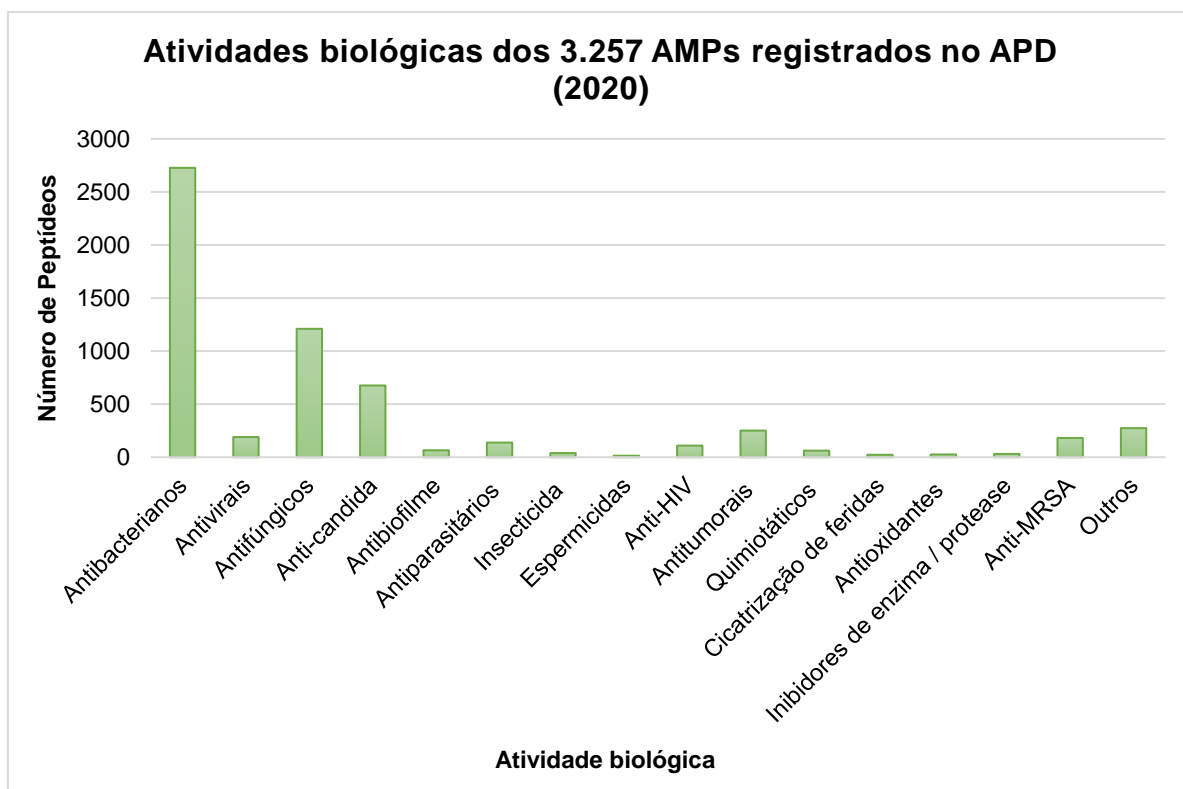


Figura 3: Distribuição de AMPs por sua atividade biológica de acordo com o banco de dados APD (2020). HIV = vírus da imunodeficiência humana (do inglês *human immunodeficiency virus*); MRSA = *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (do inglês *methicilin resistant Staphylococcus aureus*).

Apesar da base molecular dos mecanismos de ação pelos quais os AMPs agem sobre os patógenos ser muito estudada, o exato mecanismo ainda não está completamente elucidado. Acredita-se que, devido à baixa massa molecular, carga positiva e anfipaticidade, os AMPs possuam a capacidade de interagir com componentes aniônicos da membrana celular microbiana e muitas vezes agem comprometendo esta estrutura, resultando em vazamento de íons e metabólitos, despolarização da membrana plasmática, interrupção dos processos respiratórios e morte celular. Vale ressaltar que para as membranas celulares de mamíferos tal interação é menos proeminente, devido à carga elétrica neutra do folheto externo da membrana plasmática (Broekaert *et al.*, 1995; Huang, 2006; Nawrot *et al.*, 2014). Alternativamente à lise celular, alguns AMPs podem atuar afetando a biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas, bloqueando a atividade de certas enzimas, inibindo a biossíntese da parede celular, ou ainda agindo como carreadores de drogas não permeáveis, facilitando a passagem destas para o interior da célula e entregando-as

em locais específicos de atuação (Le *et al.*, 2017; Corrêa *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019).

Aliado a isto, a síntese química de peptídeos baseados em AMPs naturais tem ganhado destaque nos últimos anos. A partir de modificações químicas direcionadas por trocas de resíduos de aminoácidos, incorporação de aminoácidos não proteicos ou na conformação D, ciclização, acetilação ou amidação da molécula, é possível aumentar a especificidade e a estabilidade do peptídeo, diminuir a toxicidade para células de humanos e proteger o AMP da degradação proteolítica no organismo alvo (Kumar *et al.*, 2018; Mirski *et al.*, 2018; Lei *et al.*, 2019). Outra estratégia interessante para melhorar as propriedades dos AMPs é anexá-los a sistemas de entrega, tais como materiais inorgânicos e poliméricos, sistemas a base de lipídeos e surfactantes ou peptídeos. Estes, além de melhorar a estabilidade do peptídeo, diminuem a degradação química ou biológica, reduzem os efeitos colaterais adversos, aumentam a meia-vida útil e podem otimizar o perfil de liberação dos AMPs (Li *et al.*, 2012; Urbán *et al.*, 2012; Nordström e Malmsten, 2017). Tais características tornam os AMPs moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos medicamentos, fato demonstrado por 77 AMPs já estarem em fase pré-clínica ou clínica de teste para uso comercial, segundo o Repositório de Dados de Peptídeos Antimicrobianos (DRAMP, 2020) (Aoki e Ueda, 2013; Kang *et al.*, 2017; Ghosh *et al.*, 2019).

O HXP124, por exemplo, é um novo AMP candidato a fármaco em desenvolvimento clínico para o tratamento tópico de infecções fúngicas. Este AMP está sendo desenvolvido pela Hexima Ltd., uma empresa de biotecnologia, sediada em Melbourne (Austrália), que trabalha no desenvolvimento de peptídeos e proteínas derivados de plantas para aplicações na agricultura e na farmacêutica (Hexima, 2021). O HXP124 é uma nova defensina de planta com atividade fungicida de amplo espectro contra patógenos humanos clinicamente importantes, incluindo *Candida spp*, *Cryptococcus spp*, fungos dermatófitos e não dermatofíticos. Em particular, o HXP124 tem excelente atividade contra fungos dermatófitos que infectam a pele e as unhas. Além disso, ele penetra rápida e eficientemente nas unhas humanas e em concentrações mais baixas do que os medicamentos antimicóticos atuais, incluindo efinaconazol e terbinafina, sem induzir irritação dérmica em mais de 10 vezes a concentração pretendida para uso clínico. Tais características tornaram o HXP124 um alvo ideal para o desenvolvimento de um novo tratamento para onicomicose, uma

infecção fúngica da unha que afeta cerca de 14% da população mundial (van der Weerden *et al.*, 2018). Recentemente, a Hexima Ltd. conduziu testes clínicos de fase I / IIa em humanos para avaliar a segurança, a tolerabilidade e eficácia da aplicação tópica diária por 6 semanas em pacientes com onicomicose leve a moderada (ID de Ensaios Clínicos Australianos: ACTRN12618000131257). Como resultado, o HXP124 demonstrou um perfil de segurança favorável, reduzindo substancialmente a área de infecção em pacientes com um período de tratamento muito mais curto do que as melhores terapias atuais (Mercer e O'Neil, 2020; Hexima, 2021). O Ensaio clínico de fase IIb, testando o HXP124 em 132 pacientes australianos e neozelandeses com onicomicose, está prevista para o segundo trimestre de 2022 (Hexima, 2021). Este estudo demonstra o potencial que os AMPs de plantas possuem para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos.

1.2 AMPs de Plantas

As plantas estão constantemente expostas a diversos fatores físicos, químicos, assim como predadores e patógenos, mas ao contrário dos animais, são organismos sésseis e não podem fugir da agressão. Sendo assim, as plantas selecionaram durante a evolução uma impressionante variedade de moléculas de defesa para conferir proteção, caso suas barreiras físicas sejam ultrapassadas. Muitas destas moléculas de defesa são AMPs, isoladas em diferentes órgãos vegetais, e desempenham um papel fundamental na proteção contra insetos e infecções fúngicas e bacterianas (Srivastava *et al.*, 2021).

Os AMPs das plantas são divididos em famílias de acordo com a similaridade na sequência de aminoácidos, espaçamento entre as cisteínas e arranjos distintos de pontes dissulfeto, que determinam sua conformação na estrutura terciária. As principais famílias de AMPs de plantas, com base nesses critérios são: as tioninas, os peptídeos similares à heveína, os peptídeos similares à knotina (linear e cíclico), as proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs, do inglês *lipid transfer proteins*), as snakinas, as α -hairpininas e as defensinas (**Figura 4**) (Tam *et al.*, 2015; Finkina *et al.*, 2018).

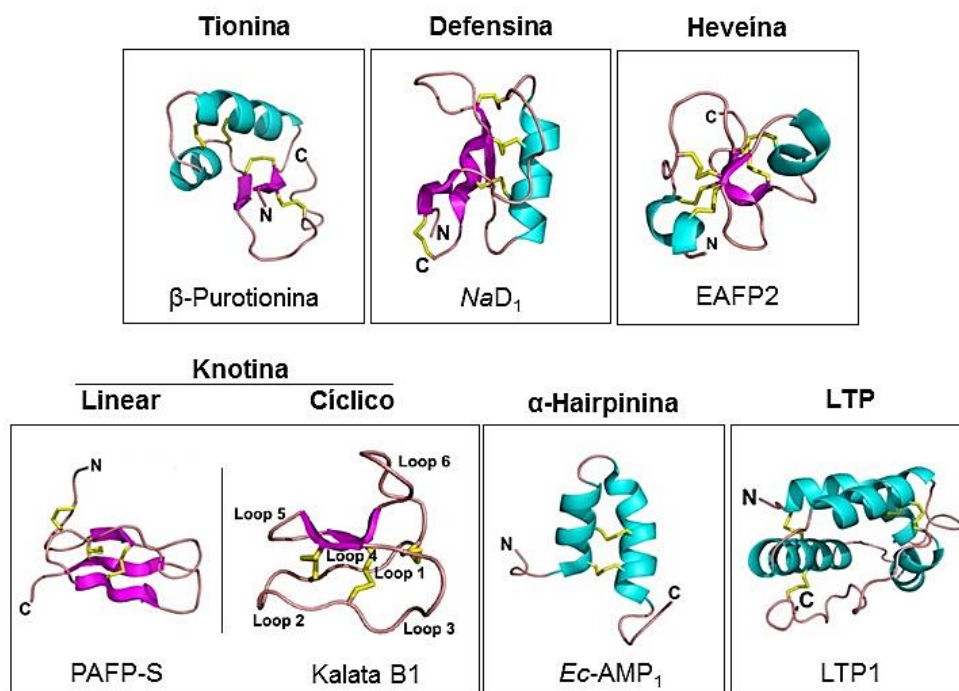


Figura 4: Estrutura tridimensional de algumas famílias de AMPs de plantas. Os elementos estruturais são representados por diferentes cores: ciano – α -hélice; magenta – fita- β ; rosa claro – região de volta (*loop*); amarelo – pontes dissulfeto. O N e o C indicam o N- e o C-terminal, respectivamente. Para o nome e fonte dos peptídeos, consultar a lista de abreviaturas. Adaptado de Tam *et al.* (2015).

Entre estas famílias, as defensinas de plantas são as mais bem caracterizadas, desempenham um papel fundamental na defesa contra bactérias e fungos fitopatogênicos e compartilham similaridade estrutural e funcional com defensinas de vertebrados e invertebrados (Broekaert *et al.*, 1995). Estes peptídeos foram inicialmente isolados de *Triticum aestivum* L. (trigo) e *Hordeum vulgare* L. (cevada) no início da década de 90 e caracterizados como uma subclasse das tioninas, denominadas de γ -tioninas, devido à similaridade de tamanho, carga básica e números de pontes dissulfeto com esta outra família de AMPs de plantas (Collila *et al.*, 1990; Mendez *et al.*, 1990). Estudos posteriores mostraram que haviam diferenças entre as γ -tioninas e as tioninas clássicas, como o espaçamento de aminoácidos entre os resíduos de cisteína, o pareamento das pontes dissulfeto e a estrutura tridimensional. Ao mesmo tempo, verificou-se que as γ -tioninas se assemelhavam com as defensinas de insetos e mamíferos. Dessa forma, as γ -tioninas foram

renomeadas como defensinas de plantas (Broekaert *et al.*, 1995; Bruix *et al.*, 1993; Terras *et al.*, 1995).

As defensinas de plantas formam uma grande família de pequenos peptídeos que possuem entre 45 e 54 resíduos de aminoácidos, básicos, catiônicos e ricos em resíduos de cisteína (**Figura 5A**). Todas as defensinas de plantas compartilham uma estrutura tridimensional altamente conservada, responsável pelas características físico-químicas dessas moléculas. A estrutura é formada por três fitas- β antiparalelas e uma α -hélice estabilizada por oito resíduos de cisteína que formam quatro pontes dissulfeto seguindo o padrão: C₁-C₈, C₂-C₅, C₃-C₆ e C₄-C₇ (Kovaleva *et al.*, 2020), com exceção das defensinas de *Petunia hybrida*, *PhD1* e *PhD2* (Petúnia), que possuem cinco pontes dissulfeto (**Figura 5B**). Esta ponte dissulfeto adicional não altera a estrutura tridimensional conservada (Lay *et al.*, 2003).

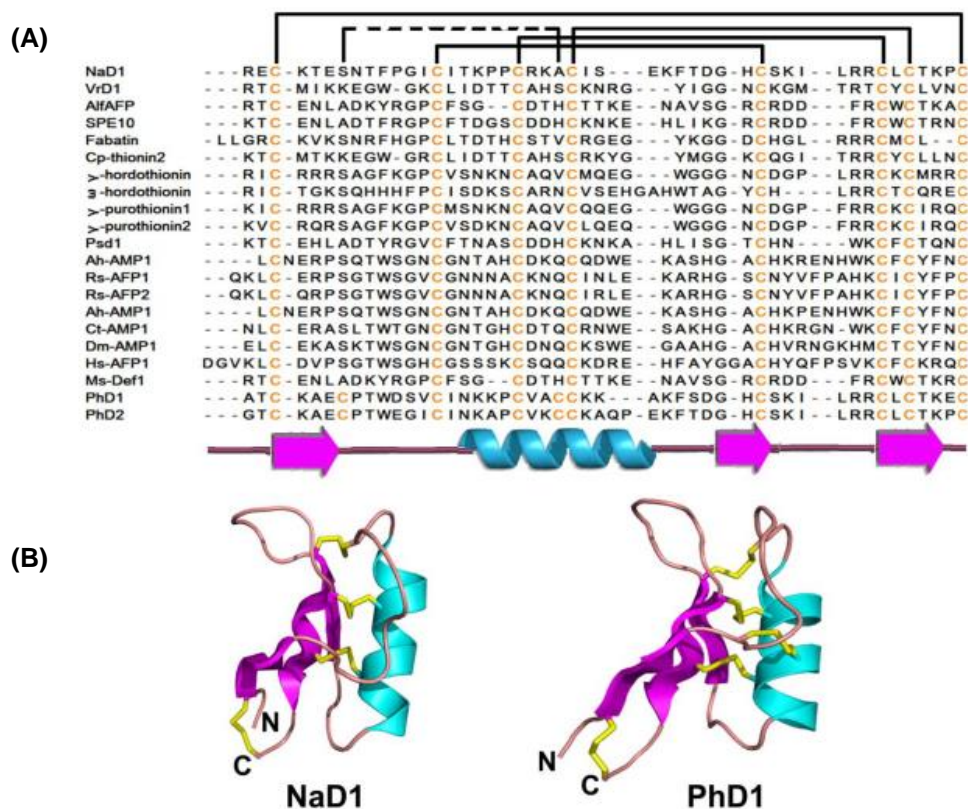


Figura 5: Sequências primária, secundária (A) e terciária (B) de defensinas de plantas. As estruturas secundárias são representadas por diferentes cores: α -hélice – ciano; folhas- β – magenta; regiões de volta – rosa claro; pontes dissulfeto – amarelo. O N e o C indicam o N- e o C-terminal, respectivamente. Para o nome e fonte dos peptídeos, consultar a lista de abreviaturas. Adaptado de Tam *et al.* (2015).

Duas das pontes dissulfeto que estão localizadas entre a α -hélice e a fita- β_3 formam um elemento estrutural chamado elemento estrutural $\alpha\beta$ estabilizado por cisteínas (Csa β , do inglês *cysteine-stabilized α -helix β -sheet motif*), comumente encontrado em peptídeos biologicamente ativos (Cornet *et al.*, 1995; Carvalho e Gomes, 2009). Como este par de pontes dissulfeto desse elemento estrutural ocorre entre os mesmos elementos secundários, α -hélice e fita- β , e também por estarem na mesma direção, as defensinas de plantas são classificadas como pertencentes à família das *cis*-defensinas (**Figura 6A**) (Shafee *et al.*, 2016). Esta família abrange ainda as defensinas de fungos e animais invertebrados, que usam esse enovelamento básico, mas com número de pontes dissulfeto e comprimento de alças variados, abrangendo uma ampla gama de funções biológicas (**Figura 6B**) (Parisi *et al.*, 2019b).

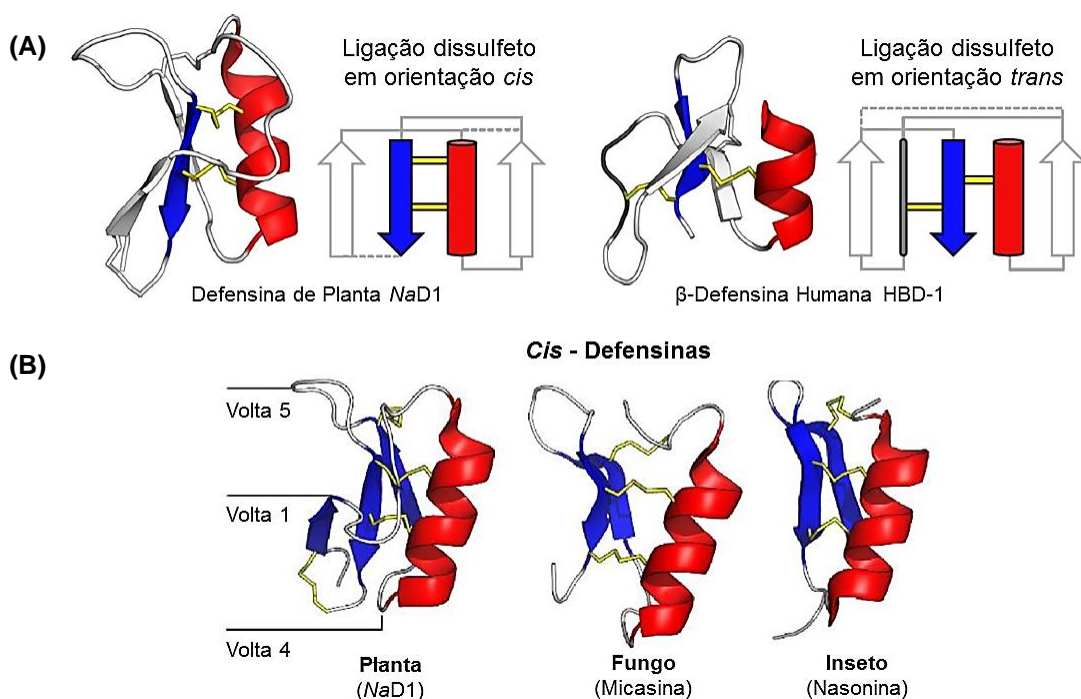


Figura 6: **(A)** Arquitetura da *cis*-defensina (NaD₁) e *trans*-defensina (β -defensina humana HBD-1). Note as pontes dissulfeto na mesma direção nas *cis*-defensinas e em direções opostas nas *trans*-defensinas. Adaptado de Shafee *et al.* (2016). **(B)** Similaridade estrutural entre *cis*-defensinas de diferentes espécies: defensiva de planta NaD₁; defensiva de fungo Micasina (*Microsporium canis*); defensiva de inseto Nasonina (*Nasonia vitripennis*). Adaptado de Parisi *et al.* (2019b). As estruturas secundárias são representadas por diferentes cores: α -hélice – vermelho; folha- β – azul; pontes dissulfeto – amarelo.

Em relação à estrutura primária das defensinas de plantas, ocorre grande variação estrutural, com exceção dos oito resíduos de cisteína e uma glicina conservada na posição 32 (**Figura 7A**) (van der Weerden e Anderson, 2013). A glicina 32 faz parte de um outro elemento estrutural conservado, chamado de γ -core (com a seguinte composição comum para as defensinas de plantas, $X_2-G-X-C-X_{3-9}-C-X_2$, onde X pode ser qualquer aminoácido) (**Figura 7B**). Este também pode ser encontrado em vários outros AMPs que apresentam pelo menos duas folhas β com uma região de volta entre elas (Schaaper *et al.*, 2001; Yount e Yeaman, 2004).

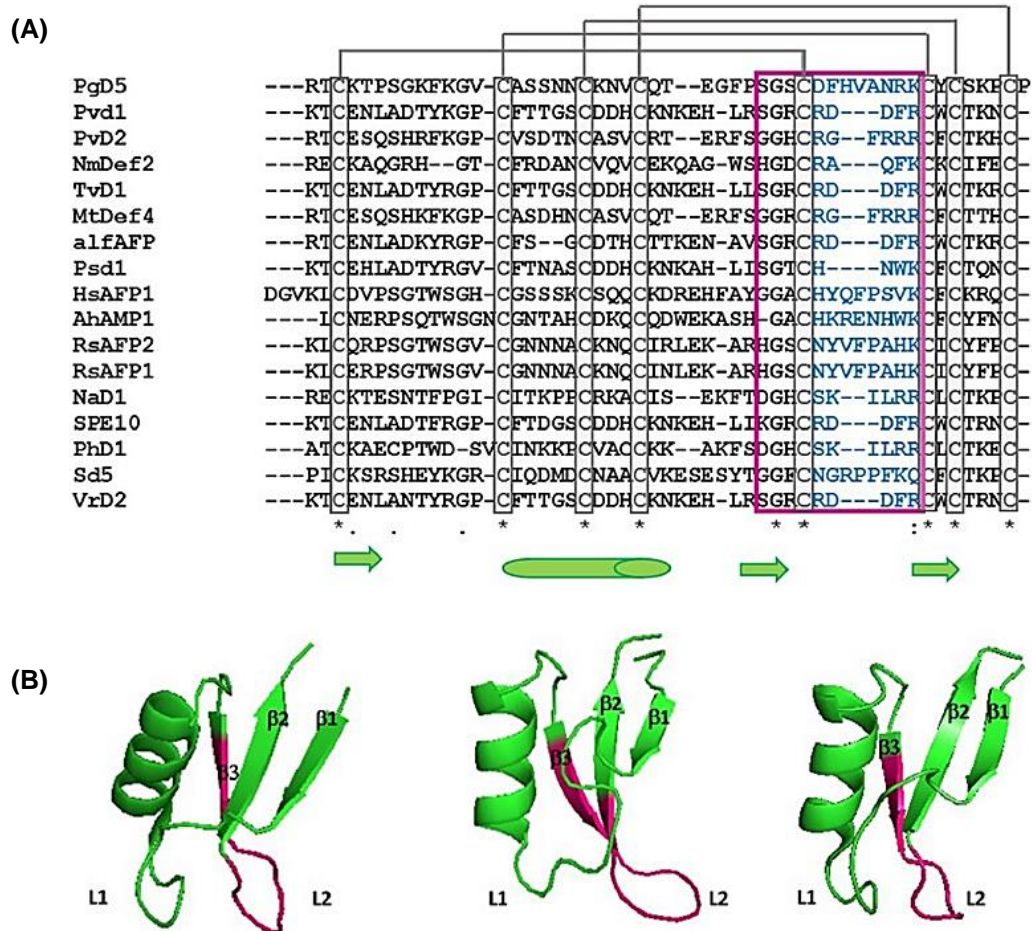


Figura 7: (A) Alinhamento da sequência de aminoácidos de defensinas de plantas. Os asteriscos indicam os resíduos de cisteína conservados (caixas cinzas). As linhas cinzas acima da sequência de aminoácidos representam as pontes dissulfeto entre as cisteínas. A caixa rosa e os aminoácidos azuis correspondem à região γ -core. **(B)** Estrutura tridimensional de três defensinas de plantas. A região rosa destaca o γ -core.

β 1: folha- β 1; β 2: folha- β 2; β 3: folha- β 3; L1: Volta-1; L2: Volta-2. Para o nome e fonte dos peptídeos, consultar a lista de abreviaturas. Adaptado de Lacerda *et al.* (2014).

À medida que o número de defensinas caracterizadas aumenta, a análise da estrutura primária tem permitido um melhor entendimento da relação entre a estrutura e a atividade biológica. Estes estudos têm demonstrado que as maiores variações entre os resíduos de aminoácidos ocorrem nas regiões de volta, principalmente na região de volta entre as fitas β 2 e β 3, compreendendo a região do γ -core (**Figura 7**). Tais variações são responsáveis pela ampla atividade biológica e diferentes mecanismos de ação das defensinas, tais como inibição de tradução de proteínas, inibição de α -amilases e proteases, tolerância a metal pesado, bloqueio de canais iônicos, atividade antibacteriana, antitumoral e antifúngica, inclusive a fungos patogênicos de humanos (Carvalho e Gomes, 2011; van der Weerden e Anderson, 2013; Parisi *et al.*, 2019b). Como consequência, o mecanismo de ação destas moléculas ainda não foi completamente elucidado e tem sido amplamente estudado. Até o momento, o mecanismo de ação mais bem caracterizado para as defensinas de plantas envolve a interação específica com componentes da membrana celular, como glicoproteínas, esfingolipídeos ou fosfolipídeos, permeabilização da membrana plasmática, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e apoptose (Parisi *et al.*, 2019b; Sher Khan *et al.*, 2019).

Vários trabalhos têm demonstrado a importância do γ -core para a atividade biológica das defensinas de plantas. Em um estudo feito por Lin e colaboradores (2007), por exemplo, quatro resíduos de aminoácidos do γ -core da VrD₂ (DDFR) (defensina de *Vigna radiata* (L.) R.Wilczek, feijão mungu) foram substituídos por cinco resíduos de aminoácidos do γ -core da sua isoforma VrD₁ (GMTRT). O interessante é que a defensina VrD₁ possui atividade inibitória sobre α -amilase de insetos, a VrD₂ não, e a quimera feita com troca de aminoácidos, possui atividade inibitória sobre α -amilase de insetos, inexistente na defensina VrD₂. Outro exemplo é o trabalho realizado por Sagaram e colaboradores (2011). Neste, foi testado a atividade antifúngica e morfogênica da defensina MtDef₄ (defensina de *Medicago truncatula* Gaertn., luzerna) e do seu γ -core. Eles observaram que peptídeos curtos derivados do γ -core de MtDef₄ foram capazes de inibir o crescimento do fungo *Fusarium graminearum*. Além disso, demonstraram que a estrutura anfipática do γ -core e os

aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos desta região, estão direta ou indiretamente envolvidos na interação com componentes da membrana plasmática de fungos, como a glicosilceramida. Os dados relatados por estes e outros autores indicam que a região do γ -core possui um papel fundamental na atividade biológica das defensinas, tornando esta região atraente para modificações direcionadas, visando a melhoria da atividade da defensina, ou para a síntese de novos peptídeos bioativos para aplicação terapêutica.

Em alguns casos, não só a composição de aminoácidos da região do γ -core é importante para a atividade biológica das defensinas, mas também a quantidade de aminoácidos, ou seja, o tamanho da volta entre as fitas β_2 e β_3 . Liu e colaboradores (2006) relacionaram o tamanho do γ -core de diferentes defensinas de plantas (**Figura 8A**), assim como a carga dessa região, com a capacidade de inibir ou não a atividade da α -amilase de insetos. Os autores demonstraram que as defensinas com o γ -core de menor comprimento possuíam atividade inibitória sobre a α -amilase de insetos, já aquelas com o γ -core de maior, não. Seus estudos envolvendo modelos computacionais de *docking* mostraram que a alça menor (**Figura 8B**) se insere no sítio catalítico da enzima, bloqueando a sua função. Além disso, os autores sugeriram que os aminoácidos carregados positivamente estão envolvidos na ligação com a enzima ativa.

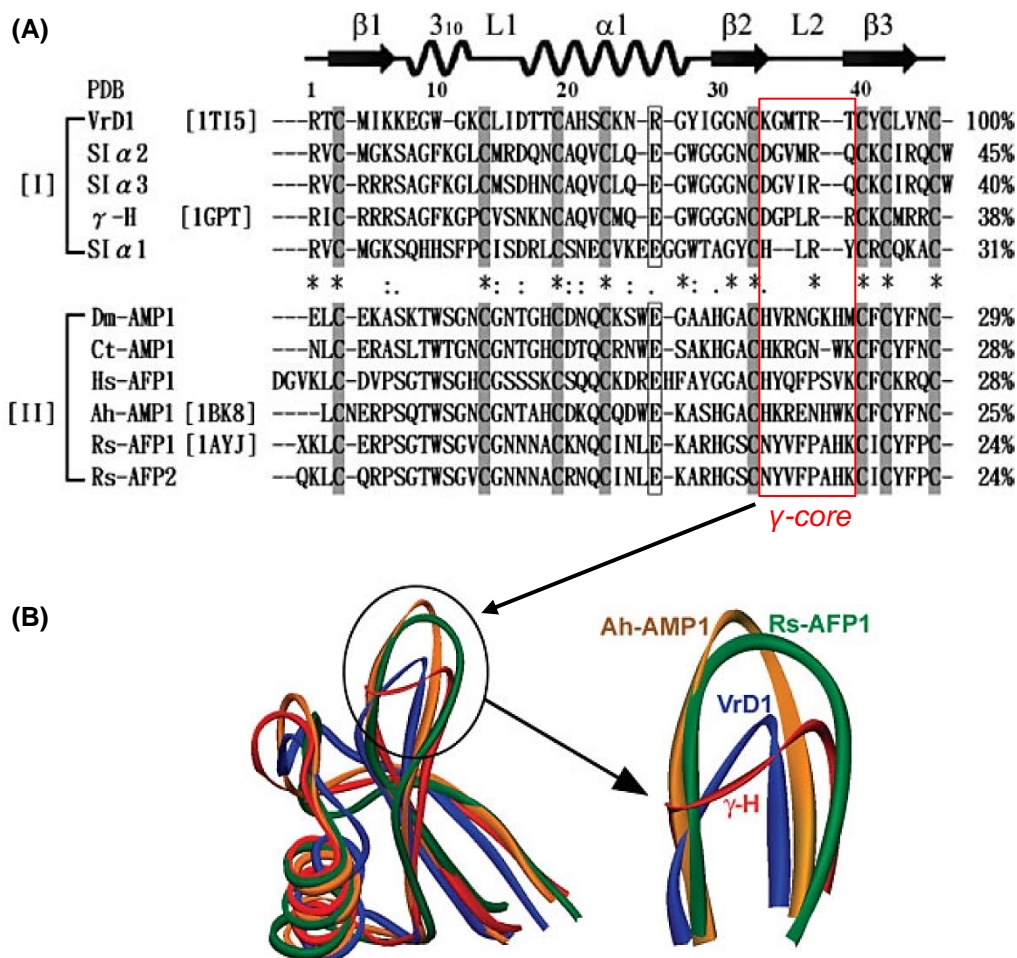


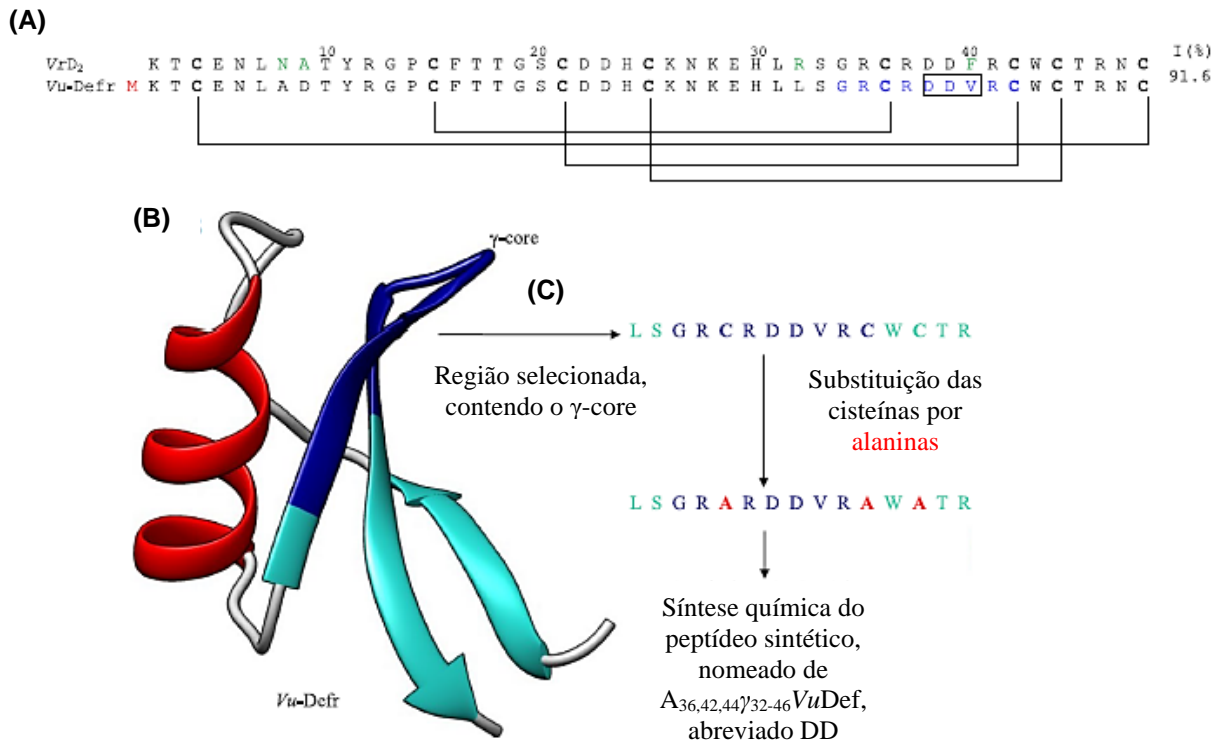
Figura 8: (A) Comparação das sequências de aminoácidos de dois grupos de defensinas de plantas que possuem atividade inibitória sobre α -amilase de insetos (grupo I) e que não possuem (grupo II). A comparação estrutural mostra que há maior diferença nos resíduos de aminoácidos que compõem a volta 2, que compreende o γ -core, destacado pela caixa vermelha. As cisteínas conservadas estão sombreadas de cinza. Para o nome e fonte dos peptídeos, consultar a lista de abreviaturas. **(B)** Comparação das estruturas tridimensionais de dois grupos de defensinas de plantas que possuem atividade inibitória sobre α -amilase de insetos (VrD1 e γ -H) e que não possuem (Ah-AMP₁ e Rs-AFP₁). A comparação das estruturas tridimensionais mostra que o γ -core das defensinas que inibem α -amilase de insetos é menor do que o γ -core das que não inibem. Adaptado de Liu *et al.* (2006).

Além das características já apresentadas acima, estudos mostram que as defensinas não são tóxicas para células de mamíferos nas concentrações que inibem microrganismos, o que viabiliza ainda mais a sua aplicação como possíveis fármacos.

Em um estudo feito por Tavares e colaboradores (2008), os autores mostraram que *Rs-AFP₂* (defensina de *Raphanus sativus* L., rabanete), na concentração de 10 μ M, foi tão ativa quanto o fármaco clínico fluconazol (10 mg/kg) em reduzir a candidíase causada por *C. albicans* em camundongos, sem toxicidade para os animais. Lay e colaboradores (2019) mostraram que a defensina *NoD173* (defensina de *Nicotiana occidentalis* H.-M. Wheeler, tabaco), em baixas concentrações micromolares, foi capaz de inibir cinco linhagens de células tumorais *in vitro* e inibir o crescimento de tumores sólidos (dose de 5 mg/kg) em camundongos. Em conjunto, os dados mostrados acima apontam que as defensinas de plantas podem ser excelentes candidatas a novos agentes terapêuticos.

1.3 Defensina *VuDef₁*

A defensina *VuDef₁* foi inicialmente purificada de sementes de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) e mostrou, a partir de uma análise da atividade antifúngica da fração que a continha, enriquecida com a *VuDef₁* e uma LTP, atividade inibitória sobre o crescimento da cultura de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Saccharomyces cerevisiae* (Carvalho *et al.*, 2001). Esta defensina também apresentou atividade sobre α -amilases de insetos e salivar humana (Dos Santos *et al.*, 2010), e *Leishmania amazonensis* (Souza *et al.*, 2013). Em um estudo realizado por Souza e colaboradores (2019), foi feita a síntese de um peptídeo baseado no γ -core da *VuDef₁*. Este peptídeo, cuja sequência é L₃₂SGRARDDVRAWATR₄₆, foi chamado de A_{36,42,44} γ ₃₂₋₄₆ *VuDef*, no qual a A_{36,42,44} indica a substituição das C nas posições 36, 42 e 44 por A e o γ ₃₂₋₄₆ indica a posição dos aminoácidos na sequência primária da *VuDef₁*, onde se encontra o γ -core. Devido aos dois ácidos aspárticos adjacentes em sua estrutura primária, este peptídeo foi abreviado como DD (**Figura 9**). As cisteínas em DD foram substituídas por alaninas para que não houvesse a formação de pontes dissulfeto, inexistentes no peptídeo natural, e também para evitar que o peptídeo tenha resíduos de cisteína livres (Souza *et al.*, 2019). Os autores testaram sua atividade inibitória sobre *L. amazonensis* na concentração de 18,5 μ M por 24 h, os mesmos parâmetros usados para *VuDef₁*. Nestas condições, o peptídeo sintético foi capaz de inibir 41% do crescimento da cultura de *L. amazonensis*, estatisticamente igual à defensina inteira (*VuDef₁* foi capaz de inibir 51% do crescimento da cultura deste protozoário (**Figura 9E**) (Souza *et al.*, 2019).



(D)

Nome do peptídeo	Tamanho em aminoácidos	Carga líquida (pH 7,0)	Massa molecular (Da)
$A_{36,42,44}V_{32-46}VuDef$	15	+2	1729,92

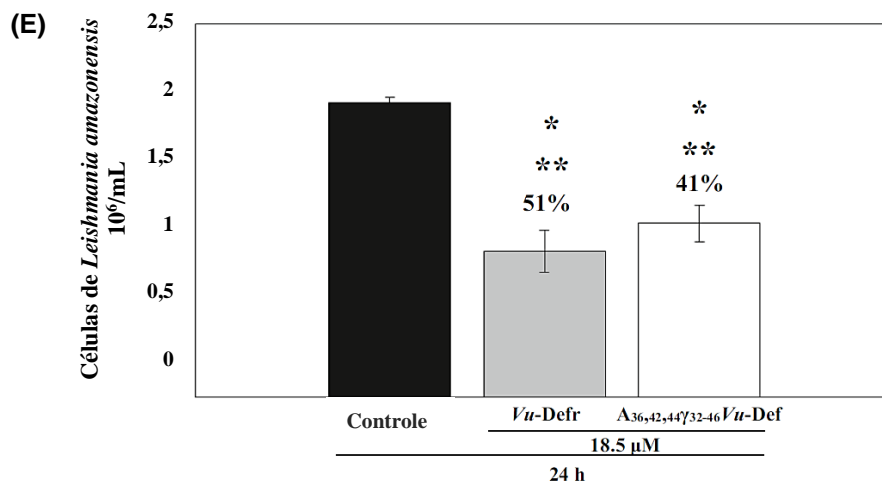


Figura 9: (A) Alinhamento das estruturas primárias das defensinas *Vu-Defr* (*Vigna unguiculata*, feijão-de-corda) e *VrD₂* (*Vigna radiata*, feijão mungu). Os números acima da estrutura primária indicam o tamanho das defensinas em resíduos de aminoácidos. As linhas abaixo dos resíduos de cisteínas (destacados em negrito) em *Vu-Defr* indicam o arranjo de pontes dissulfeto. Os quatro resíduos de aminoácidos que diferem entre as duas estruturas primárias são marcados em verde na sequência

VrD₂. Um resíduo de metionina adicional, marcado em vermelho, foi incluído na estrutura primária de Vu-Defr como um requisito da clonagem. Os resíduos de aminoácidos marcados em azul escuro em Vu-Defr correspondem à região do γ -core, conforme determinado por Yount e Yeaman (2004). Os resíduos de aminoácidos, marcados em uma caixa, correspondem à região de volta de Vu-Defr. **I** indica a percentagem de resíduos de aminoácidos idênticos entre os dois peptídeos. **(B)** Modelo estrutural de Vu-Defr, baseado na estrutura tridimensional de VrD₂. Cinza representa elementos não estruturais, vermelho representa a α -hélice, azul claro representa as folhas- β e azul escuro representa a região do γ -core. **(C)** Etapas do desenho do peptídeo sintético. **(D)** Propriedades químicas do peptídeo sintético A_{36,42,44}Y₃₂₋₄₆VuDef. **(E)** Crescimento de *L. amazonensis* na ausência (controle) e na presença de Vu-Defr e de A_{36,42,44}Y₃₂₋₄₆VuDef. A percentagem de inibição do protozoário é mostrada acima das barras. Este resultado indica que o peptídeo sintético A_{36,42,44}Y₃₂₋₄₆VuDef é biologicamente ativo. (*) Indica significância entre experimentos e controle e (**) indica nenhuma significância entre os Vu-Defr e A_{36,42,44}Y₃₂₋₄₆VuDef, pelo Teste de Tukey (P <0,05). O gráfico foi feito com a média e desvio padrão de um ensaio independente de três. Adaptado de Souza *et al.* (2019).

A boa atividade do peptídeo sintético DD sobre *L. amazonensis*, nos incentivou a testar, neste trabalho, a sua atividade inibitória sobre leveduras de interesse médico. No entanto, o peptídeo DD mostrou baixa atividade antifúngica, o que nos levou a melhorar sua atividade, alterando de modo direcional os resíduos de aminoácidos da sua estrutura primária. Este trabalho buscou, portanto, a análise da correlação entre a estrutura primária e a atividade biológica das defensinas de plantas para o desenho guiado de novos peptídeos, baseados no peptídeo DD. Além disso, foram investigados os possíveis mecanismos de ação que estão envolvidos na interação entre estes peptídeos e as leveduras.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Melhorar a atividade antifúngica do peptídeo DD explorando a correlação entre a estrutura primária e a atividade biológica das defensinas de plantas para alterar parâmetros físico-químicos, desenhar novos peptídeos com estes parâmetros alterados e avaliar os mecanismos que estão envolvidos na inibição de leveduras.

2.2 Objetivos Específicos

1) Analisar a correlação entre a estrutura e a atividade biológica das defensinas de plantas e escolher tanto as posições quanto os aminoácidos para serem trocados no peptídeo DD;

2) Desenhar peptídeos com alterações nas posições e nos aminoácidos escolhidos, visando a melhora da atividade antimicrobiana;

3) Avaliar a atividade antifúngica dos peptídeos desenhados sobre seis espécies de leveduras e escolher as leveduras mais sensíveis e de maior relevância médica para testes mais aprofundados;

4) Determinar a mínima concentração inibitória (MIC₁₀₀, do inglês *minimal inhibitory concentration*) dos peptídeos desenhados sobre as leveduras escolhidas;

5) Analisar a viabilidade celular das leveduras escolhidas, após a determinação da MIC;

6) Determinar a dose letal (DL₁₀₀) dos peptídeos desenhados sobre as leveduras escolhidas;

7) Confrontar as DL₁₀₀ determinadas para os peptídeos desenhados sobre as leveduras escolhidas com um fármaco de uso padrão, o fluconazol;

- 8) Analisar a citotoxicidade dos peptídeos desenhados, na concentração da DL₁₀₀, sobre células de mamíferos (macrófagos murinos e monócitos humanos);
- 9) Estudar a cinética de morte celular das leveduras escolhidas;
- 10) Avaliar a atividade dos peptídeos desenhados na presença de um agente antioxidante;
- 11) Analisar as alterações celulares, como: permeabilização de membrana plasmática, produção endógena de ROS, funcionalidade mitocondrial e necrose;
- 12) Avaliar a atividade dos peptídeos desenhados na presença de um inibidor de caspase.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Biológico

As leveduras *Candida albicans* (CE022), *Candida buinensis* (4674), *Candida parapsilosis* (CE002), *Candida pelliculosa* (3974), *Candida tropicalis* (CE017) e *Saccharomyces cerevisiae* (1038) foram cultivadas em ágar Sabouraud (10 g/L peptona, 20 g/L D(+)glicose, 17 g/L ágar, Merck Millipore) a 30 °C por 24 h e, em seguida, armazenadas a 4 °C. Este processo foi repetido a cada três meses.

O peptídeo A_{36,42,44}V₃₂₋₄₆VuDef (DD), derivado do γ -core da VuDef₁ e previamente descrito por Souza e colaboradores (2019), foi adquirido comercialmente da empresa AminoTech (São Paulo, Brasil). DD foi dissolvido em água ultrapura na concentração de 2 µg/µL (aproximadamente 1000 µM), a solução foi alíquotada em 50 µL e armazenada a - 70 °C. Este peptídeo passou por análise de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas e possui pureza igual ou maior que 95%, garantida pela empresa (**Anexo 1**).

3.2 Ensaio Antimicrobiano

As leveduras foram retiradas do estoque e repicadas em uma nova placa de Petri contendo ágar Sabouraud e levadas para a estufa a 30 °C por 24 h. Após o período de crescimento, uma colônia foi ressuspensa em meio líquido Sabouraud (5 g/L peptona de carne, 5 g/L peptona de caseína, 20 g/L D(+)glicose, Merck Millipore) e as células foram contadas em câmara de Neubauer (Laboroptik) em microscópio óptico (Axio Imager.A2, Zeiss). Em seguida, foi feita uma diluição para a obtenção do número de células requeridas para o ensaio, 2.000 células/mL. O ensaio foi feito em uma microplaca de poliestireno de fundo U (Nunc, Thermo Scientific) e em cada poço foi adicionado 2.000 células/mL das leveduras, 18,5 µM de DD (concentração descrita em Souza *et al.*, 2013) esterilizado por filtração (Millex-GV 0,22 µm, Merck Millipore) e 100 µL de meio líquido Sabouraud como volume final. Após 24 h, o fundo dos poços do ensaio foi fotografado (câmera principal com configuração em escala de cinza do Note 9, Samsung). O conteúdo dos poços foi ressuspensa e o crescimento fúngico foi determinado por análise da absorbância (ABS₆₂₀, EZ Read 400, Biochrom). O controle foi realizado como descrito, mas sem a adição de DD e foi considerado como 100% do crescimento fúngico. Gráficos de barras foram feitos usando as médias das

leituras de ABS₆₂₀ com o desvio padrão de um experimento independente em triplicata (representativo de três) e, embaixo de cada barra, a imagem do fundo do poço correspondente a cada barra foi mostrada. Este ensaio foi baseado em Broekaert *et al.* (1990).

3.3 Análise da Correlação entre a Estrutura Primária das Defensinas de Plantas e a Atividade Biológica

Inicialmente foi feita uma pesquisa e análise de artigos que correlacionavam a estrutura primária das defensinas de plantas com suas atividades biológicas. A pesquisa foi feita nos bancos de dados *National Center for Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), *Science Direct* (<https://www.sciencedirect.com/>) e *Google Scholar* (<https://scholar.google.com.br/>), usando a combinação de palavras-chave, tais como: “*plant defensins*”, “*γ-core*”, “*structure-activity*”, “*strutura*”, “*mode of action*”, e “*mechanism of action*”. Após a pesquisa, os artigos selecionados foram lidos, interpretados e as informações das estruturas primárias e das alterações de aminoácidos foram organizadas em uma tabela. Para a confecção da tabela, as estruturas primárias das defensinas foram inicialmente alinhadas com o auxílio do Clustal Omega, usando os ajustes padrão do programa (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; Sievers *et al.*, 2011), comparadas entre si e os aminoácidos que compõem o *γ-core* foram destacados de acordo com Yount e Yeaman (2004). Para análise da correlação entre a estrutura primária e a atividade biológica, as trocas de aminoácidos que aumentaram a atividade da defensina foram destacadas em verde, as trocas que diminuíram a atividade foram destacadas em vermelho e as trocas que foram neutras foram destacadas em azul. Além disso, foi feita uma análise de carga (<https://pepcalc.com/>) e hidrofobicidade (<http://pepdraw.com/>) das sequências de aminoácidos das defensinas e/ou dos peptídeos gerados a partir delas. A hidrofobicidade foi interpretada de acordo com a escala Wimley-White. Esta escala leva em consideração as ligações peptídicas e as cadeias laterais dos aminoácidos, fornecendo valores absolutos, que foram gerados com base na transferência de energia livre entre a água e um líquido hidrofóbico (octanol) ou entre a interface de água e fosfolipídios (Wimley e White, 1996).

A análise comparativa entre a estrutura primária de VuDef₁ e DD com as defensinas e os seus peptídeos derivados levou em consideração os resíduos de aminoácidos trocados e o efeito biológico da troca. Interpretamos estas informações de posição e também de qual aminoácido seria importante para a troca em DD para a melhora da sua atividade. Assim, três novos peptídeos foram desenhados, com alterações na carga líquida, hidrofobicidade e quiralidade. No entanto, este trabalho apresentará apenas dois deles, um com alteração na carga líquida e outro com alteração na carga e hidrofobicidade.

Os peptídeos desenhados foram adquiridos comercialmente pela empresa AminoTech, preparados e analisados como descrito no **item 3.1 (Anexo 2 e 3)**.

Os novos peptídeos foram testados em relação à atividade antimicrobiana como descrito no **item 3.2**. Em seguida, a levedura mais sensível para cada peptídeo foi escolhida para os testes descritos abaixo.

3.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória

Após a determinação da atividade biológica dos peptídeos, foi feita a determinação de sua MIC₁₀₀, como descrito no **item 3.2**, com algumas diferenças: o ensaio foi feito com a levedura de maior interesse médico e também mais sensível ao primeiro ensaio antimicrobiano e foram usadas diferentes concentrações dos peptídeos desenhados a partir da concentração de 18,5 µM com variação de 4,5 µM para mais ou para menos. Portanto, as concentrações utilizadas variaram de 14 a 36,5 µM, dependendo do peptídeo-levedura. A MIC₁₀₀ foi definida como a menor concentração dos peptídeos, em µM, capaz de inibir totalmente o crescimento fúngico, cuja interpretação foi feita visualmente. Este ensaio foi feito baseado em Broekaert *et al.* (1990) e Wiegand *et al.* (2008).

3.5 Análise da Viabilidade Celular

Após o ensaio de determinação da MIC₁₀₀, todo o conteúdo dos poços foi lavado em meio líquido Sabouraud e, com uma alça de Drigalski, foi uniformemente espalhado em placa de Petri contendo ágar Sabouraud. Em seguida, as placas foram incubadas a 30 °C por 24 h, para permitir que células viáveis se dividissem e formassem colônias. As células controles foram consideradas viáveis, ou seja, em meio apropriado se dividem e formam colônias. O desenvolvimento de colônias

indicaria a ação fungistática e o não desenvolvimento de colônias indicaria a ação fungicida dos peptídeos. A menor concentração dos peptídeos, em μM , com ação fungicida foi considerada como DL_{100} , cuja interpretação foi feita a partir do não crescimento de colônias após o plaqueamento. Este ensaio foi baseado em Soares *et al.* (2017). A DL_{100} de cada peptídeo foi utilizada como parâmetro para a realização dos demais ensaios.

Após a determinação da DL_{100} , um controle com fluconazol (Sigma-Aldrich), com a mesma concentração da DL_{100} determinada para os peptídeos, foi feito de acordo com o **item 3.4**. O fluconazol foi ressuspendido em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (estoque de $6.530,2 \mu\text{M}$). O controle, sem adição de fluconazol, foi feito com 0,4% DMSO, a mesma concentração final de DMSO do ensaio do tratamento com fluconazol. Ao final do tempo de incubação, as placas foram fotografadas como descrito no **item 3.2** e o crescimento fúngico foi analisado.

3.6 Ensaio de Citotoxicidade em Células de Mamíferos

Células de macrófagos murinos RAW 264.7 (American Type Culture Collection, ATCC TIB-71, Manassas, VA, USA) e monócitos humanos THP-1 (ATCC TIB-202, Manassas, VA, USA) foram cultivadas em meio DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*) suplementado com 10% de soro fetal bovino e gentamicina ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) em 5% CO_2 a 37°C . As células foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas com os peptídeos desenhados nas concentrações de 14, 18,5, 23, 27,5, 36,5 e $50 \mu\text{M}$ por 24 h nas mesmas condições. Após 24 h de incubação, $10 \mu\text{L}$ de reagente MTT (*brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio*, $5 \text{ mg}/\text{mL}$, Sigma-Aldrich) foi adicionado e incubado por mais 2 h a 37°C em 5% CO_2 . A solução de MTT foi removida e $100 \mu\text{L}$ de isopropanol acidificado foi adicionado para solubilizar o cristal de formazan formado. A ABS foi medida a 570 nm e a absorbância para a correção do fundo foi determinada a 620 nm . Células não tratadas foram usadas como controle positivo (Densidade óptica $1,94 \pm 0,05$, viabilidade celular – $98,8 \pm 2,1\%$) e células tratadas com 1% de detergente Triton X-100 foram usados como controle negativo (Densidade óptica $0,14 \pm 0,03$, viabilidade celular - 0%). A concentração citotóxica de 50% (CC_{50}) foi definida como a concentração (μM) requerida para reduzir a viabilidade celular em 50%, calculada por análise de regressão (Moodley *et al.*, 2014).

Este ensaio foi feito em colaboração com o grupo da professora Elena Lassounskaia, no Laboratório de Biologia do Reconhecer, Centro de Biociências e Biotecnologia, UENF.

3.7 Ensaio para Determinação dos Mecanismos de Ação dos Peptídeos sobre as Leveduras

3.7.1 Determinação do Tempo de Morte

Após a análise da viabilidade das leveduras tratadas com os peptídeos desenhados, foi feito um ensaio para determinar o período mínimo necessário para que os peptídeos, na concentração da DL₁₀₀, causem a perda da viabilidade celular. Este ensaio foi feito como descrito no **item 3.5**, com a diferença de que foi feito o plaqueamento de todo o conteúdo dos poços a cada 3 h, a partir de 0 h até 21 h (Soares *et al.*, 2017).

Todos os experimentos descritos abaixo foram feitos com parâmetros pré-determinados, de DL₁₀₀ e tempo de morte, para os dois peptídeos desenhados.

3.7.2 Análise da Atividade Antifúngica dos Peptídeos Desenhados na Presença de Agentes Antioxidantes

Para analisar a produção de ROS pelas leveduras após tratamento com os peptídeos desenhados, foram feitos dois ensaios antimicrobianos com a adição dos agentes antioxidantes ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) e N-acetil-L-cisteína (NAC) (Sigma-Aldrich). Estas substâncias são antioxidantes não-enzimáticos capazes de proteger as células contra a ação oxidante dos radicais livres. Dessa forma, pode-se identificar, indiretamente, se há a produção de ROS pelas leveduras após tratamento com os peptídeos e se este é um dos fatores que levam a morte das mesmas.

O ensaio antimicrobiano foi feito como descrito no **item 3.2**, com modificações: foi utilizada a DL₁₀₀ dos peptídeos, 70 mM do agente antioxidante ácido ascórbico (solução estoque de 1 M) ou 5 mM de NAC (solução estoque de 0,6 M), dissolvidos em água ultrapura e esterilizados por filtração (Millex-GV 0,22 µm, Merck Millipore) e incubados nos tempos de morte, previamente determinados. Os controles também foram feitos com a adição do agente antioxidante. Após este período foi feito o ensaio de viabilidade celular como descrito no **item 3.5**.

3.7.3 Padronização do Número de Células para os Ensaios de Microscopia Óptica

Os ensaios realizados até o momento, utilizaram um total de 2.000 células/mL. No entanto, para os ensaios de microscopia óptica, esta quantidade de células é inviável porque ficaria abaixo do limite de detecção da técnica. Sendo assim, uma concentração maior de células foi utilizada para permitir a visualização das mesmas no microscópio óptico. Foram utilizadas, portanto, 40.000 células/mL, baseado em Soares *et al.* (2017).

Para testar o efeito tóxico dos peptídeos nesta quantidade maior de células, foi feito um ensaio de viabilidade celular com os parâmetros determinados, como descritos nos itens 3.5 e 3.7.1, mas com as 40.000 células/mL.

3.7.4 Análise das Células de Leveduras Incubadas com os Peptídeos por Microscopia Óptica

Neste ensaio, as leveduras (40.000 células/mL) foram incubadas com os peptídeos desenhados na concentração da DL₁₀₀ por 1 e 6 h e os controles foram feitos sem a adição dos peptídeos. Além disso, foram feitos três controles negativos: as células foram aquecidas a 100 °C por 2 min; as células foram incubadas com Triton X-100 (2%) por 17 min; as células foram incubadas com 1.750 mM de ácido acético por 30 min. Dependendo do peptídeo-levedura, foi utilizada a combinação do peptídeo desenhado com 70 mM do agente antioxidante ácido ascórbico.

Após o período de incubação, as células foram transferidas para lâminas e, após 5 min, cobertas por lamínulas e analisadas em microscópio óptico. A visualização foi feita por contraste interferencial diferencial (DIC, do inglês *differential interference contrast*) (Axio Imager.A2, Zeiss) e as imagens das células foram adquiridas através do software AxionVision LE (versão 4.8.2, Zeiss) e da câmera Axio Can MR5 (Zeiss).

3.7.5 Análise da Produção Endógena de ROS

A produção de ROS foi avaliada através de microscopia óptica de fluorescência, com o auxílio da sonda não fluorescente 2',7'- Diacetato de Diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA, do inglês *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*, Calbiochem, EMD). Esta sonda é permeável à membrana celular, uma vez

dentro da célula é desacetilada por esterases intracelulares e, quando oxidada por ROS, gera um composto fluorescente, a diclorofluoresceína, permitindo a detecção de ROS dentro da célula.

Neste ensaio, baseado em Mello *et al.* (2019), as leveduras (40.000 células/mL) foram incubadas com os peptídeos desenhados na concentração da DL₁₀₀ por 20 min ou 1 h e o controle foi feito sem a adição de peptídeo. Um controle positivo também foi feito, neste as células foram incubadas com 1.750 mM de ácido acético por 30 min. As células do controle positivo foram usadas para o ajuste destes parâmetros de intensidade da fluorescência e do tempo de exposição para a aquisição das imagens fluorescentes, e estes parâmetros foram usados para todos os demais tratamentos. As células controles e tratadas foram incubadas com 20 µM da sonda H₂DCFDA por 15 min e, após o período de incubação, as células foram transferidas para lâminas, cobertas por lamínulas e analisadas em microscópio óptico (**item 3.7.4**), equipado com filtros de fluorescência (excitação com comprimento de onda entre 450 – 490 nm e emissão de 500 nm). As imagens foram feitas em DIC e em fluorescência, obtidas pelo software AxionVision LE e pela câmera Axio Can MR5.

A análise dos resultados foi feita por contagem de células, usando os seguintes critérios: 1º - Contagem de aproximadamente 200 células em campos aleatórios que variaram de acordo com os tempos de incubação dos ensaios; 2º - caso o número de células fosse muito baixo (consequência do tratamento com os peptídeos ou com o controle positivo que mata as células), aproximadamente 10 campos aleatórios foram contados. A análise estatística foi feita sobre a média do número de células fluorescentes. A percentagem de células fluorescentes, usada como indicação do estresse oxidativo, foi calculada sobre a média do número de células presentes em DIC dos ensaios do controle e testes, em que foram assumidos como 100%. Para o cálculo da percentagem de células fluorescentes, foi usada a seguinte fórmula: [(número de células fluorescentes x 100)/número de células observadas em DIC].

3.7.6 Análise da Funcionalidade Mitocondrial

A funcionalidade mitocondrial foi avaliada através de microscopia óptica de fluorescência com o auxílio da sonda fluorescente Rodamina 123 (Sigma-Aldrich). Esta sonda é permeável a membrana plasmática e, por ser catiônica, é atraída eletroforicamente pelo potencial elétrico negativo presente na membrana

mitocondrial, sendo internalizado por essas organelas quando funcionais, ou seja, quando o gradiente eletroquímico da matriz mitocondrial está ativo.

O ensaio e a análise dos resultados foram feitos como descrito no **item 3.7.5**, com modificações. As leveduras foram incubadas com os peptídeos por 20 min, 1 e 5 h (dependendo da levedura testada) e, no controle positivo, as células foram incubadas com 2% Triton X-100 por 17 min. As células controles e tratadas foram incubadas com 0,1 µg/mL da sonda fluorescente Rodamina 123 por 15 min e observadas no microscópio óptico (**item 3.7.4**) equipado com um filtro de fluorescência (comprimento de onda de excitação de 506 nm, comprimento de onda de emissão de 530 nm).

3.7.7 Análise da Permeabilização de Membrana Plasmática

A permeabilização celular foi avaliada através de microscopia óptica de fluorescência com o auxílio da sonda fluorescente Sytox Green (Molecular Probes). Esta sonda se liga ao material genético de células ao passar pela membrana plasmática comprometida, já que é impermeável a células com membranas plasmáticas intactas. Uma vez ligada a ácidos nucleicos sua fluorescência aumenta mais de quinhentas vezes, sendo facilmente detectada.

O ensaio e a análise dos resultados foram feitos como descrito no **item 3.7.5** e baseado em Soares *et al.* (2017). Para o controle positivo, as leveduras foram aquecidas por 2 min a 100 °C. As células controles e tratadas foram incubadas com 0,5 µM da sonda fluorescente Sytox Green por 15 min e observadas no microscópio óptico.

3.7.8 Análise da Atividade Antifúngica dos Peptídeos Sintéticos na Presença de um Inibidor de Caspase

Para identificar se a via de morte ativada pelos peptídeos nas leveduras é a apoptose, foi feito um ensaio antimicrobiano na presença de um inibidor de caspase, o Z-VAD-FMK (*carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone*) (Promega). Este inibidor entra na célula e se liga irreversivelmente ao sítio catalítico de caspases ativas, inibindo a indução de apoptose. Portanto, se esta for a via de morte, o tratamento com o Z-VAD-FMK protegerá as leveduras da ação dos peptídeos.

O ensaio antimicrobiano foi feito como descrito no **item 3.2**, com modificações: foi utilizada a DL_{100} dos peptídeos, 50 μ M de Z-VAD-FMK (solução estoque de 2 mM em DMSO) e incubados nos tempos de morte, previamente determinados. Os controles também foram feitos com a adição de 50 μ M de Z-VAD-FMK. Após este período foi feito o ensaio de viabilidade celular como descrito no **item 3.5**.

3.7.9 Análise da Via de Necrose

A via de necrose foi analisada através de microscopia óptica de fluorescência com o auxílio da sonda fluorescente iodeto de propídio (IP) (Sigma Aldrich). Esta sonda não é permeável à membrana plasmática íntegra ou de células em apoptose precoce, mas liga-se ao ácido nucleico de células em apoptose tardia e células necróticas.

O ensaio e a análise dos resultados foram feitos como descrito no **item 3.7.5**, com modificações: as leveduras foram incubadas com os peptídeos por 20 min e 1 h ou 1 h e 6 h e, no controle positivo, as células foram aquecidas por 2 min a 100 °C. As células controles e tratadas foram incubadas com 0,25 μ g/mL da sonda fluorescente IP por 15 min e observadas 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).

3.8 Análise Estatística

Todos os ensaios foram feitos em triplicata, com exceção dos ensaios de microscopia óptica, realizados em monocata, e repetidos três vezes. Os dados obtidos foram testados estatisticamente com o uso do programa GraphPad Prism 8 pelo teste one-way ANOVA, onde $P < 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Atividade Antifúngica do Peptídeo DD

Em um trabalho realizado anteriormente por Souza e Colaboradores (2019), foi visto que o peptídeo sintético DD possui atividade inibitória sobre *L. amazonensis* na concentração de 18,5 μ M com 24 h de incubação. Dessa forma, decidimos testar, nestes mesmos parâmetros, a atividade antifúngica de DD sobre leveduras. Como resultado é possível observar que o peptídeo DD não possui atividade antifúngica significativa nas condições testadas (**Figura 10**).

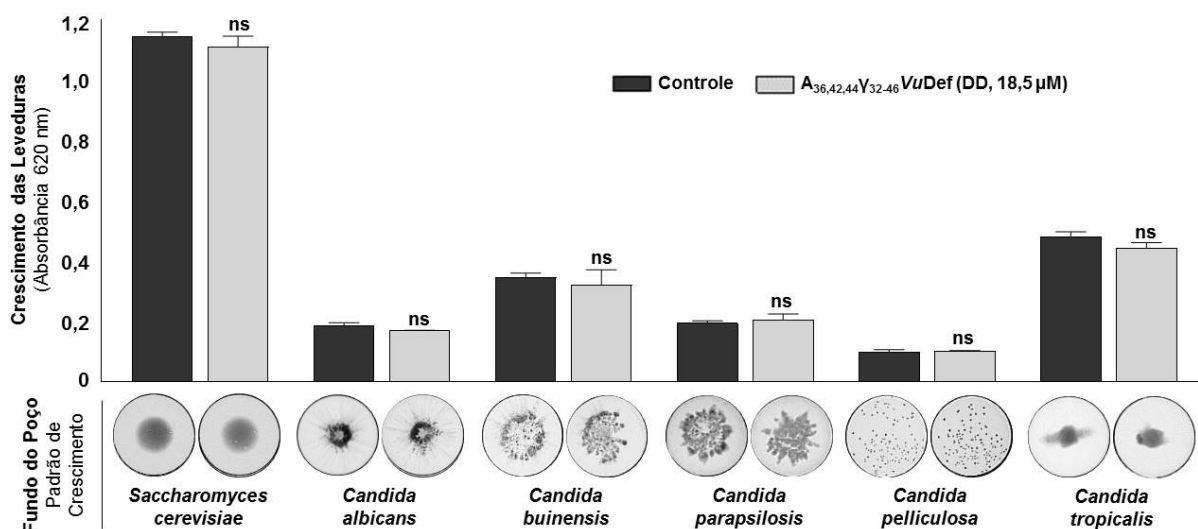


Figura 10: Crescimento das seis leveduras na ausência (controle) e presença de DD. A imagem é representativa de um ensaio de três, (ns) não significativo em relação ao controle.

4.2 Desenho dos Peptídeos

A baixa atividade antifúngica do peptídeo DD e sua forte atividade inibitória sobre *L. amazonensis*, nos incentivou a melhorar a atividade deste através da troca de aminoácidos. Para que estas trocas fossem direcionadas e racionais, foi feito um levantamento bibliográfico de vários artigos que correlacionaram a estrutura primária e a atividade biológica das defensinas e/ou peptídeos derivados e estes foram organizados em uma tabela (**Tabela 1**). Esta tabela reuniu dados de 29 artigos e foram analisadas as estruturas primárias de 21 defensinas diferentes, bem como os peptídeos sintéticos derivados destas defensinas e as substituições de aminoácidos

realizadas. Os aminoácidos alterados foram indicados na estrutura primária e também as consequências destas mudanças na atividade biológica. Além disso, todas as sequências foram alinhadas com o auxílio do CLUSTAL e a carga e a hidrofobicidade das defensinas e de suas variantes foram analisadas, o que nos deu um padrão das principais modificações realizadas.

Tabela 1. Estruturas primárias das defensas de plantas e peptídeos derivados com a correlação entre suas estruturas primárias e atividades biológicas analisadas por substituições de aminoácidos. A sequência original está em cinza claro, os aminoácidos substituídos na sequência original estão indicados abaixo dela e as cores indicam o efeito da substituição sobre a atividade biológica. O número de aminoácidos foi mantido como no artigo original e os números acima da sequência são apenas para orientação da posição do aminoácido. O γ -core está destacado em uma caixa vermelha e, quando necessário, espaços (-) foram introduzidos para melhorar o alinhamento. Os números em parêntesis indicam a carga líquida ou a hidrofobicidade da sequência do peptídeo correspondente na defesa ou no peptídeo de onde foi derivado. Os peptídeos foram listados primeiro em ordem cronológica e, em seguida, em ordem de defesa. VuDef; e seus peptídeos derivados foram incluídos no final desta tabela para facilitar a comparação.

Defensa/nome do peptídeo	Estrutura Primária (Código de uma letra)						Carga Líquida (pH 7,0)	Hidrofobicidade (Kcal/mol)	Aminoácidos trocados e seus efeitos na atividade biológica - verde = melhora a atividade; vermelho = reduz a atividade; azul = sem efeito	Referências
	1	11	21	31	41	51				
VuDef1 A36, 42, 44Y32-46VuDef (DD)	--MK ¹ CENL	ADTYRGICFT	TGSCDHCNK	KEHL-SGR	R-----DDVR	A	+2	+55,40	Obs: inibe <i>Leishmania amazonensis</i> ; Obs: C36A, C42A, C44A; inibe <i>L. amazonensis</i> como VuDef1, mas não possui atividade significativa sobre leveduras.	Souza et al., 2013; 2019
Rs-AFP1	--KQICERP	SGTWSGVCN	NNACNQCIR	LEK-ARHGS	NYVFP--AHK	C	+3,6	+36,68	Obs: A sequência de Rs-AFP1 foi incluída para comparação com Rs-AFP2;	De Samblanx et al., 1996
Rs-AFP2	--KQICQRP	SGTWSGVCN	NNACNQCIR	LEK-ARHGS	NYVFP--AHK	C	+5,6	+34,78	Obs: Os autores sintetizaram dez peptídeos e os testaram sobre cinco espécies de fungos e os compararam com a atividade de Rs-AFP2. Por razões de clareza, apenas o peptídeo ativo é mostrado. Nenhum deles foi tão potente quanto Rs-AFP2;	
Peptídeo 7							+2 (+2)	+20,12 (+20,12)		
Peptídeo 8							+1,1 (+1,1)	+20,12 (+20,12)		
Peptídeo 9							+1 (+1)	+14,40 (+24,40)		
C36-C45							+1 (+1)	+11,60 (+11,60)	Obs: Dois variantes foram produzidos, um cíclico (C36-C45) e outro também cíclico, mas com uma substituição Y38A (C36-C45 (Y38A)). Suas atividades antifúngicas foram testadas sobre <i>Fusarium culmorum</i> e a variante C36-C45 (Y38A) perdeu a atividade antifúngica.	
C36-C45 (Y38A)							+1 (+1)	+12,81 (+12,81)		
Rs-AFP2	--KQICQRP	SGTWSGVCN	NNACNQCIR	LEK-ARHGS	NYVFP--AHK	C	+5,6	+34,78	Meio com baixa concentração de sal - atividade antifúngica testada sobre <i>F. culmorum</i> (Y38A, T10A, F40A - não foram analisados); Q2M, P7R, G9R, T10G, S12R, G16M, I26R, L28R, A31W, N37R, Y38G, V39R, F40M, P41Δ, A42R, K44Q, I46R, Y48I, F49R; Obs: Por razões de clareza, apenas as mudanças na região do γ -core de Rs-AFP2 estão sendo mostradas. Nenhum deles foi tão potente quanto Rs-AFP2; (Δ) - indica a deleção de um aminoácido;	De Samblanx et al., 1997
Rs-AFP2	--KQICQRP	SGTWSGVCN	NNACNQCIR	LEK-ARHGS	NYVFP--AHK	C	+6,6	+35,74		
Rs-AFP2	--KQICQRP	SGTWSGVCN	NNACNQCIR	LEK-ARHGS	NYVFP--AHK	C	+5,6	+36,64		
Rs-AFP2	--KQICQRP	SGTWSGVCN	NNACNQCIR	LEK-ARHGS	NYVFP--AHK	C	+6,6	+37,05		
Rs-AFP2	--KQICQRP	SGTWSGVCN	NNACNQCIR	LEK-ARHGS	NYVFP--AHK	C	+5,6	+35,82		
Rs-AFP2	--KQICQRP	SGTWSGVCN	NNACNQCIR	LEK-ARHGS	NYVFP--AHK	C	+5,6	+34,64		
Rs-AFP2	--KQICQRP	SGTWSGVCN	NNACNQCIR	LEK-ARHGS	NYVFP--RHK	C	+6,6	+36,09		
Rs-AFP2	--KQICQRP	SGTWSGVCN	NNACNQCIR	LEK-ARHGS	NYVFP--AHQ	C	+4,6	+32,75		
Rs-AFP2	--KQICQRP	SGTWSGVCN	NNACNQCIR	LEK-ARHGS	NYVFP--AHK	C	+5,6	+34,78	Meio com alta concentração de sal - atividade antifúngica testada sobre <i>F. culmorum</i> ; Q2M, P7R, G9R, T10G, S12R, G16M, I26R, L28R, A31W, N37R, Y38G, V39R, F40M, P41Δ, A42R, K44Q, I46R, Y48I, F49R.	
Rs-AFP2	--KQICQRP	SGTWSGVCN	NNACNQCIR	LEK-ARHGS	NYVFP--AHK	C	Não calculado**	Não calculado**	Os autores testaram 79 peptídeos cobrindo todas as possíveis combinações que se sobrepunham da estrutura da volta β_2 - β_3 de Rs-AFP2. A maior atividade inibitória foi encontrada nos peptídeos que abrangem toda a alça β_2 - β_3 e estes são mostrados aqui. (B = β -ácido α -aminobutírico, * = acetil, # = amida). A atividade antifúngica foi determinada sobre <i>F. culmorum</i> (Rs-AFP2 IC50 = 3 μ g/mL, 30-49 IC50 = 5 μ g/mL, 31-49 IC50 = 6 μ g/mL).	Schaaper et al., 2001
MsDef1	---R ¹ CENL	ADRYRGICFS	-G-C ¹ THC ¹ IT	KENAV-SGR	R-----DDFR	C	+2,6	+51,68	Os autores usaram peptídeos quimeras contendo seis combinações de partes de MsDef1 e MtDef2 e testaram suas atividades antifúngicas. Os resultados mostraram que os aminoácidos determinantes para a atividade antifúngica residem na região carboxi-terminal (aminoácidos 31-45) de MsDef1;	Spelbrink et al., 2004
MtDef2	---K ¹ CEHL	ADTYRGICFT	EGSCDHCNK	KAHLI-SGT	H-----NFR	C	+1,6	+50,64	R36Q, reduziu a atividade sobre <i>Fusarium graminearum</i> e <i>Neurospora crassa</i> ;	
	---K ¹ CEHL	ADTYRGICFT	EGSCDHCNK	KAHLI-SGT	H-----NFR	C	-1,1	+46,84		
	---K ¹ CEHL	ADTYRGICFT	EGSCDHCNK	KAHLI-SGT	H-----NFR	C	-0,1	+47,88	Q46R, aumentou a atividade sobre <i>N. crassa</i> e não apresentou efeito sobre <i>F. graminearum</i> (MtDef2 não é ativo sobre estes fungos).	
VrD1	---R ¹ CMIK	-KEGWGHC ¹ LI	DTTCAHSCNK	-RGYI-GGN	K--G--MTRT	C	+5,5	+37,26	Obs: VrD1 inibiu 87% da atividade de α -amilase de <i>Tenebrio molitor</i> a 20 μ M;	Lin et al., 2007
VrD2	---R ¹ CENL	ADTYRGICFT	TGSCDHCNK	KEHL-SGR	R-----DDFR	C	+2,7	+54,42		
VrD2 41A	---R ¹ CENL	ADTYRGICFT	TGSCDHCNK	KEHL-SGR	R-----DDFR	C	+2,7	+54,92	Inserção da alanina na posição 41;	
VrD2c	---R ¹ CENL	ADTYRGICFT	TGSCDHCNK	KEHL-SGR	R--G--MTRT	C	+3,7	+48,02	GMTRT de VrD1 conferiu atividade inibitória sobre α -amilase e vale a pena notar que VrD2c exibiu atividade inibitória maior que VrD1.	
VrD1	---R ¹ CMIK	-KEGWGHC ¹ LI	DTTCAHSCNK	-RGYI-GGN	K--G--MTRT	C	+5,5	+37,26	Obs: VrD1 inibiu 87% da atividade de α -amilase de <i>Tenebrio molitor</i> a 20 μ M;	Yang et al., 2009
VrD1	---R ¹ CMIK	-KEGWGHC ¹ LI	DTTCAHSCNK	-RGYI-GGN	A--G--MTRT	C	+4,5	+34,96		
VrD1	---R ¹ CMIK	-KEGWGHC ¹ LI	DTTCAHSCNK	-RGYI-GGN	K--G--MTRT	C	+5,5	+38,43	MA, KA, GA, GA, W1A, L14A, M3A, R3A, V4A, R1A, T17A, T18A, H21A, S22A, K24A, N25A, R26A, I28A, T37A, T39A, L43A, G10A, N32A, K37A, G38A apresentam atividade inibitória abaixo de 87%; KA K2A D16A apresentaram atividade inibitória similar a 87%; I2A, G11A, I15A, Y28A, Y41A, C2A, C4A apresentaram atividade inibitória maior que 87%.	
VrD1	---R ¹ CMIK	-KEGWGHC ¹ LI	DTTCAHSCNK	-RGYI-GGN	K--G--MTRT	C	+5,5	+37,51		
VrD1	---R ¹ CMIK	-KEGWGHC ¹ LI	DTTCAHSCNK	-RGYI-GGN	K--G--MTRT	C	+4,5	+35,95		
VrD1	---R ¹ CMIK	-KEGWGHC ¹ LI	DTTCAHSCNK	-RGYI-GGN	K--G--MTRT	C	+5,5	+37,51		
VrD1	---R ¹ AMIK	-KEGWGHC ¹ LI	DTTCAHSCNK	-RGYI-GGN	K--G--MTRT	C	+5,7	+38,30		
MsDef1	---R ¹ CENL	ADRYRGICFS	-G-C ¹ THC ¹ IT	KENAV-SGR	R-----DDFR	C	+2,6	+51,68	Obs: MsDef1 causou inibição de <i>F. graminearum</i> com hiperbranqueamento. MtDef2 causou inibição de <i>F. graminearum</i> sem hiperbranqueamento;	Ramamoorthy et al., 2007;
MtDef2	---K ¹ CEHL	ADTYRGICFT	EGSCDHCNK	KAHLI-SGT	H-----NFR	C	+5,8	+49,16	Atividade reduzida sobre <i>F. graminearum</i> ;	Sagaram et al., 2011
MsDef1-R36Q	---R ¹ CENL	ADRYRGICFS	-G-C ¹ THC ¹ IT	KENAV-SGR	R-----DDFR	C	+1,6	+50,64	R36DFR36 de MsDef1 foi substituído por R36GFRRR40 de MtDef2, aumentando a atividade sobre <i>F. graminearum</i> sem hiperbranqueamento;	
MsDef1-Y4	---R ¹ CENL	ADRYRGICFS	-G-C ¹ THC ¹ IT	KENAV-SGR	R--G--FRRR	C	+6,6	+49,17	GMA1 (y-core de MsDef1) não inibe <i>F. graminearum</i> ;	
GMA1							+0,9 (+0,9)	+20,01 (+20,01)	GMA4 (y-core de MtDef2) inibe <i>F. graminearum</i> ;	
GMA1-L							+4,9 (+4,9)	+17,50 (+17,01)	GMA1-L não inibe <i>F. graminearum</i> ;	
GMA1-L							0 (0)	+17,09 (+17,09)	GMA4-L inibe <i>F. graminearum</i> ;	
GMA1-L							R--G--FRRR	+14,58 (+14,58)	GMA4-L inibe <i>F. graminearum</i> ;	
GMA1-L							R--G--ARRR	+16,79 (+14,58)	F3A é menos hidrofóbico que o peptídeo original GMA4-L com atividade reduzida sobre <i>F. graminearum</i> ;	
GMA1-L							R--G--FARR	+13,27 (+14,58)	R3A é menos catiônico que o peptídeo original GMA4-L com atividade reduzida sobre <i>F. graminearum</i> ;	
GMA1-C							+3,0 (+4,0)	+22,74 (+22,74)	GMA1-C inibe <i>Fusarium verticillioides</i> (mais potente que MsDef1) e <i>Aspergillus flavus</i> (menos potente que MsDef1) sem hiperbranqueamento;	
GMA1-C							+2,7 (+2,7)	+19,73 (+19,73)	GMA4-C inibe <i>F. verticillioides</i> (mais potente que MtDef2) e <i>A. flavus</i> (mais potente que MsDef1) sem hiperbranqueamento.	
GMA1-C							+4,8 (+4,8)	+59,01		
SPE10	---R ¹ CENL	ADTYRGICFT	TGSCDHCNK	KEHL-SGR	R-----DDFR	C	+0,7	+56,22	D3N perdeu a capacidade de dimerização; manteve a atividade inibitória sobre <i>Bipolaris maydis</i> como SPE10. No entanto, houve um grande aumento da ramificação das hifas, que não foi observado na inibição causada por SPE10;	Song et al., 2011
SPE10	---R ¹ CENL	ADTYRGICFT	TGSCDHCNK	KEHL-SGR	R-----DDFR	C	+1,7	+56,22		
SPE10	---R ¹ CENL	ADTYRGICFT	TGSCDHCNK	KEHL-SGR	R-----DDFR	C	+0,7	+61,57	D3N, F3D foi inativo sobre <i>B. maydis</i> .	
07g007760	---R ¹ CENL	ADTYRGICFT	TGSCDHCNK	KEHL-SGR	R-----DDFR	C	+5,7	+48,87	Os autores testaram o peptídeo SolyC sobre diferentes espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e o peptídeo foi ativo com MIC variando de 10 a 40 μ g/mL.	Rigano et al., 2012
SolyC	---R ¹ CENL	ADTYRGICFT	TGSCDHCNK	KEHL-SGR	R-----DDFR	C	+4,8 (+4,8)	+17,88 (+17,88)		
MtDef4	---R ¹ CENL	ADRYRGICFS	-G-C ¹ THC ¹ IT	KENAV-SGR	R-----DDFR	C	+5,8	+49,16	R36DFR36 foi substituído por A36AAA36 e teve atividade reduzida sobre <i>F. graminearum</i> , entrada reduzida no citoplasma celular e reduzida interação com ácido fosfatídico;	Sagaram et al., 2013
MtDef4	---R ¹ CENL	ADRYRGICFS	-G-C ¹ THC ¹ IT	KENAV-SGR	R--G--FRRR	C	+3,8	+48,10	F3R36 foi substituído por A36A36 e teve atividade reduzida sobre <i>F. graminearum</i> , entrada reduzida no citoplasma celular;	
MtDef4	---R ¹ CENL	ADRYRGICFS	-G-C ¹ THC ¹ IT	KENAV-SGR	R--G--FRRR	C	+4,8	+50,06	R36R40 foi substituído por A36A40 e teve atividade ligeiramente reduzida sobre <i>F. graminearum</i> , entrada reduzida no citoplasma celular e reduzida interação com ácido fosfatídico.	
MtDef4	---R ¹ CENL	ADRYRGICFS	-G-C ¹ THC ¹ IT	KENAV-SGR	R--G--FRRA	C	+3,8	+46,54		
MsDef1	---R ¹ CENL	ADRYRGICFS	-G-C ¹ THC ¹ IT	KENAV-SGR	R-----DDFR	C	+2,6	+51,68	Inibe a germinação de conídios de <i>N. crassa</i> (50%, >24,50 μ M), inibe anastomose do tubo conidial (CAT, do inglês <i>conidial anastomose tube</i>) (50%, 7,62 μ M) e causa morte celular (50%, 1,62 μ M); Germinação de conídios e fusão de CAT com maior atividade que MsDef1 e a morte celular foi diminuída;	Muñoz et al., 2014
GMA1-C							+2,7 (+2,7)	+22,74 (+22,74)	Não foi ativo;	
GMA1-L							+0,9 (+0,9)	+20,01 (+20,01)	Não foi ativo;	
GMA1-L							0 (0)	+17,09 (+17,09)	Inibe a germinação de conídios de <i>N. crassa</i> (50%, 0,65 μ M), inibe fusão de CAT (50%, 0,52 μ M) e causa morte celular (50%, 0,83 μ M); Germinação de conídios, fusão de CAT e morte celular tiveram atividade diminuída comparada a MtDef1;	
MtDef4	---R ¹ CENL	ADRYRGICFS	-G-C ¹ THC ¹ IT	KENAV-SGR	R-----DDFR	C	+5,8	+49,16	Germinação de conídios, fusão de CAT e morte celular tiveram atividade diminuída comparada a MtDef1;	
GMA1-C							+4,8 (+4,8)	+18,58 (+18,58)	Germinação de conídios, fusão de CAT e morte celular tiveram atividade diminuída comparada a MtDef1;	
GMA1-L							+4,9 (+4,9)	+17,50 (+17,50)	Germinação de conídios, fusão de CAT e morte celular tiveram atividade diminuída comparada a MtDef1;	
GMA1-L							+4,0 (+4,0)	+14,58 (+14,58)	Germinação de conídios, fusão de CAT e morte celular tiveram atividade diminuída comparada a MtDef1; * não calculado porque não tem correlação com o peptídeo não modificado.	
BW0							+4,0 *	+7,54 *		
NaD1	---R ¹ CKTE	SNTFFPGICIT	KPFCRKA ¹ CS	-EKFT-DGHC	S--K--ILRR	C	+5,6	+45,08	E3A, KA reduziu a capacidade de dimerização e reduziu a atividade sobre <i>Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum</i> ;	Lay et al., 2012
NaD1	---R ¹ CKTE	SNTFFPGICIT	KPFCRKA ¹ CS	-EKFT-DGHC	S--K--ILRR	C	+6,6	+41,95		
NaD1	---R ¹ CKTE	SNTFFPGICIT	KPFCRKA ¹ CS	-EKFT-DGHC	S--K--ILRR	C	+4,6	+42,78		
NaD1	---R ¹ CKTE	SNTFFPGICIT	KPFCRKA ¹ CS	-EKFT-DGHC	S--K--ILRR	C	+5,6	+45,08	R40E, reduziu a ligação ao fosfatidilinositol 4-fosfato (PI(4)P), oligomerização, atividade sobre <i>F. oxysporum f. sp. vasinfectum</i> , e reduziu a permeabilização de células tumorais U937; I3F efeito neutro na ligação a PI(4)P, oligomerização e reduziu a atividade sobre <i>F. oxysporum f. sp. vasinfectum</i> .	Poon et al., 2014
NaD1	---R ¹ CKTE	SNTFFPGICIT	KPFCRKA ¹ CS	-EKFT-DGHC	S--K--ILRR	C	+5,6	+44,49		
NaD1	---R ¹ CKTE	SNTFFPGICIT	KPFCRKA ¹ CS	-EKFT-DGHC	S--K--ILRR	C	+3,6	+46,90		
NaD1	---R ¹ CKTE	SNTFFPGICIT	KPFCRKA ¹ CS	-EKFT-DGHC	S--K--ILRR	C	+5,6	+45,08	NaD1 foi mais ativo que NaD2 sobre <i>F. oxysporum</i> e mais eficiente na permeabilização e morte de células tumorais U937. Variantes foram produzidas com a sequência de NaD1 enxertadas em NaD2 (indicado em cores na sequência de NaD1) para identificar os determinantes da atividade biológica de NaD1. NaD1 se liga ao fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PI(4,5)P2) e NaD2 se liga ao ácido fosfatídico (PA); Diminuiu a atividade sobre <i>F. oxysporum</i> comparado a NaD1. A permeabilização não foi determinada. Liga-se a vários lipídeos;	Bleackley et al., 2016
L1A	---R ¹ CKTE	SNTFFPGICIT	KPFCRKA ¹ CS	-EKFT-DGHC	S--K--ILRR	C	+5,6	+39,88	Aumentou a atividade sobre <i>F. oxysporum</i> comparado a NaD1, outras atividades foram insignificantes, liga-se a PA. A variante mais ativa. Atividade sobre <i>F. graminearum</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>A. flavus</i> comparado a NaD1;	
L1B	---R ¹ CKTE	SNTFFPGICIT	KPFCRKA ¹ CS	-EKFT-DGHC	S--K--ILRR	C	+7,7	+52,04	A atividade foi insignificante, liga-se a vários lipídeos;	
L4A	---R ¹ CKTE	SNTFFPGICIT	KPFCRKA ¹ CS	-EKFT-DGHC	S--K--ILRR	C	+4,6	+43,09	A atividade foi insignificante, liga-se a vários lipídeos;	
L4B	---R ¹ CKTE	SNTFFPGICIT	KPFCRKA ¹ CS	-EKFT-DGHC	S--K--ILRR	C	+5,5	+44,11	A atividade foi insignificante, liga-se a vários lipídeos;	
L5	---R ¹ CKTE	SNTFFPGICIT	KPFCRKA ¹ CS	-EKFT-DGHC	R--G--FRRR	C	+6,6	+47,25	As atividades foram insignificantes, liga-se ao PA;	
L6&7	---R ¹ CKTE	SNTFFPGICIT	KPFCRKA ¹ CS	-EKFT-DGHC	S--K--ILRR	C	+5,6	+43,63	Aumentou a atividade sobre <i>F. oxysporum</i> comparado a NaD1, outras atividades foram insignificantes, liga-se a PA; Nenhuma das variantes tiveram atividade aumentada sobre células tumorais U937 comparado a NaD1.	
TPP3	---AQQCKAP	SQTFPGICIT	DSKCRK ¹ CS	-EKFT-DGHC	S--K--LQRR	C	+6,6	+38,60	R6A e R6E perdeu a oligomerização mediada por lipídeo, ligação a PI2, permeabilização da membrana de células tumorais de mamíferos, e redução da atividade antifúngica (<i>Fusarium graminearum</i>); R28A mantém a oligomerização mediada por lipídeo, ligação a PI2, ou a morte da célula de mamífero ou do fungo; Q46L aumentou a extensão de ligação a lipídeos.	Baxter et al., 2015
TPP3	---AQQCKAP	SQTFPGICIT	DSKCRK ¹ CS	-EKFT-DGHC	S--K--LQRR	C	+5,6	+36,30		
TPP3	---AQQCKAP	SQTFPGICIT	DSKCRK ¹ CS	-EKFT-DGHC	S--K--LQRR	C	+5,6	+36,30		
TPP3	---AQQCKAP	SQTFPG								

Tabela 1: Continuação.									
MtDef ₅ _V1	---KICQRR- SITWSGFC LN TGNCRQCIN VEHATF-GAC AAQG--FGFA C CYNCA PKKVEP	+13,1	+43,85	Apresentou atividade inibitória sobre <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> com MIC = 12 µM e não inibiu <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> ; Apresentou atividade inibitória sobre <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> com MIC = 6 µM e não inibiu <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> ; Não inibiu as bactérias testadas.					
OsAFP ₁	---RHCLSQ- SHRFKGNVVS SNNCANVCRT -ESFP-DGEC KSHG--LERR CFCCKVC ---RHCLSQ- SHRFKGNVVS SNNCANVCRT -ESFP-DGEC ASHG--LERR CFCCKVC ---RHCLSQ- SHRFKGNVVS SNNCANVCRT -ESFP-DGEC KSAAG--LERR CFCCKVC ---RHCLSQ- SHRFKGNVVS SNNCANVCRT -ESFP-DGEC KSHG--AERK CFCCKVC ---RHCLSQ- SHRFKGNVVS SNNCANVCRT -ESFP-DGEC KSHG--LEAK CFCCKVC ---RHCLSQ- SHRFKGNVVS SNNCANVCRT -ESFP-DGEC KSHG--LERRA CFCCKVC	+4,7 +3,7 +4,7 +4,7 +3,7 +3,7	+51,24 +48,94 +49,41 +52,99 +49,93 +48,94	As variantes K ₁₅ A, H ₃₇ A, L ₃₃ A, R ₄₁ A, e K ₄₂ A foram independentemente produzidas baseadas no rastreamento da atividade biológica na região do peptídeo 7 de OsAFP ₁ . Houve uma grande diminuição da atividade antifúngica em todas as variantes (MIC > 32 µM), a maior diminuição na atividade foi observada para as variantes L ₃₃ A e K ₄₁ A que impedem o cálculo de IC ₅₀ ;					
Peptídeo 1 Peptídeo 2 Peptídeo 3 Peptídeo 4 Peptídeo 5 Peptídeo 6 Peptídeo 7 Peptídeo 8	RHCLSQ- SHRF - SHRFKGNVVS VS SNNCANV SNNCANVCRT -E RT -ESFP-DGEC FP-DGEC KSHG KSHG--LERR ERK CFCCKVC	+2,1 (+2,1) +2,0 (+2,0) -0,1 (-0,1) -0,1 (-0,1) -2,0 (-2,0) -1,0 (-1,0) +2,0 (+2,0) +2,8 (+2,8)	+14,89 (+14,89) +14,05 (+14,05) +10,93 (+10,93) +16,60 (+16,60) +20,90 (+20,90) +21,47 (+21,47) +19,90 (+19,90) +19,51 (+19,51)	Obs: A atividade antifúngica de oito peptídeos foi comparada entre eles e não com OsAFP ₁ , usando IC ₅₀ , porque nem todos os peptídeos obtiveram uma MIC a uma concentração de 25 µM sobre <i>C. albicans</i> e a MIC de OsAFP ₁ sobre este patógeno foi de 4 µM. O peptídeo 1 exibiu atividade antifúngica pronunciada; os peptídeos 2, 7 e 8 mostraram atividade antifúngica um pouco mais fraca que o peptídeo 1. Os peptídeos 3, 4 e 6 tiveram 50% da atividade antifúngica sobre <i>C. albicans</i> em concentração superior a 25 µM.					
BcDef BcDef ₁	---RRCESQ- SQRFKGTCLS EKNCAVSVCT -EGFS-GGDC R--G--LRRR C CTRC FS-GGDC R--G--LRRR C CTRC	+3,6 +4,0 (+4,0)	+50,10 +20,00 (+20,00)	BcDef ₁ teve atividade sobre as bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Bacillus cereus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i> . Além de apresentar atividade antioxidante. A atividade biológica da BcDef ₁ não foi comparada a BcDef porque os autores não a testaram.					
NoD173	---RRCCKAE- SNTFTGICIA KPFCQACIR -EKFT-DGHC S--K--VLRR C CTRC ---RRCCKAE- SNTFTGICIA KPFCQACIR -EKFT-DGHC S--K--VLRR C CTRC ---RRCCKAE- SNTFTGICIA KPFCQACIR -EKFT-DGHC S--K--VLRR C CTRC	+7,6 +8,6 +8,6	+44,48 +45,79 +45,47	NoD173 possui atividade inibitória sobre uma variedade de tumores humanos PC3, MM170 e HeLa; NoD173(A ₂ R) exibiu atividade diminuída (em mais de duas vezes) na viabilidade das linhagens celulares testadas em comparação a NoD173 selvagem; NoD173(Q ₂₂ K) foi até duas vezes mais ativo sobre as três linhagens de células tumorais.					
OefDef1.1 OefDef1.1_V1 OefDef1.1_V2 OefDef1.1_V3 OefDef1.1_V4 OefDef1.1_V5	---KFCIKL- SKGWRGICAP -HKCSSYCH HEG-AGHGC LKNRHSKHYG C CYRHCY ---KFCIKL- SKGWRGICAP -HKCSSYCH HEG-AGHGC RGFRRRKHYG C CYRHCY ---KFCIKL- SKGWRGICAP -HKCSSYCH HEG-AGHGC HVRNRKHYG C CYRHCY ---KFCIKL- SKGWRGICAP -HKCSSYCH HEG-AGHGC AAARHSKHYG C CYRHCY ---KFCIKL- SKGWRGICAP -HKCSSYCH HEG-AGHGC LKNAAAKHYG C CYRHCY ---KFCIKL- SKGWRGICAP -HKCSSYCH HEG-AGHGC LKNRHSAAAA C CYRHCY	+8,1 +9,9 +7,1 +7,1 +7,0 +7,0	+50,31 +51,30 +48,32 +49,41 +47,21 +46,74	A químera contém o γ-core da MtDef ₁ . Esta perdeu cerca de 50% da atividade sobre <i>Botrytis cinerea</i> e <i>F. oxysporum</i> comparado ao tipo selvagem OefDef1.1; A químera contém o γ-core da Dm-AMP, de <i>Dahlia merckii</i> . Esta mostrou atividade antifúngica ligeiramente maior sobre <i>B. cinerea</i> e <i>F. oxysporum</i> que o tipo selvagem OefDef1.1; A variante OefDef1.1_V3 (OefDef1.1 ^{LKNRHSKHYG/AAARHSKHYG}) exibiu atividade antifúngica semelhante à do tipo selvagem OefDef1.1 sobre <i>B. cinerea</i> e <i>F. oxysporum</i> ; A variante OefDef1.1_V4 (OefDef1.1 ^{LKNRHSKHYG/LKNAAAKHYG}) exibiu atividade antifúngica semelhante à do tipo selvagem OefDef1.1 sobre <i>B. cinerea</i> e <i>F. oxysporum</i> ; A variante OefDef1.1_V5 (OefDef1.1 ^{LKNRHSKHYG/LKNRHSAAAA}) exibiu atividade aumentada para <i>B. cinerea</i> e <i>F. oxysporum</i> comparado ao tipo selvagem OefDef1.1.					
MsDef ₁ (γ-core original) MtDef ₄ (γ-core original) MtDef ₅ (γ-core original) RsAFP ₂ (γ-core original) So-D ₂ (γ-core original)	GR R----DDFR C CTRC GR R--G--FRRR C CTRC GAC HRQG--FGFA C CYKC GSC NYVFP--AHK C CYFP GDC K--G--IRRR C CSKPL	+2,7 +4,8 +2,8 +0,9 +3,8	+22,74 +18,58 +16,94 +9,79 +22,37	Inibe o crescimento de <i>Phoma medicaginis</i> STC (12,7 µM) e WS-2 (14,8 µM), e a 30 µM foi ineficaz sobre <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>medicaginis</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium tritictum</i> , <i>Colletotrichum trifolii</i> , <i>Aphaanomyces euteiches</i> , <i>Fusarium redolens</i> , e <i>Fusarium incarnatum</i> ; Inibe o crescimento de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>medicaginis</i> 7F-3 (7,1 µM) e 31F-3 (6,9 µM), <i>Phoma medicaginis</i> STC (7,3 µM) e WS-2 (5,3 µM), <i>Fusarium solani</i> (6,0 µM), <i>Fusarium tritictum</i> (14,7 µM) e a 30 µM foi ineficaz sobre <i>Colletotrichum trifolii</i> , <i>Aphaanomyces euteiches</i> , <i>Fusarium redolens</i> , e <i>Fusarium incarnatum</i> ; Inibe o crescimento de <i>Fusarium tritictum</i> , e a 30 µM foi ineficaz sobre <i>Phoma medicaginis</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>medicaginis</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Colletotrichum trifolii</i> , <i>Aphaanomyces euteiches</i> , <i>Fusarium redolens</i> , e <i>Fusarium incarnatum</i> ; Inibe o crescimento de <i>Fusarium tritictum</i> , e a 30 µM foi ineficaz sobre <i>Phoma medicaginis</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>medicaginis</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Colletotrichum trifolii</i> , <i>Aphaanomyces euteiches</i> , <i>Fusarium redolens</i> , e <i>Fusarium incarnatum</i> ; Inibe o crescimento de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>medicaginis</i> 7F-3 (33,1 µM), <i>Phoma medicaginis</i> STC (6,4 µM) e WS-2 (6,1 µM), <i>Fusarium solani</i> (13,8 µM), <i>Fusarium tritictum</i> (14,7 µM) e a 30 µM foi ineficaz sobre <i>Colletotrichum trifolii</i> , <i>Aphaanomyces euteiches</i> .					
PvD ₁ Y ₃₁₋₄₅ PvD ₁ Y ₃₁₋₄₅ PvD ₁ ** Y ₃₃₋₄₁ PvD ₁ Y ₃₃₋₄₁ PvD ₁ **	---KICENL- ADTYKGCFT TGSCDHCNK KEHLRS-GR R----DDFR C CTRC RS-GR A R----DDFR A ATK RS-GR A R----RRFR A ATK GR A R----DDFR A GR A R----RRFR A	+1,7 +3,0 (+2,8) +7,0 (+2,8) +1,0 (+0,9) +5,0 (+0,9)	+59,19 +24,78 (+23,22) +21,12 (+23,22) +21,05 (+20,01) +17,39 (+21,05)	Inibe o crescimento de <i>C. albicans</i> e <i>C. buinensis</i> em 40 e 100% a 293,6 µM, respectivamente; Inibe o crescimento de <i>C. albicans</i> e <i>C. buinensis</i> em 100 e 100% a 73,4 e 18,35 µM, respectivamente; Não inibe o crescimento de <i>C. albicans</i> a 293,6 µM e inibe <i>C. buinensis</i> em 17% a 293,6 µM; Inibe o crescimento de <i>C. albicans</i> e <i>C. buinensis</i> em 63 e 100% a 293,6 e 36,7 µM, respectivamente.					
VuDef ₁ A ₃₆ , A ₄₂ , A ₄₄ , V ₃₂₋₄₆ VuDef (DD)	---MKCENL- ADTYRGCFT TGSCDHCNK KEHLRS-GR R----DDVR C CTRC L-SGR A R----DDVR A ATR	+2 +2	+55,40 +21,98 (+20,42)	Obs: inibe <i>Leishmania amazonensis</i> ; Obs: C ₃₆ A; C ₄₂ A; C ₄₄ A, inibe <i>L. amazonensis</i> como VuDef ₁ , mas não possui atividade significativa sobre leveduras.					
A ₃₆ , A ₄₂ , A ₄₄ , R ₃₇ , A ₃₈ , V ₃₂₋₄₆ VuDef (RR) A ₄₂ , A ₄₄ , R ₃₇ , A ₃₈ , W ₃₆ , A ₃₉ , Y ₃₂₋₄₆ VuDef (WR)	L-SGR A R----RRVR A ATR L-SGR W R----RRWR A ATR	+6 +6	+18,32 (+21,98) +14,10 (+21,98)	D ₃₇ R; D ₃₈ R; aumentou a atividade sobre as leveduras <i>C. albicans</i> , <i>C. buinensis</i> e <i>C. tropicalis</i> ; A ₃₆ W; V ₄₀ W; C ₄₄ A; D ₃₇ R; D ₃₈ R; aumentou a atividade sobre as leveduras <i>C. albicans</i> , <i>C. buinensis</i> , <i>S. cerevisiae</i> e <i>C. tropicalis</i> .					

Na estrutura primária da VuDef₁ é mostrada uma metionina no início da sequência (em negrito e itálico) que foi incluída como um requerimento para a expressão usando o vetor pET-32 EK/LIC como descrito em Santos *et al.* (2010).
O γ-core, conforme definido por Yount e Yeman (2004), está destacado em uma caixa vermelha, mas ao invés de destacar a sequência NH₂-[X₁₋₃]-[GXC]-[X₃₋₉]-[C]-COOH, destacamos a sequência NH₂-[GXC]-[X₃₋₉]-[C]-COOH, porque a maioria dos artigos consideraram esse trecho como o γ-core.
A carga líquida foi calculada pelo PepCalc (<https://pepcalc.com/>);
A hidrofobicidade foi calculada pelo PepDraw (<http://pepdraw.com/>) de acordo com a escala de hidrofobicidade Wimley-White. Segundo esta escala, quanto mais positivo o valor, mais hidrofílico é o peptídeo e, conseqüentemente, quanto mais negativo o valor, mais hidrofóbico.
**Não calculado porque B e X (ácido α-aminoisobutírico) não são reconhecidos pelos sites utilizados.

A análise da **Tabela 1** nos permitiu perceber que, em geral, as alterações foram feitas na região do γ -core (destacada na caixa vermelha) e que as trocas de aminoácidos, em locais específicos, que aumentam a carga positiva e a hidrofobicidade das defensinas ou dos seus peptídeos derivados melhoram suas atividades biológicas. Observamos também que a presença de resíduos aromáticos e hidrofóbicos na região do γ -core são importantes para a atividade biológica dessas moléculas. Além disso, foi possível perceber que há um tamanho mínimo de resíduos de aminoácidos para que estes peptídeos tenham atividade. Peptídeos muito curtos, com menos de 10 resíduos de aminoácidos, abrangendo somente a região do γ -core ou menores, possuem pouca ou nenhuma atividade quando comparada ao peptídeo que abrange a região do γ -core e alguns resíduos que os flanqueiam das fitas β_2 e β_3 . Estas informações serão analisadas com mais detalhes na seção **Discussão**.

A partir das informações obtidas na **Tabela 1**, comparamos especificamente a sequência de *VuDef*₁ e DD com outras defensinas e seus peptídeos derivados, como exemplificado na **Figura 11**. Inicialmente, analisamos os aminoácidos presentes na região do γ -core, já que quando trocados em algumas defensinas, ou em seus peptídeos derivados, resultaram em variação na atividade biológica. Sendo assim, estes aminoácidos e suas posições foram considerados interessantes para alterações na sequência original de DD. Vimos que a presença de resíduos positivos nas posições 41 e 50 (posição de referência dos aminoácidos na **Tabela 1**) são conservadas e importantes para a atividade biológica das defensinas de plantas ou peptídeos derivados, como demonstrado, por exemplo, para as defensinas *Rs-AFP*₂, *MsDef*₁ (defensina de *Medicago sativa* L., alfafa), *MtDef*₂ (defensina de *Medicago trunculata* Gaertn., luzerna), *MtDef*₄ e *OsAFP*₁ (defensina de *Oryza sativa japonica*, arroz). Nessas posições correspondentes, DD tem duas argininas, aminoácidos carregados positivamente, portanto, nós as mantivemos para o desenho dos novos peptídeos (**Tabela 1** e **Figura 11**).

Defensina/nome do peptídeo	Estrutura Primária (Código de uma letra)						Carga Líquida (pH 7,0)	Hidrofobicidade (Kcal/mol)			
	1	11	21	31	41	51			61		
<i>VuDef</i> ₁ A ₃₆ , 42, 44Y ₃₂₋₄₆ <i>VuDef</i> (DD) R5-AFP ₂	---KTCENL-	ADTYRGP	CGFT	TGSCDDHCKN	KEHLI-SGR	R-----DDVR-	-CWCTRNC	+2	+55,40		
					L-SGRA	R-----DDVR-	-AWATR	+2	+21,98 (+20,42)		
	--QKLCQRP-	SGTWSGV	CNS	NNACKNQ	CIR	LEK-ARHG	C	RVVFP--AHK	-CICVFFC	+5,6	+34,78
	--QKLCQRP-	SGTWSGV	CNS	NNACKNQ	CIR	LEK-ARHG	C	RVVFP--AHK	-CICVFFC	+6,6	+35,74
	--QKLCQRP-	SGTWSGV	CNS	NNACKNQ	CIR	LEK-ARHG	C	RVVFP--AHK	-CICVFFC	+5,6	+36,64
	--QKLCQRP-	SGTWSGV	CNS	NNACKNQ	CIR	LEK-ARHG	C	NYVFP--AHK	-CICVFFC	+6,6	+37,05
	--QKLCQRP-	SGTWSGV	CNS	NNACKNQ	CIR	LEK-ARHG	C	NYVMP--AHK	-CICVFFC	+5,6	+35,82
	--QKLCQRP-	SGTWSGV	CNS	NNACKNQ	CIR	LEK-ARHG	C	NYVFP--AHK	-CICVFFC	+5,6	+34,64
	--QKLCQRP-	SGTWSGV	CNS	NNACKNQ	CIR	LEK-ARHG	C	NYVFP--RHK	-CICVFFC	+6,6	+36,09
	--QKLCQRP-	SGTWSGV	CNS	NNACKNQ	CIR	LEK-ARHG	C	NYVFP--AHQ	-CICVFFC	+4,6	+32,75
		M R	R G R M		R R W				R I R		
	--QKLCQRP-	SGTWSGV	CNS	NNACKNQ	CIR	LEK-ARHG	C	NYVFP--AHK	-CICVFFC	+5,6	+34,78
		M R	R G R M		R R W		RGRMA	R Q	R I R		
<i>VuDef</i> ₁ A ₃₆ , 42, 44Y ₃₂₋₄₆ <i>VuDef</i> (DD) <i>PvD</i> ₁ Y ₃₁₋₄₅ <i>PvD</i> ₁ Y ₃₁₋₄₅ <i>PvD</i> ₁ ⁺⁺ Y ₃₃₋₄₁ <i>PvD</i> ₁ Y ₃₃₋₄₂ <i>PvD</i> ₁ ⁺⁺	---KTCENL-	ADTYRGP	CGFT	TGSCDDHCKN	KEHLI-SGR	R-----DDVR-	-CWCTRNC	+2	+55,40		
					L-SGRA	R-----DDVR-	-AWATR	+2	+21,98 (+20,42)		
	---KTCENL-	ADTYKGE	CFT	TGSCDDHCKN	KEHLRS-GR	R-----DDFR-	-CCTKNC	+1,7	+59,19		
					RS-GR	R-----DDFR-	-AWATK	+3,0 (+2,8)	+24,78 (+23,22)		
					RS-GR	R-----RRFR-	-AWATK	+7,0 (+2,8)	+21,12 (+23,22)		
					GFA	R-----DDFR-	-A	+1,0 (+0,9)	+21,05 (+20,01)		
					GFA	R-----RRFR-	-A	+5,0 (+0,9)	+17,39 (+21,05)		
<i>VuDef</i> ₁ A ₃₆ , 42, 44Y ₃₂₋₄₆ <i>VuDef</i> (DD) <i>MsDef</i> ₁ <i>MtDef</i> ₄ <i>MsDef</i> ₁ -R ₃₈ Q <i>MsDef</i> ₁ -Y ₄ <i>GMA</i> ₁ <i>GMA</i> ₄ <i>GMA</i> ₁ -L <i>GMA</i> ₄ -L <i>GMA</i> ₄ -L1 <i>GMA</i> ₄ -L2 <i>GMA</i> ₁ -C <i>GMA</i> ₄ -C	---KTCENL-	ADTYRGP	CGFT	TGSCDDHCKN	KEHLI-SGR	R-----DDVR-	-CWCTRNC	+2	+2		
					L-SGRA	R-----DDVR-	-AWATR	+2	+2		
	---RTCENL-	ADKYRGE	CFS	-G-CDTHC	TT	KENAV-SGR	C	R-----DDFR-	-CCTKNC	+2,6	+51,68
	---KTCESQS	PHKFKGE	CAS	DHNCASVQ	QT	-ERFS-GGR	C	R--G--FRRR-	-CCTKNC	+5,8	+49,16
	---RTCENL-	ADKYRGE	CFS	-G-CDTHC	TT	KENAV-SGR	C	R-----DDFR-	-CCTKNC	+1,6	+50,64
	---RTCENL-	ADKYRGE	CFS	-G-CDTHC	TT	KENAV-SGR	C	R--G--FRRR-	-CCTKNC	+6,6	+49,17
					GR	R-----DDFR-	-C	+0,9 (+0,9)	+20,01 (+20,01)		
					GR	R--G--FRRR-	-C	+4,9 (+4,9)	+17,50 (+17,01)		
					R	-----DDFR-	-C	0 (0)	+17,09 (+17,09)		
					R--G--FRRR-			+4,0 (+4,0)	+14,58 (+14,58)		
					R--G--ARRR-			+4,0 (+4,0)	+16,79 (+14,58)		
					R--G--FARR-			+3,0 (+4,0)	+13,27 (+14,58)		
					GR	R-----DDFR-	-CCTKNC	+2,7 (+2,7)	+22,74 (+22,74)		
					GR	R--G--FRRR-	-CCTKNC	+4,8 (+4,8)	+19,73 (+19,73)		
<i>VuDef</i> ₁ A ₃₆ , 42, 44Y ₃₂₋₄₆ <i>VuDef</i> (DD) SPE10	---KTCENL-	ADTYRGP	CGFT	TGSCDDHCKN	KEHLI-SGR	R-----DDVR-	-CWCTRNC	+2	+2		
					L-SGRA	R-----DDVR-	-AWATR	+2	+2		
	---KTCENL-	ADTFRGE	CFT	DGSCDDHCKN	KEHLI-RGR	C	R-----DDFR-	-CWCTRNC	+0,7	+59,01	
	---KTCENL-	ADTFRGE	CFT	DGSCDDHCKN	KEHLI-RGR	C	R-----DDFR-	-CWCTRNC	+1,7	+56,22	
	---KTCENL-	ADTFRGE	CFT	DGSCDDHCKN	KEHLI-RGR	C	R-----DDFR-	-CWCTRNC	+0,7	+61,57	

Figura 11: Comparação das estruturas primárias de *VuDef*₁ e DD com algumas das defensinas que relataram a correlação entre a estrutura primária e a atividade biológica. Os quadrados azuis indicam alguns aminoácidos que foram importantes para as atividades biológicas das defensinas e que foram selecionados para alterações direcionadas em DD.

Em relação à carga líquida, vimos que *MsDef*₁ tem na sequência de seu γ -core os aminoácidos RDD₃₆FR (posição 48 na **Tabela 1**), muito semelhante a sequência de DD (RDD₃₈VR, posição 48 na **Tabela 1**) (**Figura 11**). Quando estes aminoácidos de *MsDef*₁ foram substituídos pelos aminoácidos do γ -core da *MtDef*₄ RGFR₃₉RR (posição 48 na **Tabela 1**), gerou um peptídeo, chamado *MsDef*₁-Y₄, com maior carga positiva (de +2.6 em *MsDef*₁ para +6.6 em *MsDef*₁-Y₄) e maior hidrofobicidade (de +51.68 kcal/mol *MsDef*₁ para +49.17 kcal/mol em *MsDef*₁-Y₄). Esta substituição resultou em um aumento significativo da atividade antifúngica da quimera quando comparada a *MsDef*₁ e foi tão potente quanto a *MtDef*₄. Também vimos nos peptídeos derivados do γ -core da defensina *PvD*₁ (defensina de *Phaseolus vulgaris* L., feijão), que a substituição de dois resíduos negativos em γ ₃₁₋₄₅*PvD*₁ (RSGRARD₃₇D₃₈FRAWATK) (posições 47 e 48 na **Tabela 1**) por dois resíduos positivos em γ ₃₁₋₄₅*PvD*₁⁺⁺ (RSGRARR₃₇R₃₈FRAWATK, que também aumentou sua

hidrofobicidade de +24,78 para +21,12 kcal/mol), melhorou sua atividade antifúngica. O mesmo foi observado com a defensina *MtDef*₄, que perdeu sua atividade antifúngica quando os resíduos F₃₈R₃₉, correspondentes aos nossos D₃₇ e D₃₈ (posições 48 e 49 na **Tabela 1**) foram substituídos por A. Neste caso, houve uma diminuição de carga (de +5,8 para +4,8) e de hidrofobicidade (de +49,16 para +50,06 kcal/mol) (**Tabela 1**). Portanto, para desenharmos um dos peptídeos escolhemos substituir os dois resíduos negativos de ácido aspártico na posição 47 e 48 (D_{47,48}) por dois resíduos positivos, no caso decidimos pela arginina, e o chamamos de A_{36,42,44}R_{38,39}V₃₂₋₄₆ *VuDef*, abreviado como RR (para indicar as duas trocas das argininas). Estas substituições garantiram a RR uma carga de +6, enquanto o peptídeo DD possui uma carga de +2 (**Tabela 2**).

Em relação à hidrofobicidade, percebemos que na região do γ -core de *Rs-AFP*₂ a mudança de Y₃₈G (posição 42 na Tabela 1) diminuiu sua hidrofobicidade de +34,78 para +36,64 kcal/mol (sem variação de carga), bem como sua atividade antimicrobiana. O mesmo é observado para SPE10 (defensina *Pachyrhizus erosus*, nabo-mexicano), com a mudança de D₃₈F₃₉ para ND (posição 48 e 49 na **Tabela 1**) a hidrofobicidade cai de +59,01 para +61,57 kcal/mol (ambos retidos +0,7 de carga). No peptídeo C₃₆-C₄₅ (Y₃₈A), derivado de *Rs-AFP*₂, a mudança de Y₃₈ por A (posição 42 na **Tabela 1**) diminuiu a hidrofobicidade de +11,60 para +12,81 kcal/mol e a atividade antifúngica. É interessante notar que a presença de um resíduo de aminoácido aromático nesta região (Y₃₈ em *Rs-AFP*₂ e F₃₉ em SPE10) (posição 42 e 49 na **Tabela 1**, respectivamente) aparentemente contribui para a hidrofobicidade e a atividade antimicrobiana. Nestas posições (ou próximas) o peptídeo DD possui uma A₃₆ e uma V₃₉ (**Tabela 1**). Por estes motivos, para o segundo peptídeo além do aumento da carga positiva descrita acima, foram feitas duas trocas para o aumento da hidrofobicidade. Neste, decidimos substituir a alanina (A₃₆) e a valina (V₄₀) pelo resíduo aromático triptofano (W) e, com as duas substituições, o peptídeo foi chamado de A_{42,44}R_{38,39}W_{36,40}V₃₂₋₄₆ *VuDef*, abreviado como WR (para indicar as duas trocas dos triptofanos). As substituições A₃₆W e V₄₀W garantiram uma hidrofobicidade maior à WR (+14.10 kcal/mol), quando comparado à RR (+18.32 kcal/mol) e DD (+21.98 kcal/mol) (**Tabela 2**). O caráter mais hidrofóbico dos peptídeos desenhados foi confirmado pelo aumento do tempo de retenção na coluna C-18 de fase reversa em HPLC, especialmente para WR (**Anexo 3**).

Tabela 2: Estrutura primária e propriedades biofísicas dos peptídeos desenhados baseados no γ -core da defensina *VuDef*₁, desenhados de acordo com as informações obtidas da Tabela 1. A posição dos aminoácidos foi mantida como no artigo original e os números acima das sequências são apenas para orientação da posição do aminoácido. Os espaços (-) foram adicionados para melhorar o alinhamento. Os números entre parênteses indicam a carga líquida ou a hidrofobicidade da sequência correspondente na defensina ou no peptídeo derivado. Em preto e negrito estão os aminoácidos que foram trocados na sequência dos peptídeos desenhados e a caixa vermelha destaca o γ -core (nos mesmos critérios usados para a Tabela 1).

Defensina/ Nome do peptídeo	Estrutura Primária (Código de uma letra)						Carga Líquida (pH 7.0)	Hidrofobicidade (Kcal/mol)
	1	11	21	31	41	51		
<i>VuDef</i> ₁ A _{36,42,44} Y ₃₂₋₄₆ <i>VuDef</i> (DD)	-- M KTCENL-	ADTYRGPCFT	TGSCDDHCKN	KEHLL-SG F	C R-----DDVR - C M CTRNC		+0,7 +2	+54,73 +21,98 (+20,42)
A _{36,42,44} R _{37,38} Y ₃₂₋₄₆ <i>VuDef</i> (RR)				L-SG F	A R----- RR VR - A A TR		+6	+18,32 (+21,98)
A _{42,44} R _{37,38} W _{36,39} Y ₃₂₋₄₆ <i>VuDef</i> (WR)				L-SG F	W R----- RR WR - A A TR		+6	+14,10 (+21,98)

Na estrutura primária de *VuDef*₁ é mostrada uma metionina inicial (em negrito e itálico) que foi incluída como um requisito para sua expressão usando o vetor pET-32 EK/LIC, conforme descrito em Dos Santos *et al.* (2010).

4.3 Atividade Antifúngica dos Peptídeos RR e WR

A atividade antifúngica dos peptídeos RR e WR foi avaliada usando as mesmas leveduras e os mesmos parâmetros usados para o peptídeo DD. Como resultado, podemos observar que o peptídeo RR possui maior atividade antifúngica que o peptídeo DD, inibindo o crescimento de três das seis leveduras testadas: *C. albicans* (45,7%), *C. buinensis* (100%) e *C. tropicalis* (72,1%) (**Figura 12A**). O peptídeo WR, por sua vez, foi o mais ativo do três, com atividade antifúngica sobre quatro das seis leveduras testadas, inibindo o crescimento de *C. albicans* (96,2%), *C. buinensis* (98,5%), *C. tropicalis* (58,2%) e *S. cerevisiae* (26,1%) (**Figura 12B**).

Além disso, a análise visual da microplaca ao final do ensaio nos permitiu observar uma diminuição de células no fundo dos poços tratados quando comparados aos seus respectivos controles (**Figura 12A e B**), corroborando os resultados obtidos pela análise por absorbância. Também foi possível observar uma alteração no padrão de crescimento de leveduras mesmo não sendo inibidas pelos peptídeos, como *C. parapsilosis* (**Figura 12A**) e *C. pelliculosa* (**Figura 12B**).

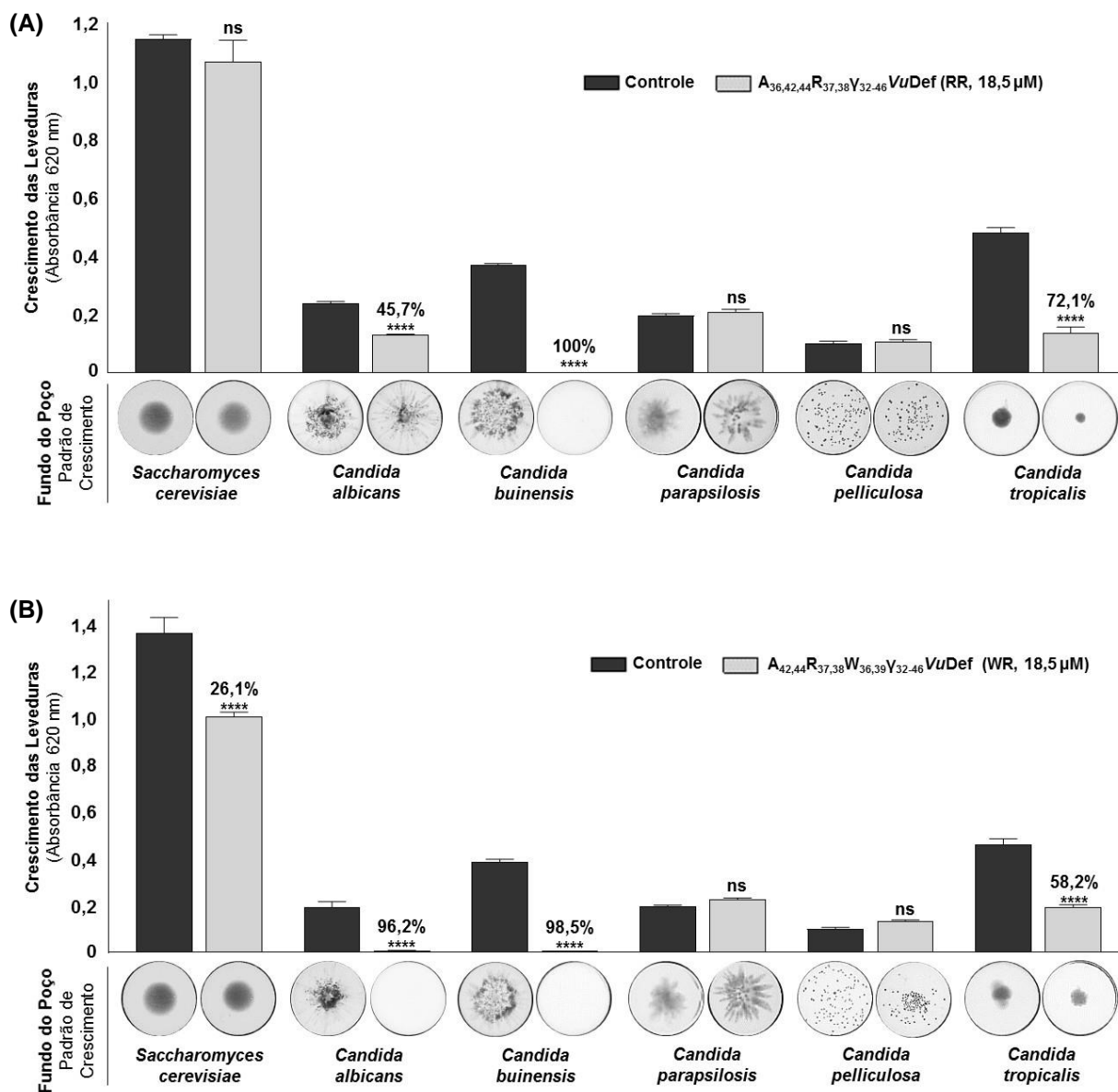


Figura 12: Crescimento das seis leveduras na ausência (controle) e presença de RR (A) e WR (B). Em cima das barras está indicado a porcentagem de inibição do tratamento em relação ao seu respectivo controle. Os asteriscos indicam a significância estatística (**** P<0,0001) e “ns” representa não significativo em relação ao controle. A imagem é representativa de um ensaio independente de três.

Os resultados obtidos nos ensaios antimicrobianos mostraram que as alterações direcionadas nos resíduos de aminoácidos foram capazes de melhorar a atividade antifúngica dos peptídeos RR e WR, comparados ao peptídeo DD. Sendo assim, para os ensaios seguintes, foi escolhida a combinação dos peptídeos mais

ativos com as leveduras mais sensíveis e de relevância médica, são eles: o peptídeo RR com *C. tropicalis* e o peptídeo WR com *C. albicans*.

4.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória

Para determinarmos a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento fúngico, foi feito o ensaio de MIC₁₀₀. Neste ensaio, foi possível perceber que o peptídeo RR inibiu completamente o crescimento de *C. tropicalis* a partir da concentração de 27,5 µM (**Figura 13A**).

No ensaio antimicrobiano realizado anteriormente, foi possível perceber que visualmente o peptídeo WR inibiu completamente o crescimento de *C. albicans* já na concentração de 18,5 µM (**Figura 12B**), por esse motivo decidimos testar também a concentração de 14 µM. Nesta concentração houve um pequeno crescimento fúngico, que não foi observado a partir da concentração de 18,5 µM. Portanto, esta concentração foi considerada como a MIC₁₀₀ para o peptídeo WR (**Figura 13B**).

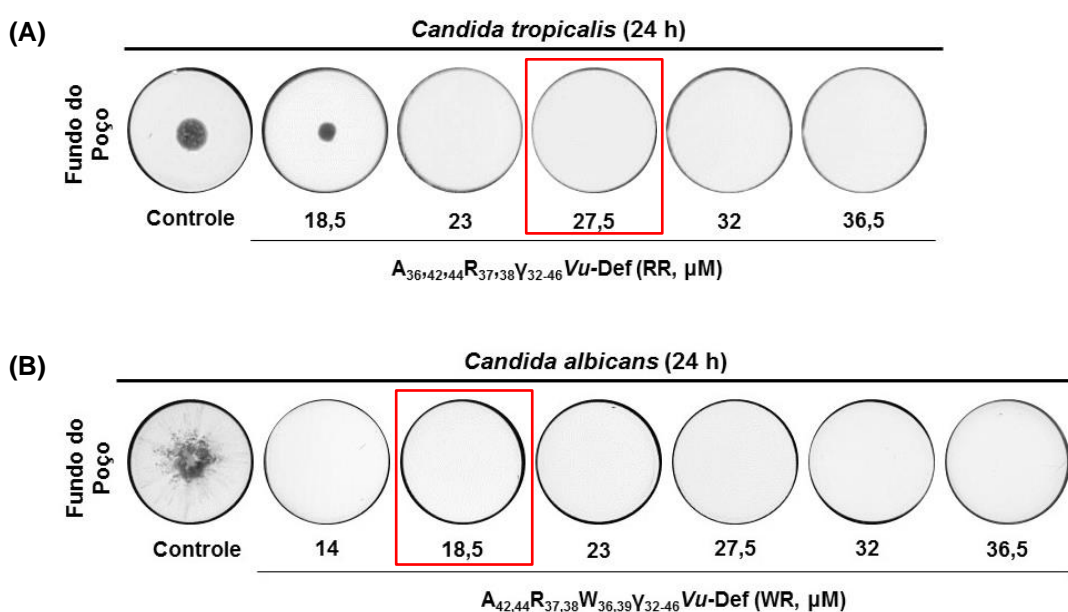


Figura 13: Determinação da concentração mínima inibitória de RR sobre *C. tropicalis* (A) e de WR sobre *C. albicans* (B). Na concentração de 23 µM (A) e 14 µM (B) houve um pequeno crescimento fúngico, não captado pela câmera. A caixa vermelha indica a MIC₁₀₀, esta foi repetida três vezes em triplicata, assim como o controle. As outras concentrações foram feitas uma vez em triplicata. A imagem é representativa de um ensaio independente de três.

4.5 Determinação da Viabilidade Celular

Para determinarmos se a ação dos peptídeos é fungicida ou fungistática, plaqueamos os conteúdos dos poços ao final do ensaio da MIC₁₀₀. Quando tratamos *C. tropicalis* com o peptídeo RR, na concentração da MIC₁₀₀, não houve crescimento de colônias, indicando que 27,5 µM é a concentração da DL₁₀₀ (**Figura 14A**). No entanto, quando *C. albicans* foi tratada com o peptídeo WR, na concentração da MIC₁₀₀, houve o crescimento de colônias, logo decidimos plaquear a concentração seguinte de 23 µM, a qual também não inibiu o crescimento da levedura. Na concentração de 27,5 µM não houve o crescimento de colônias, indicando que esta concentração é a DL₁₀₀ do peptídeo WR para *C. albicans* (**Figura 14B**).

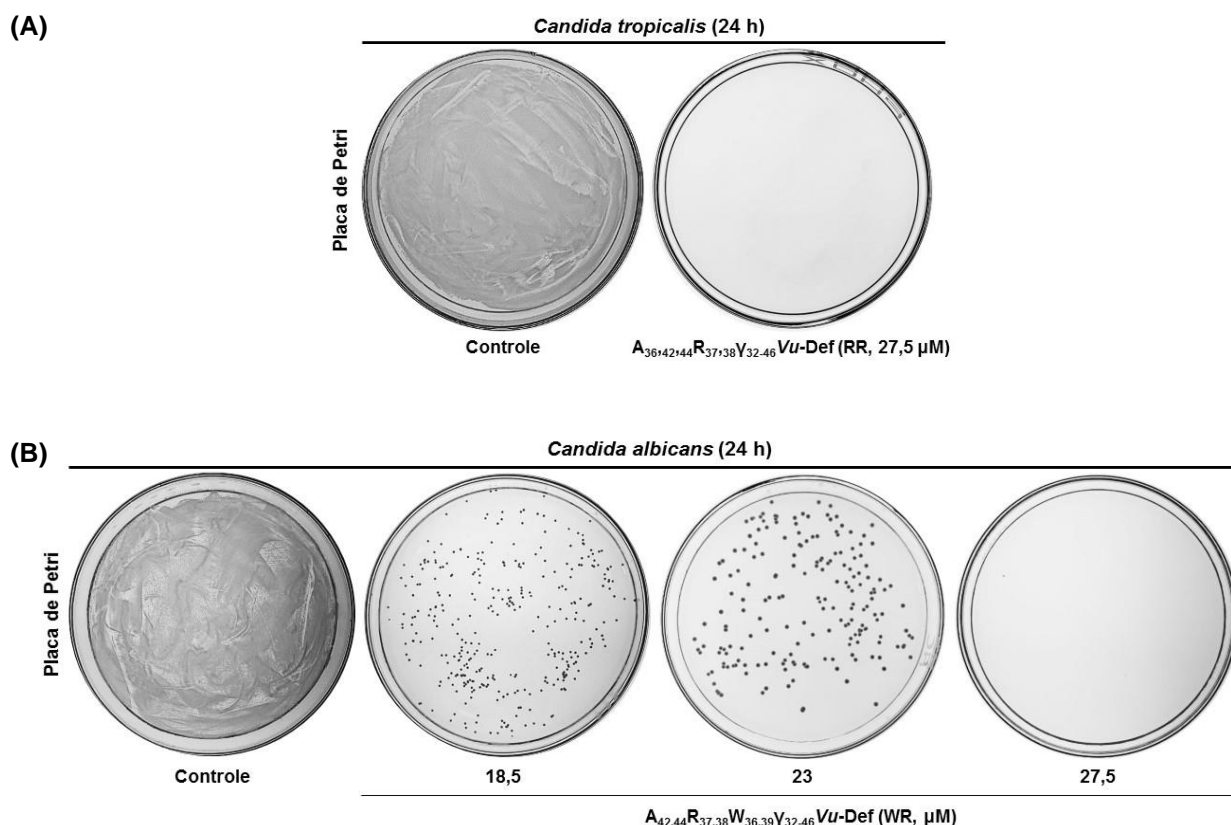


Figura 14: Determinação da viabilidade celular de *C. tropicalis* tratada com RR **(A)** e de *C. albicans* tratada com WR **(B)**. **(A)** Note que não há desenvolvimento de colônias na placa tratada, indicando que 27,5 µM é a DL₁₀₀ de RR. **(B)** Note que há desenvolvimento de colônias na placa nas concentrações de 18,5 µM e 23 µM, mas não em 27,5 µM, indicando que esta é a DL₁₀₀ de WR. O maior diâmetro das colônias em 23 µM é consequência de um maior tempo na estufa. A DL₁₀₀ é representativa de

um ensaio independente de três, mas as concentrações de 18,5 μM e 23 μM (**B**) foram feitas apenas uma vez em triplicata.

A fim de compararmos a atividade antifúngica dos nossos peptídeos com um fármaco utilizado no tratamento de infecções causadas por *Candida*, decidimos testar o fluconazol na mesma concentração da DL_{100} determinada para os peptídeos. Ao tratar as leveduras com fluconazol, pode-se observar um pequeno crescimento no fundo do poço e o desenvolvimento de colônias após plaqueamento, evidenciando a ação fungistática deste fármaco (**Figura 15**).

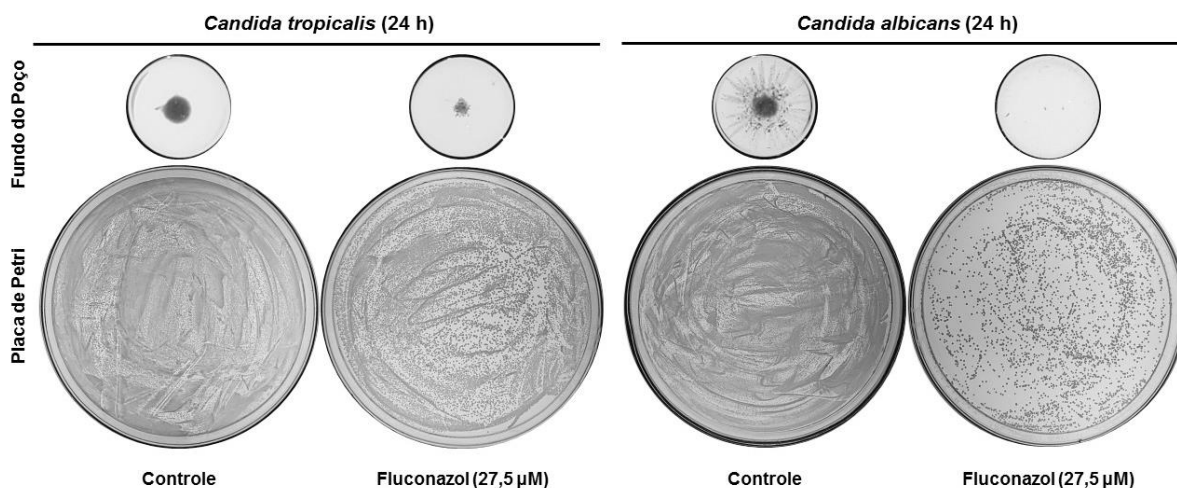
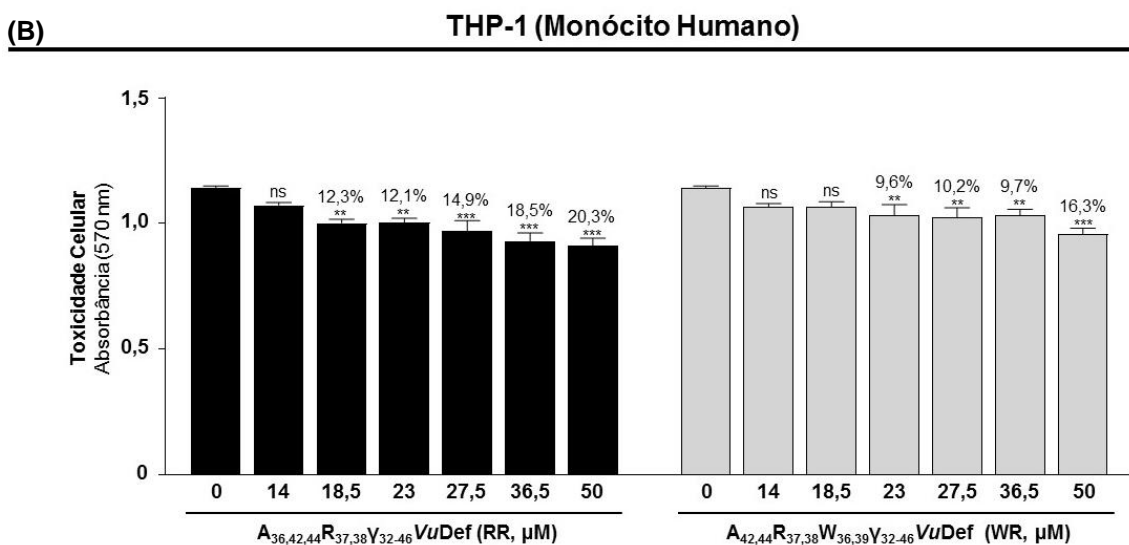
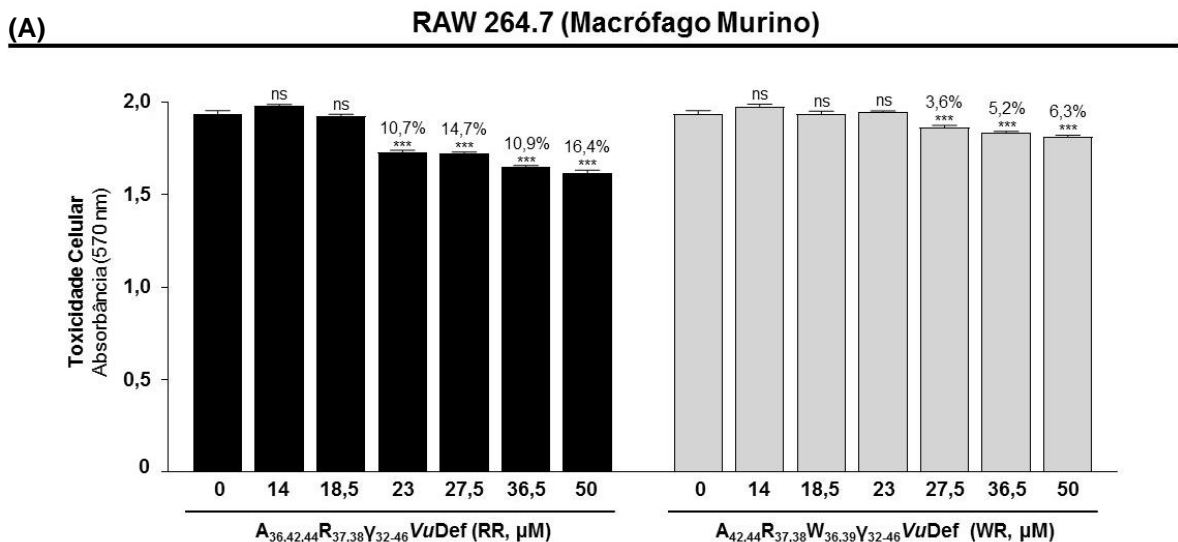


Figura 15: Determinação da viabilidade celular de *C. tropicalis* e *C. albicans* na ausência (controle) e na presença de fluconazol. Note que houve o crescimento de células após o ensaio antimicrobiano e desenvolvimento de colônias nas duas leveduras. A imagem é representativa de um ensaio independente de três.

4.6 Determinação da Citotoxicidade dos Peptídeos Desenhados sobre Células de Mamíferos

Para identificarmos a toxicidade dos peptídeos RR e WR sobre as células de mamíferos, um ensaio de citotoxicidade por MTT foi feito. Pode ser observado que os dois peptídeos possuem baixa toxicidade em todas as concentrações testadas para ambas as linhagens celulares (**Figura 16**). Na concentração da DL_{100} para as leveduras (27,5 μM) a linhagem RAW 264.7 apresentou apenas 14,7% (RR) e 3,6% (WR) de toxicidade (**Figura 16A**) e a linhagem THP-1 mostrou 14,9% (RR) e 10,2% (WR) de toxicidade (**Figura 16B**). Pode-se observar ainda que mesmo na

concentração mais alta testada, 50 μM , os peptídeos possuem baixa citotoxicidade. Nesta concentração, o peptídeo RR foi tóxico para 16,4% da cultura de RAW 264.7 (**Figura 16A**) e 20,3% para THP-1 (**Figura 16B**). O peptídeo WR é ainda menos tóxico na concentração de 50 μM , apresentando toxicidade de 6,3% para RAW 264.7 (**Figura 16A**) e 16,3% para THP-1 (**Figura 16B**). Estes resultados, e também o do fármaco fluconazol (**Figura 15**), sugerem que os peptídeos RR e WR podem ser bons candidatos a novos fármacos uma vez que a concentração requerida para matar 100% dos fungos não inibe nem 50% da atividade metabólica das células de mamíferos. Além disso, a concentração requerida para inibir 50% da atividade metabólica das células de mamíferos (CC_{50}) é superior a 50 μM (**Figura 16C**).



(C)

Nome do peptídeo (Abreviação)	CC ₅₀ (µM)	
	RAW 264.7 Macrófago Murino	THP-1 Monócito Humano
A _{36,42,44} R _{37,38} Y ₃₂₋₄₆ VuDef (RR)	> 50	> 50
A _{42,44} R _{37,38} W _{36,39} Y ₃₂₋₄₆ VuDef (WR)	> 50	> 50

CC₅₀ – 50% da concentração citotóxica

Figura 16: Toxicidade sobre células de macrófagos murinos RAW 264.7 **(A)** e monócitos humanos THP-1 **(B)** após 24 h de tratamento com os peptídeos desenhados RR e WR. Acima das barras dos testes é mostrada a percentagem de inibição. Ns – não significativo. **(C)** 50% da concentração citotóxica (CC₅₀) requerida para a redução da viabilidade celular em 50%, calculada por análise de regressão. (***) P<0,001 comparado com o grupo não tratado (0 µM) determinado por teste de Tukey.

4.7 Análise dos Mecanismos de Ação dos Peptídeos

4.7.1 Determinação do Tempo de Morte

Após a determinação da DL₁₀₀, decidimos determinar o período mínimo necessário para que os peptídeos causem a perda da viabilidade celular. Como resultado pode-se observar que o peptídeo RR, na concentração de 27,5 µM, causa a perda total da viabilidade de células de *C. tropicalis* a partir de 6 h, já havendo uma significativa diminuição da formação de colônias em 3 h (99,7%) **(Figura 17)**.

Candida tropicalis

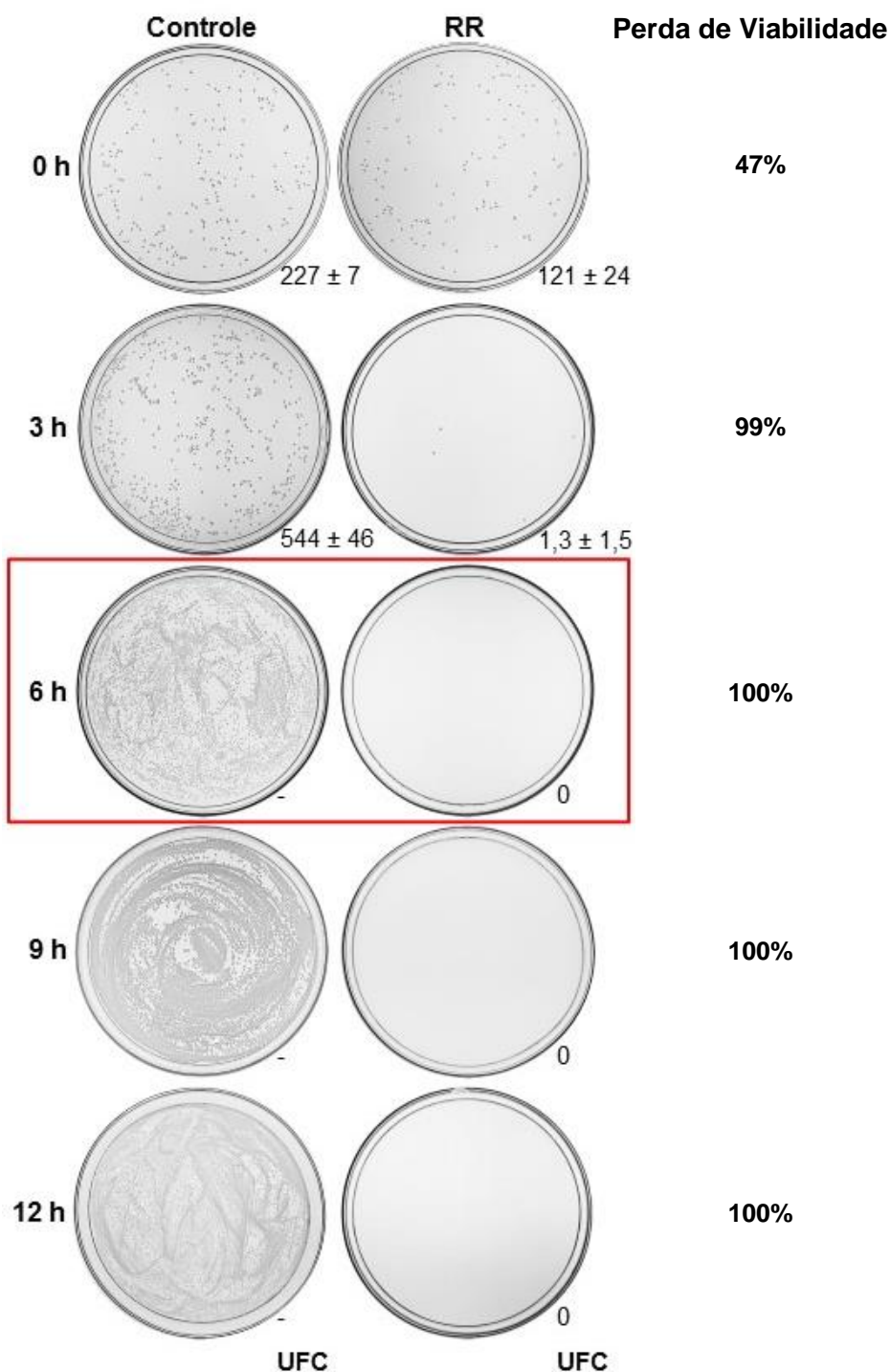


Figura 17: Cinética da morte celular de *C. tropicalis* incubada com RR na concentração de 27,5 µM. É possível perceber uma significativa diminuição da formação de colônias nas amostras testes, até a perda completa da viabilidade em 6 h, destacado em vermelho. UFC = Médias com desvio padrão das unidades formadoras de colônias. (-) = Número excessivo de colônias crescidas que impediu a contagem. As imagens mostradas são representativas de um experimento

independente de três, mas os tempos de 9 e 12 h foram feitos apenas uma vez em triplicata.

O peptídeo WR, na concentração de 27,5 µM, causou a perda de viabilidade de 97% das células de *C. albicans* em 0 h e 100% em 3 h. Este resultado nos levou a testar a atividade antifúngica deste peptídeo nos intervalos de tempo de 1 e 2 h. Como resultado, pode-se observar que WR causou a perda de viabilidade de 100% das células de *C. albicans* a partir de 1 h de tratamento (**Figura 18**).

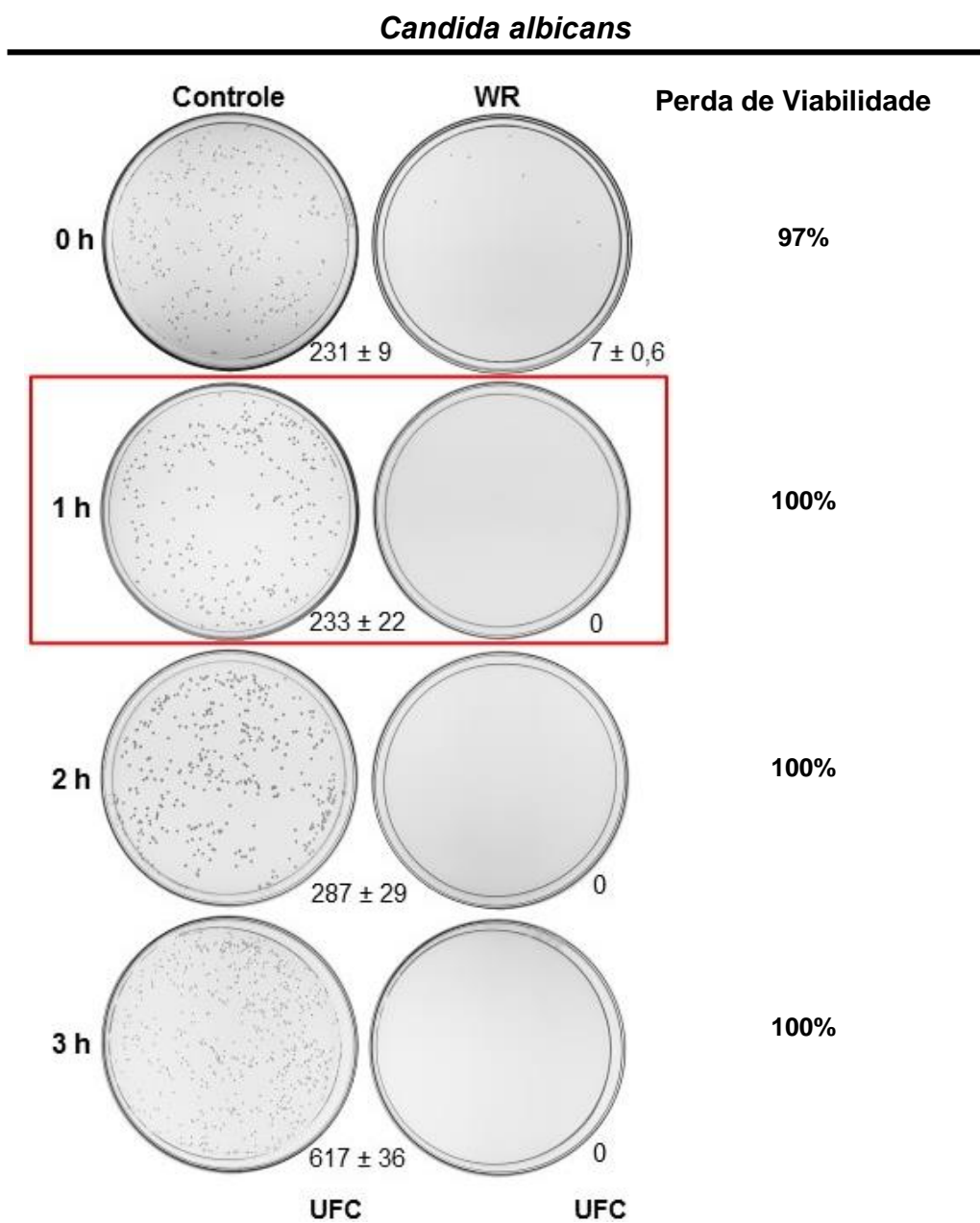


Figura 18: Cinética da morte celular de *C. albicans* incubada com WR na concentração de 27,5 µM. É possível perceber uma significativa diminuição da formação de colônias nas amostras testes já em 0 h de experimento até a perda completa da viabilidade em 1 h, destacado em vermelho. UFC = Médias com desvio padrão das unidades formadoras de colônias. As imagens mostradas são representativas de um experimento independente de três, mas os tempos de 2 e 3 h foram feitos apenas uma vez em triplicata.

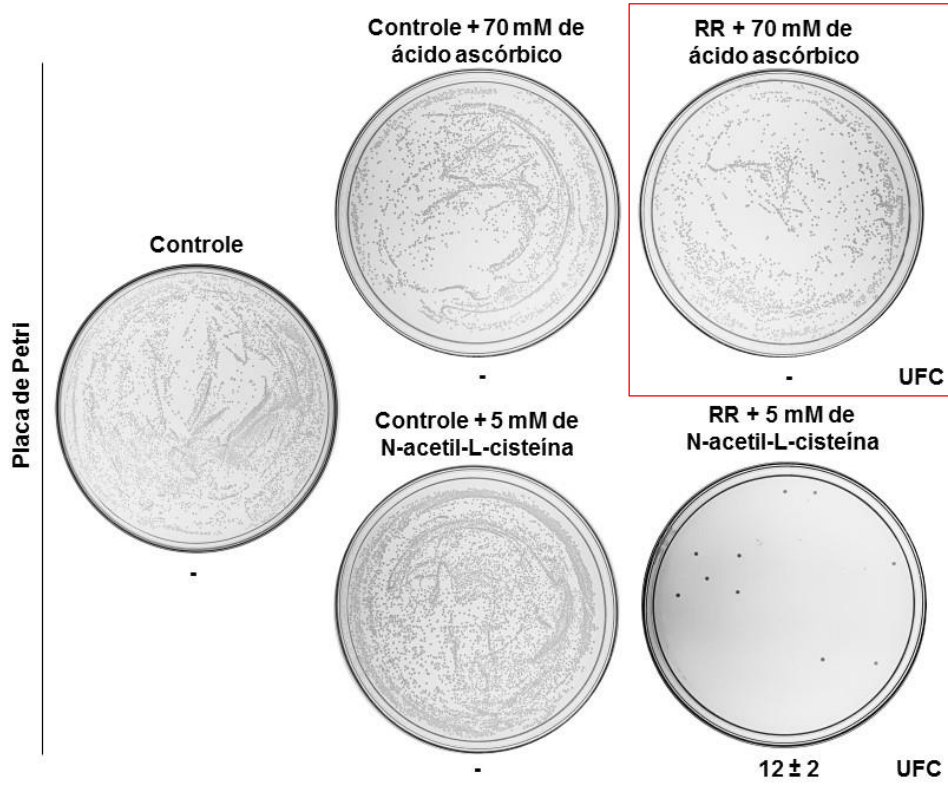
Os ensaios seguintes foram feitos com os parâmetros de DL₁₀₀ e tempo de morte determinados para cada combinação peptídeo-levedura: *C. tropicalis* + RR (27,5 µM/6 h) e *C. albicans* + WR (27,5 µM/1 h).

4.7.2 Análise da Atividade Antifúngica dos Peptídeos Desenhados na Presença de Agente Antioxidante

Agentes antioxidantes como o ácido ascórbico e a NAC evitam o acúmulo de ROS em células. Sendo assim, um ensaio antimicrobiano, utilizando estes agentes, foi feito para determinar se os peptídeos geram o estresse oxidativo nas leveduras e se este é um dos fatores que leva à morte das mesmas.

Inicialmente, foram feitos os ensaios com ácido ascórbico. Como resultado, foi possível observar que *C. tropicalis*, quando incubada com este composto, teve a morte induzida por RR inibida, ou seja, as células foram protegidas da morte (**Figura 19A**). No entanto, o ácido ascórbico não protegeu *C. albicans* da ação do peptídeo WR (**Figura 19B**). Este resultado poderia indicar que RR induz a produção de ROS e WR não. Ou ainda, o ácido ascórbico não é capaz de agir como antioxidante de ROS em células de *C. albicans*. Sendo assim, foi testado outro agente antioxidante, a NAC. Como resultado, podemos observar que este antioxidante não protegeu *C. tropicalis* da ação tóxica de RR (**Figura 19A**) nem *C. albicans* de WR (**Figura 19B**).

(A) *Candida tropicalis* (6 h)



(B) *Candida albicans* (1 h)

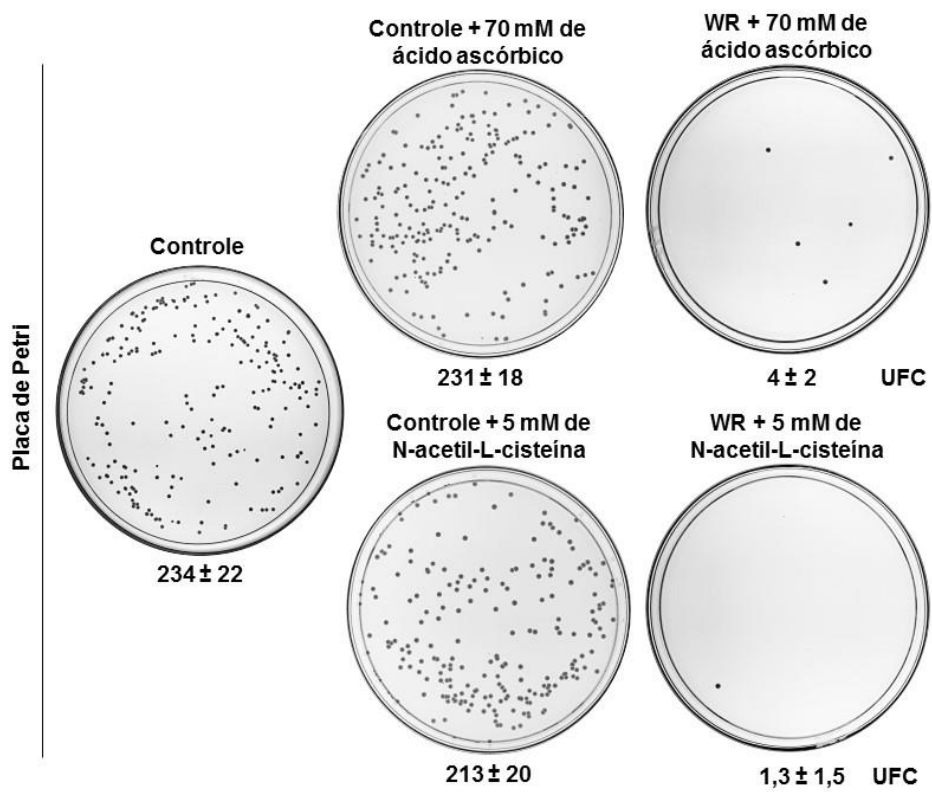


Figura 19: Relação entre o estresse oxidativo e a morte de *C. tropicalis* (A) e *C. albicans* (B) induzida pelos peptídeos RR e WR, respectivamente. A proteção conferida pelo antioxidante está destacada em vermelho. UFC = Médias com desvio padrão das unidades formadoras de colônias. (-) = Número excessivo de colônias crescidas que impediu a contagem de colônias. A imagem é representativa de um ensaio independente de três.

4.7.3 Análise da Atividade Antifúngica dos Peptídeos sobre um Número maior de Células

As análises de mecanismo de ação por microscopia óptica necessitam de um número maior de células, para permitir a visualização destas. Sendo assim, um ensaio antimicrobiano utilizando 40.000 células/mL foi feito para determinarmos a toxicidade de RR e WR sobre um número maior de células de *C. tropicalis* e *C. albicans*, respectivamente.

Como resultado, podemos observar que RR e WR, na concentração da DL₁₀₀, mantiveram sua toxicidade sobre as leveduras, causando a perda quase total da viabilidade das células de *C. tropicalis* e *C. albicans* após 1 e 6 h de tratamento, respectivamente (**Figura 20**).

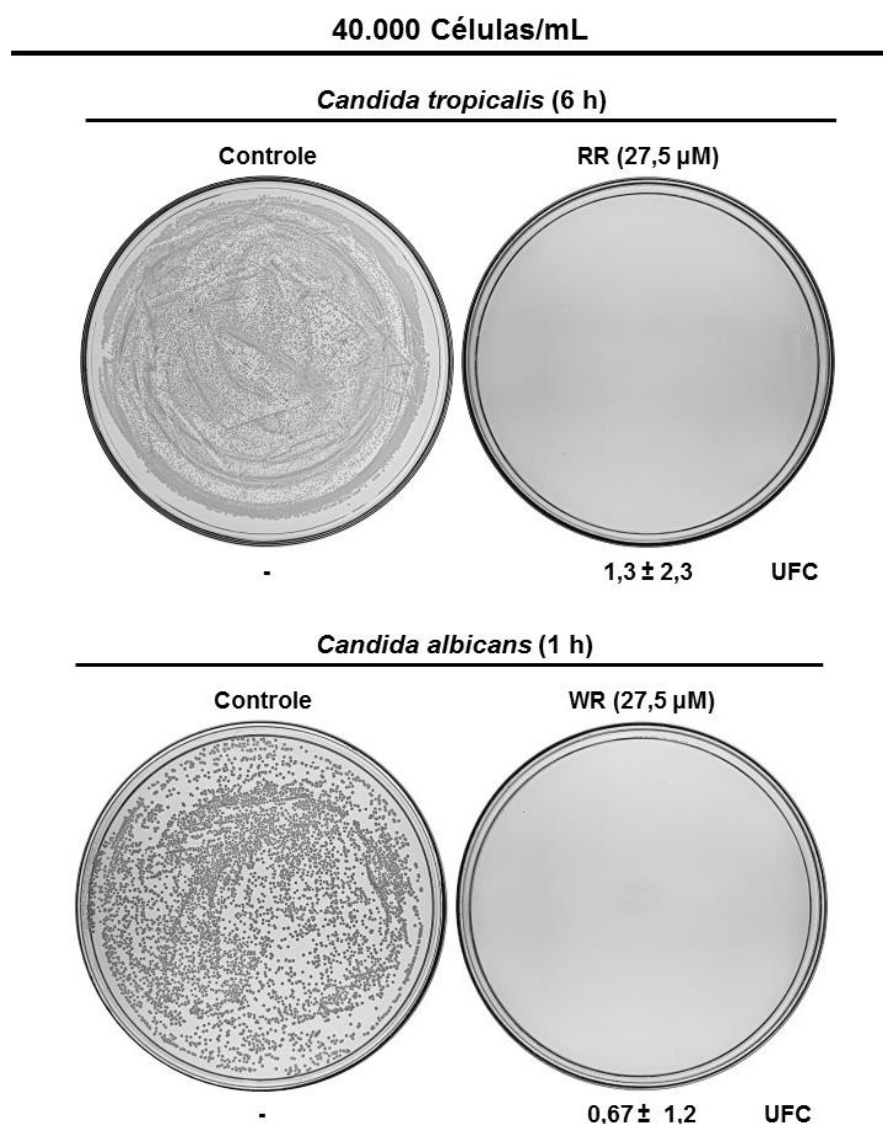


Figura 20: Determinação da viabilidade celular de *C. tropicalis* e *C. albicans* na ausência (controle) e na presença de RR e WR, respectivamente. Note que, mesmo com um número maior de células, os peptídeos mantiveram suas atividades sobre as leveduras. UFC = Médias com desvio padrão das unidades formadoras de colônias. (-) = Número excessivo de colônias crescidas que impediu a contagem de colônias. A imagem é representativa de um ensaio independente em triplicata.

4.7.4 Alterações Citoplasmáticas das Células de Leveduras após Tratamento com os Peptídeos Desenhados

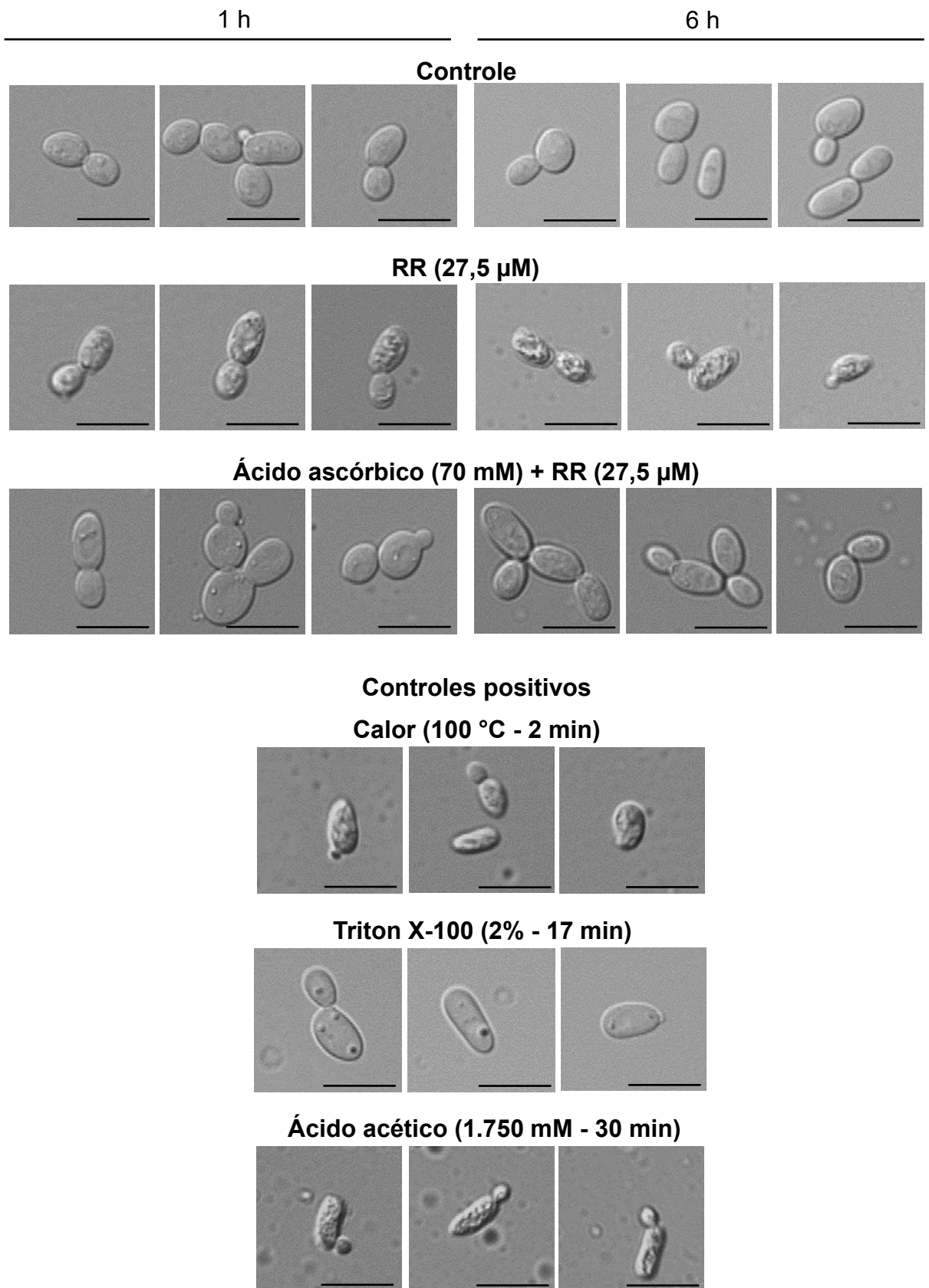
Ao iniciar os ensaios de microscopia óptica, notamos que as leveduras, após tratamento com os peptídeos, apresentavam alterações morfológicas, não visíveis nas células controles. Os citoplasmas de *C. tropicalis*, após 1 e 6 h de incubação com RR,

e *C. albicans*, após 1 h de incubação com WR, estavam com aspecto granulado e/ou vacuolizado (**Figura 21**). Esta granulosidade do citoplasma também foi observada nos controles positivos, principalmente os de ácido acético e calor. Outra característica interessante que foi observada nas células tratadas foi um encolhimento das células em relação ao controle (**Figura 21**).

Além disso, é interessante notar que as células de *C. tropicalis* tratadas com RR e ácido ascórbico não apresentaram alterações estruturais (**Figura 21A**), sugerindo que ROS esteja participando deste processo. Nos ensaios de microscopia óptica, não foi feito o teste de *C. albicans* tratada com WR e um agente antioxidante, porque no ensaio realizado anteriormente (**item 4.7.2**) não houve proteção destas leveduras por este agente. Este resultado pode indicar que os peptídeos desenhados estão causando alterações estruturais nas células das leveduras, que devem ser melhor investigadas por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.

(A)

Candida tropicalis



(B) *Candida albicans* (1 h)

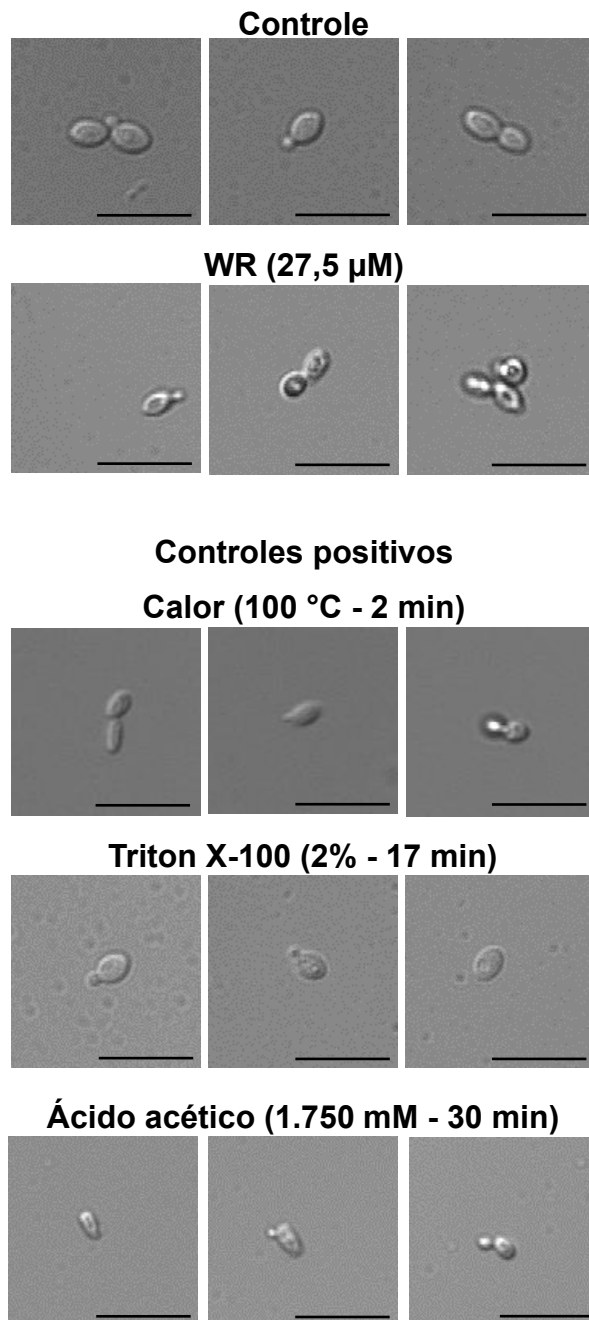


Figura 21: Imagens de microscopia óptica das células de *C. tropicalis* (A) e *C. albicans* (B) na ausência (controle) e na presença de RR e WR, respectivamente. Note a granulosidade/vacuolização do citoplasma das células tratadas com os peptídeos, também visível nos controles positivos. As imagens mostradas são representativas de um experimento independente de três. Barras: 10 µm.

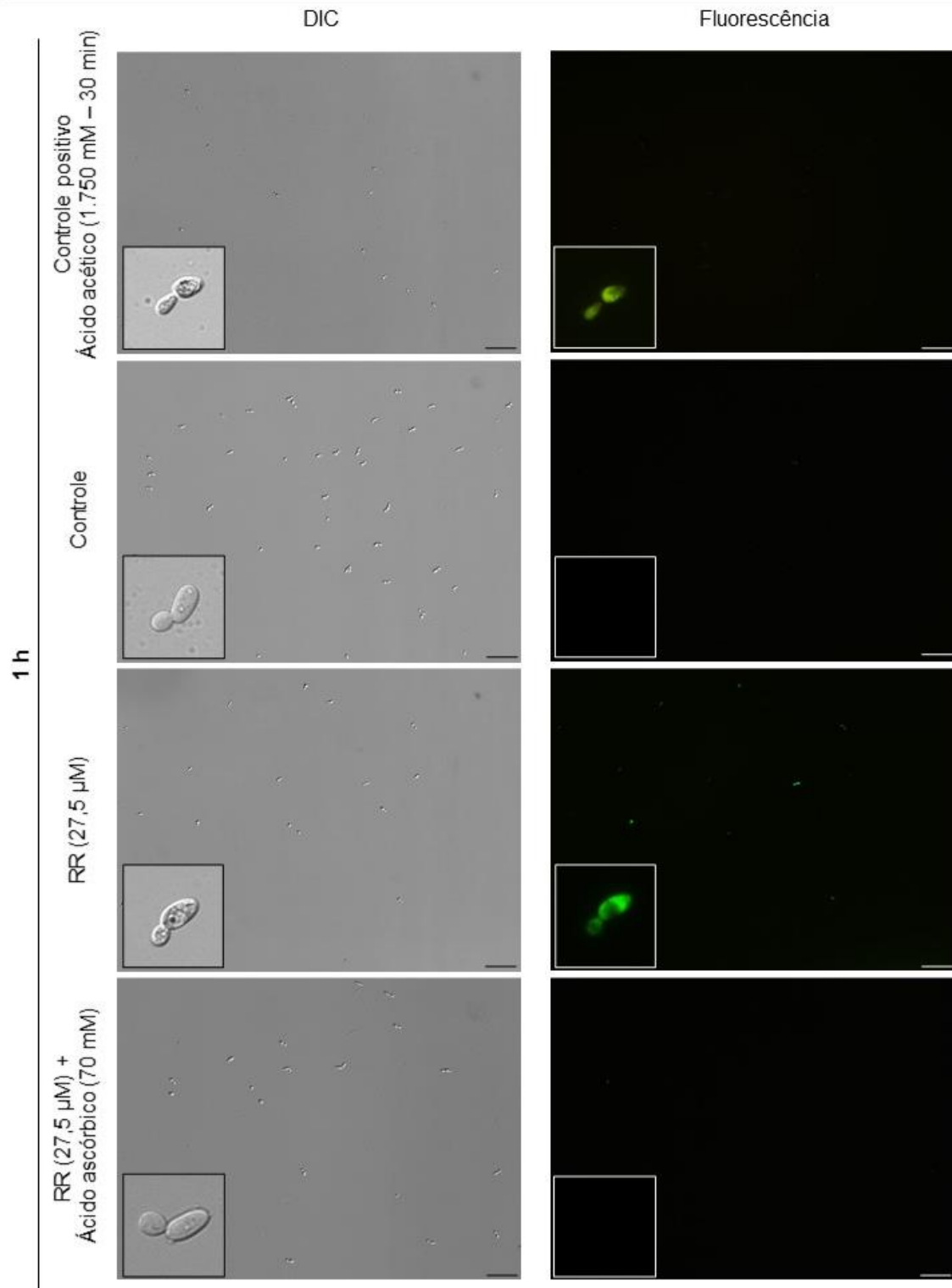
4.7.5 Análise da Ação dos Peptídeos sobre a Produção Endógena de ROS

A produção de ROS pode ser uma consequência da ação dos peptídeos nas células das leveduras. Quando os ensaios antimicrobianos foram realizados na presença de um agente antioxidante, foi possível observar a proteção da levedura (**item 4.7.2**) assim como nos ensaios de microscopia óptica, onde é observada uma reversão dos efeitos citoplasmáticos gerados pelos peptídeos (**item 4.7.4**). Sendo assim, para identificarmos a presença de ROS intracelular, foi feita a análise por microscopia de fluorescência usando a sonda H₂DCFDA. Nossa intenção foi identificar se há a produção de ROS logo no início do contato entre a levedura e o peptídeo. Por esse motivo, incubamos *C. tropicalis* por 1 h e *C. albicans* por 20 min.

Quando as células de *C. tropicalis* foram incubadas com o peptídeo RR por 1 h, 80,5% da população estava fluorescente, indicando que estas células apresentavam estresse oxidativo. Além disso, pode-se observar em DIC, que houve uma redução de células por campo, de 58 no controle para 33 quando incubado com RR, indicando mais uma vez o efeito tóxico do peptídeo. Quando *C. tropicalis* foi incubada com RR e o ácido ascórbico, agente antioxidante que a protegeu no ensaio anterior (**Figura 19A**), pode-se observar que apenas 21,7% das células estavam fluorescentes. Este resultado indica que há uma diminuição da produção de ROS e uma proteção das leveduras da morte (**Figura 22**).

(A)

Candida tropicalis



(B)

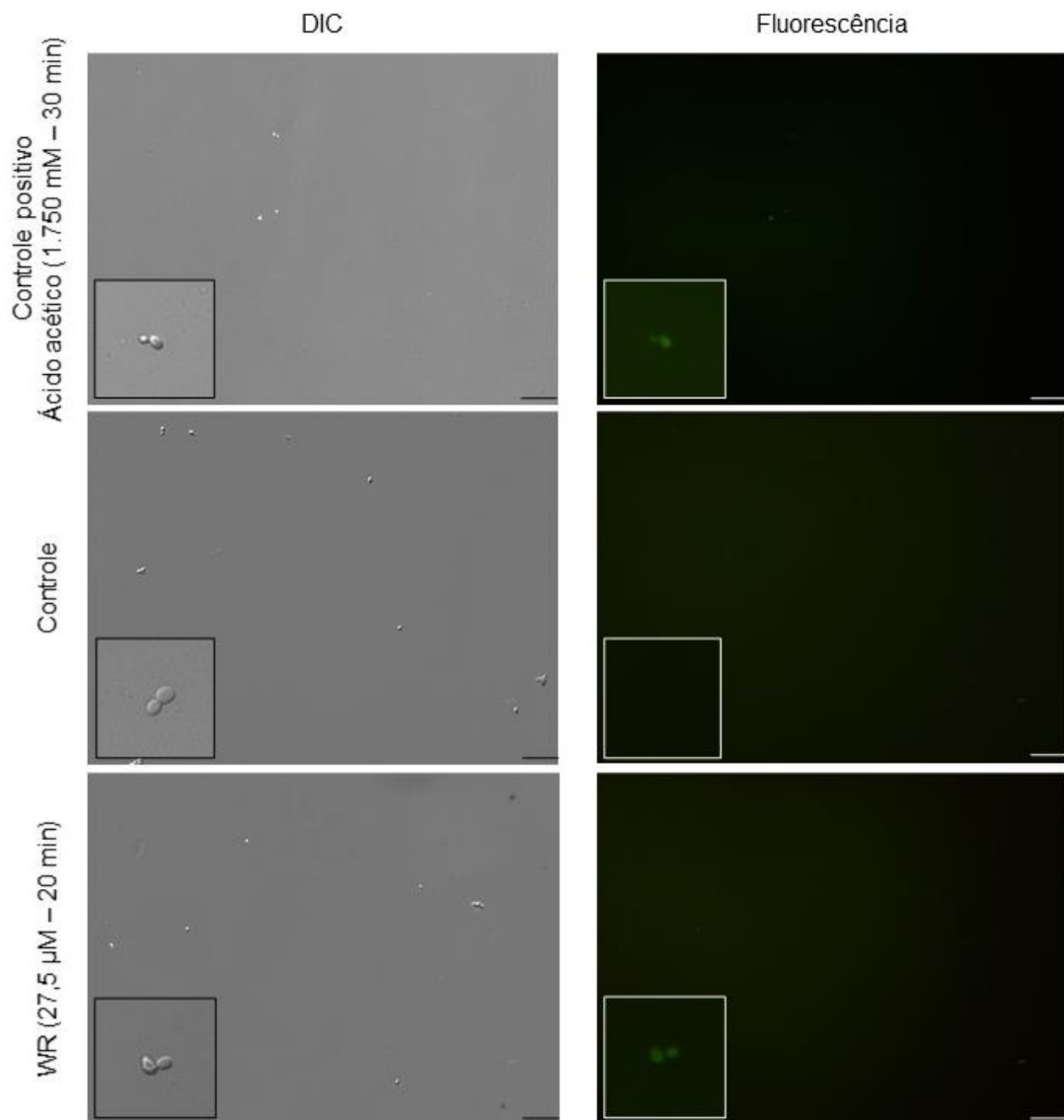
Amostras	Número de campos contados	Número de células em DIC	Número de células fluorescentes	Porcentagem (%) de células com estresse oxidativo
Controle positivo (Ácido acético)	11	19,90 ± 7,12	18,00 ± 7,12 ^a	90,4
Controle	4	58,00 ± 32,97	1,5 ± 1,0 ^b	2,6
<i>C. tropicalis</i> + RR	7	33 ± 5,65	26,57 ± 4,64 ^a	80,5
<i>C. tropicalis</i> + RR + ácido ascórbico	8	23,00 ± 5,34	5 ± 3,54 ^b	21,7

Figura 22: Produção de ROS em *C. tropicalis* tratada com RR. **(A)** A fluorescência verde indica a presença de ROS. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência, todas nos mesmos tempos de exposição. A imagem dentro da caixa mostra detalhes das células e da fluorescência em um aumento de 630x. Barras: 50 µm. **(B)** Número de células com estresse oxidativo, determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. As imagens mostradas são representativas de um experimento independente de três.

Quando *C. albicans* foi incubada com o peptídeo WR por 20 min, 98,8% da população estava fluorescente, indicando a produção de ROS por estas células. Vale ressaltar que o sinal fluorescente emitido pela levedura estava fraco, talvez pela baixa produção de ROS (**Figura 23**).

(A)

Candida albicans



(B)

Amostras	Número de campos contados	Número de células em DIC	Número de células fluorescentes	Porcentagem (%) de células com estresse oxidativo
Controle positivo (Ácido acético)	12	3,42 ± 1,78	3,25 ± 1,60 ^a	95
Controle	12	9,33 ± 2,10	1,25 ± 1,29 ^a	13,4
<i>C. albicans</i> + WR	10	8,60 ± 2,99	8,50 ± 3,10 ^b	98,8

Figura 23: Produção de ROS em *C. albicans* tratada com o peptídeo WR. **(A)** A fluorescência verde indica a presença de ROS. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência, todas nos mesmos tempos de exposição. A imagem dentro da caixa mostra detalhes das células e da fluorescência em um aumento de 630x. Barras: 50 µm. **(B)** Número de células com estresse oxidativo, determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. As imagens mostradas são representativas de um experimento independente de três.

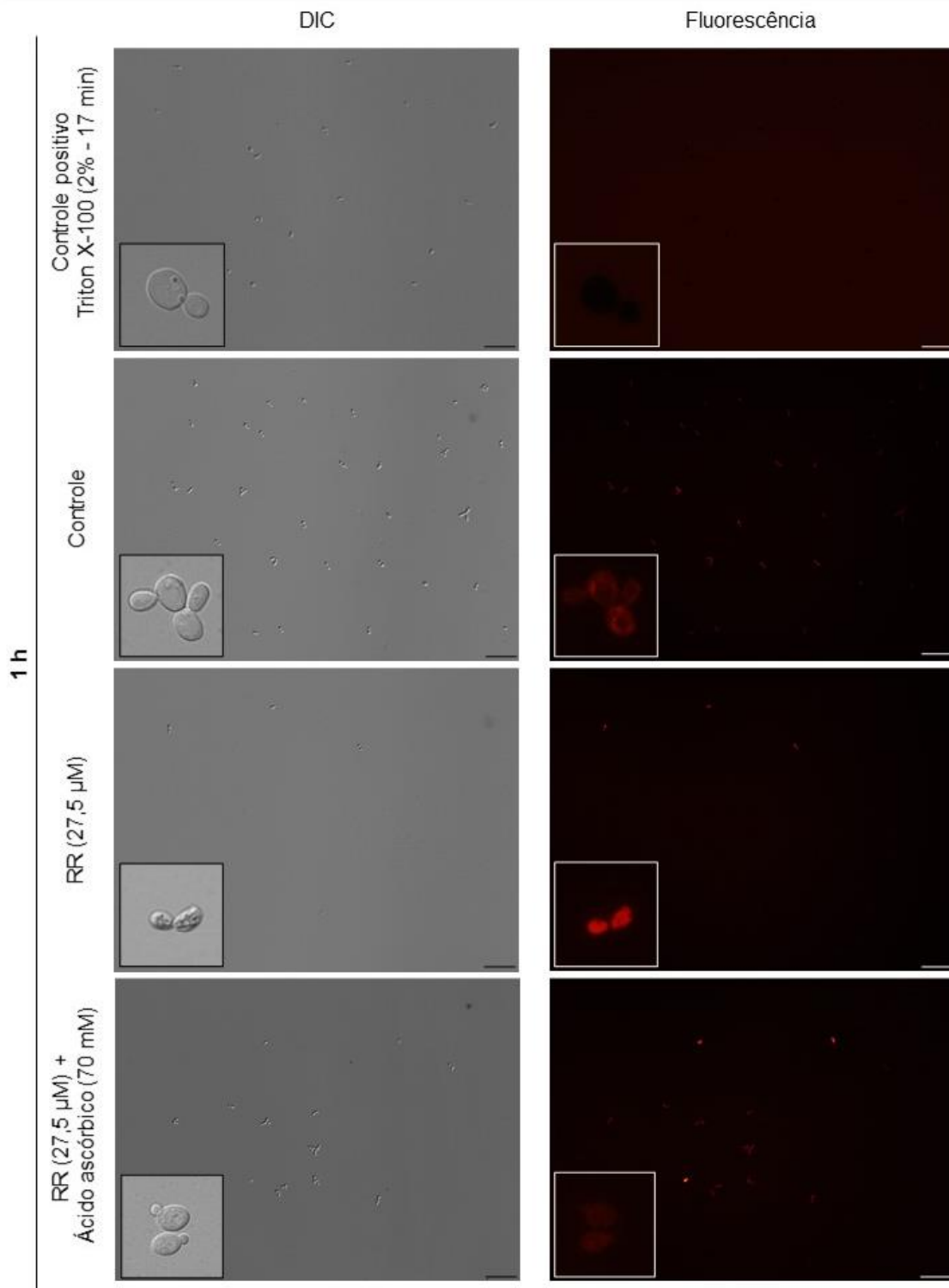
4.7.6 Análise da Funcionalidade Mitocondrial

A produção de ROS identificada nas leveduras após o tratamento com os peptídeos, nos levou a analisar a funcionalidade mitocondrial. Como a mitocôndria é a principal fonte de ROS intracelular, decidimos analisar esta organela e para isso usamos a sonda de potencial de membrana Rodamina 123. Este ensaio foi feito em dois tempos, no início e no final do contato com o peptídeo.

Quando tratamos *C. tropicalis* por 1 h com RR, observamos que não há diferença na porcentagem de células fluorescentes entre o controle e o tratado, em ambos os casos 100% das células estavam com o potencial de membrana ativo (**Figura 24**). No entanto, pode ser observado uma marcação fluorescente mais forte e mais difusa no tratado quando comparado ao controle ou ao tratado com ácido ascórbico (**Figura 24A**). Vale ressaltar que a densidade celular, observada em DIC, é maior no controle e no controle positivo quando comparado ao tratado.

(A)

Candida tropicalis



(B)

Amostras	Número de campos contados	Número de células em DIC	Número de células fluorescentes	Porcentagem (%) de células com mitocôndrias ativas
Controle positivo (Triton X-100)	13	16,08 ± 4,41	1,69 ± 1,38 ^c	10,5
Controle	4	54,0 ± 24,99	54,0 ± 24,99 ^b	100
<i>C. tropicalis</i> + RR	9	24,33 ± 10,72	24,33 ± 24,33 ^a	100
<i>C. tropicalis</i> + RR + ácido ascórbico	5	46,60 ± 13,13	45,40 ± 11,55 ^b	97,4

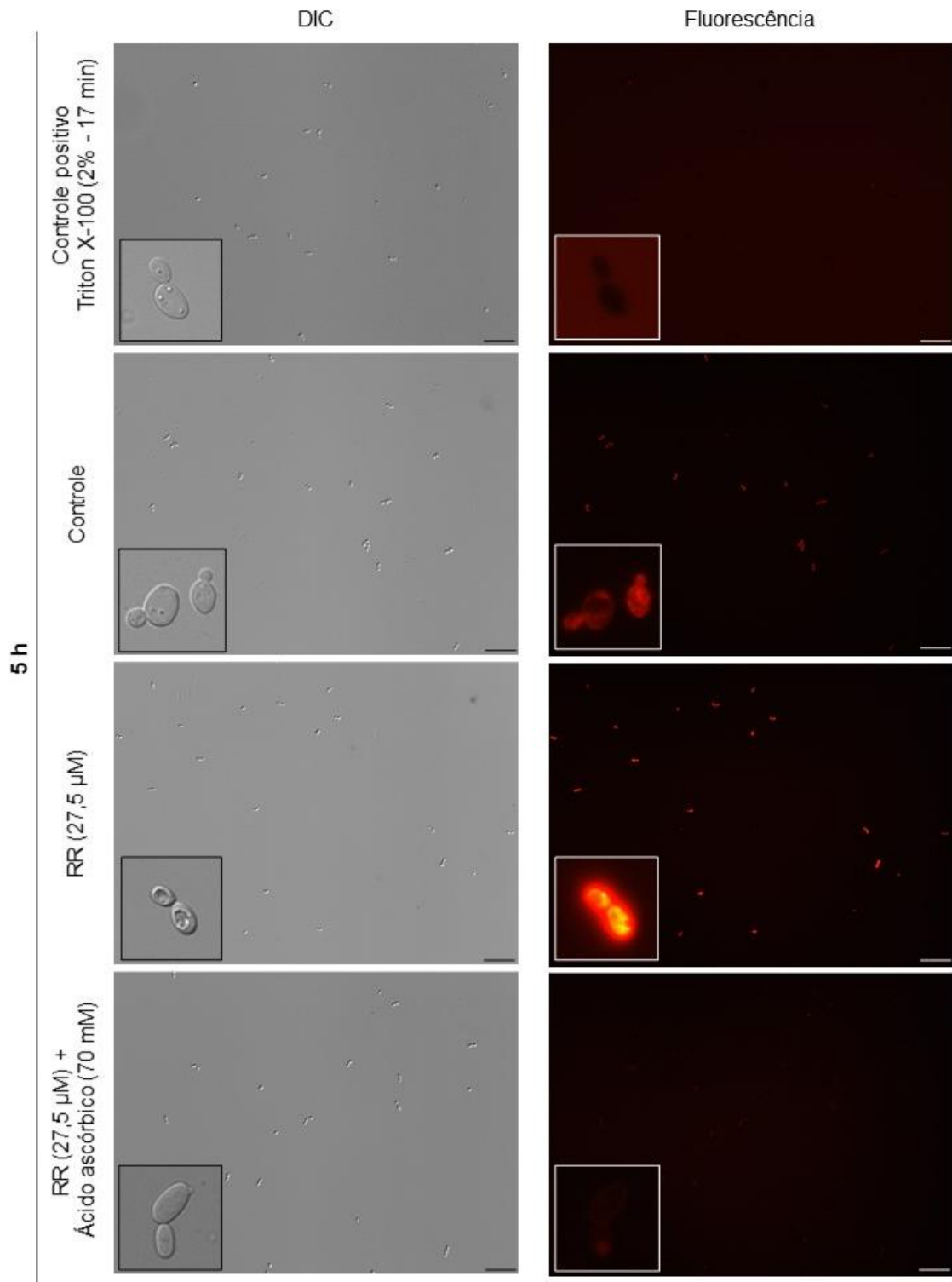
Figura 24: Funcionalidade mitocondrial de *C. tropicalis* tratada com RR por 1 h. **(A)** A fluorescência vermelha indica o potencial de membrana mitocondrial. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência, todas nos mesmos tempos de exposição. A imagem dentro da caixa mostra detalhes das células e da fluorescência em um aumento de 630x. Barras: 50 µm. **(B)** Número de células com mitocôndrias ativas, determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. As imagens mostradas são representativas de um experimento independente de três.

Quando tratamos *C. tropicalis* por 5 h com o peptídeo RR, observamos que não há diferença na porcentagem de células fluorescentes entre o controle e o tratado, em ambos os casos 100% das células estavam fluorescentes (**Figura 25**). No entanto, pode ser observado uma marcação fluorescente mais forte e mais difusa no tratado quando comparado ao controle ou ao tratado com ácido ascórbico. Observa-se ainda que este sinal é ainda mais forte do que aquele observado após 1 h de incubação (**Figura 25A**).

Como os ensaios foram feitos em dias diferentes (1 e 5 h), os parâmetros de ajuste do microscópio também foram diferentes. Por esse motivo, decidimos manter as imagens separadas (**Figura 24** e **Figura 25**).

(A)

Candida tropicalis



(B)

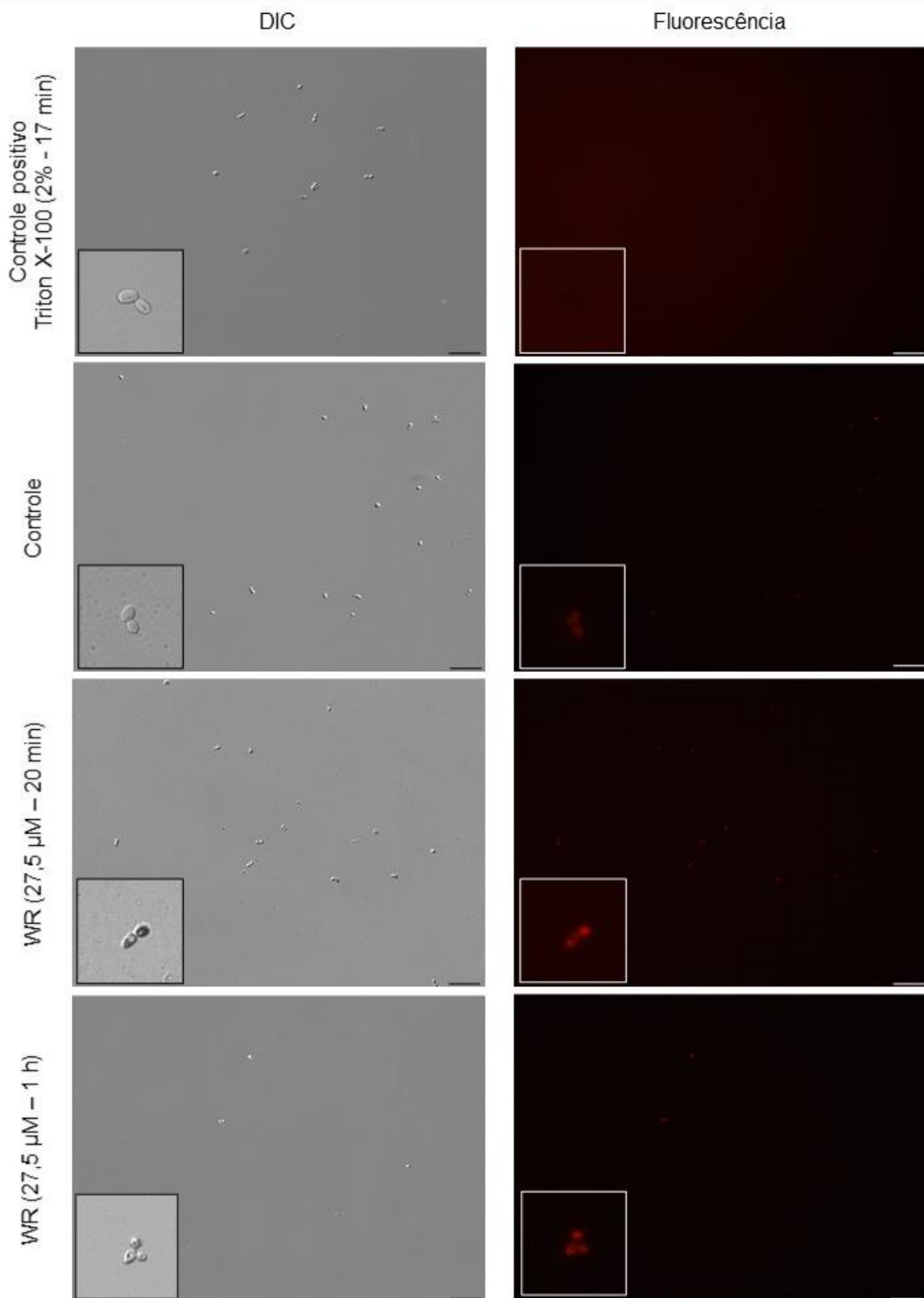
Amostras	Número de campos contados	Número de células em DIC	Número de células fluorescentes	Porcentagem (%) de células com mitocôndrias ativas
Controle positivo (Triton X-100)	4	55,0 ± 8,12	2,0 ± 1,83 ^a	3,6
Controle	4	54,50 ± 19,74	54,50 ± 19,74 ^b	100
<i>C. tropicalis</i> + RR	7	3,0 ± 1,96	3,0 ± 1,96 ^a	100
<i>C. tropicalis</i> + RR + ácido ascórbico	4	53,0 ± 5,35	49,50 ± 9,0 ^b	93,4

Figura 25: Funcionalidade mitocondrial de *C. tropicalis* tratada com RR por 5 h. **(A)** A fluorescência vermelha indica o potencial de membrana mitocondrial. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência, todas nos mesmos tempos de exposição. A imagem dentro da caixa mostra detalhes das células e da fluorescência em um aumento de 630x. Barras: 50 µm. **(B)** Número de células com mitocôndrias ativas, determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. As imagens mostradas são representativas de um experimento independente de três.

Quando tratamos *C. albicans* por 20 min ou 1 h com WR, observamos que não há diferença significativa na quantidade de células fluorescentes entre o controle e o tratado (**Figura 26**). No entanto, pode ser observado uma marcação fluorescente levemente mais forte no tratado quando comparado ao controle (**Figura 26A**). Além disso, também foi possível observar em DIC uma queda na densidade celular após 1 h (**Figura 26B**).

Candida albicans

(A)



(B)

Amostras	Número de campos contados	Número de células em DIC	Número de células fluorescentes	Porcentagem (%) de células com mitocôndrias ativas
Controle positivo (Triton X-100)	13	12,08 ± 4,27	0 ± 0 ^a	0
Controle	12	18,75 ± 5,71	18,08 ± 4,87 ^b	96,4
<i>C. albicans</i> + WR (20 min)	10	18,10 ± 7,81	16,60 ± 8,09 ^b	91,7
<i>C. albicans</i> + WR (1 h)	10	3,50 ± 2,17	3,50 ± 2,17 ^a	100

Figura 26: Funcionalidade mitocondrial de *C. albicans* tratada com WR por 20 min e 1 h. **(A)** A fluorescência vermelha indica o potencial de membrana mitocondrial. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência, todas nos mesmos tempos de exposição. A imagem dentro da caixa mostra detalhes das células e da fluorescência em um aumento de 630x. Barras: 50 µm. **(B)** Número de células com mitocôndrias ativas, determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. As imagens mostradas são representativas de um experimento independente de três.

4.7.7 Análise da Ação dos Peptídeos sobre a Permeabilização de Membrana Plasmática

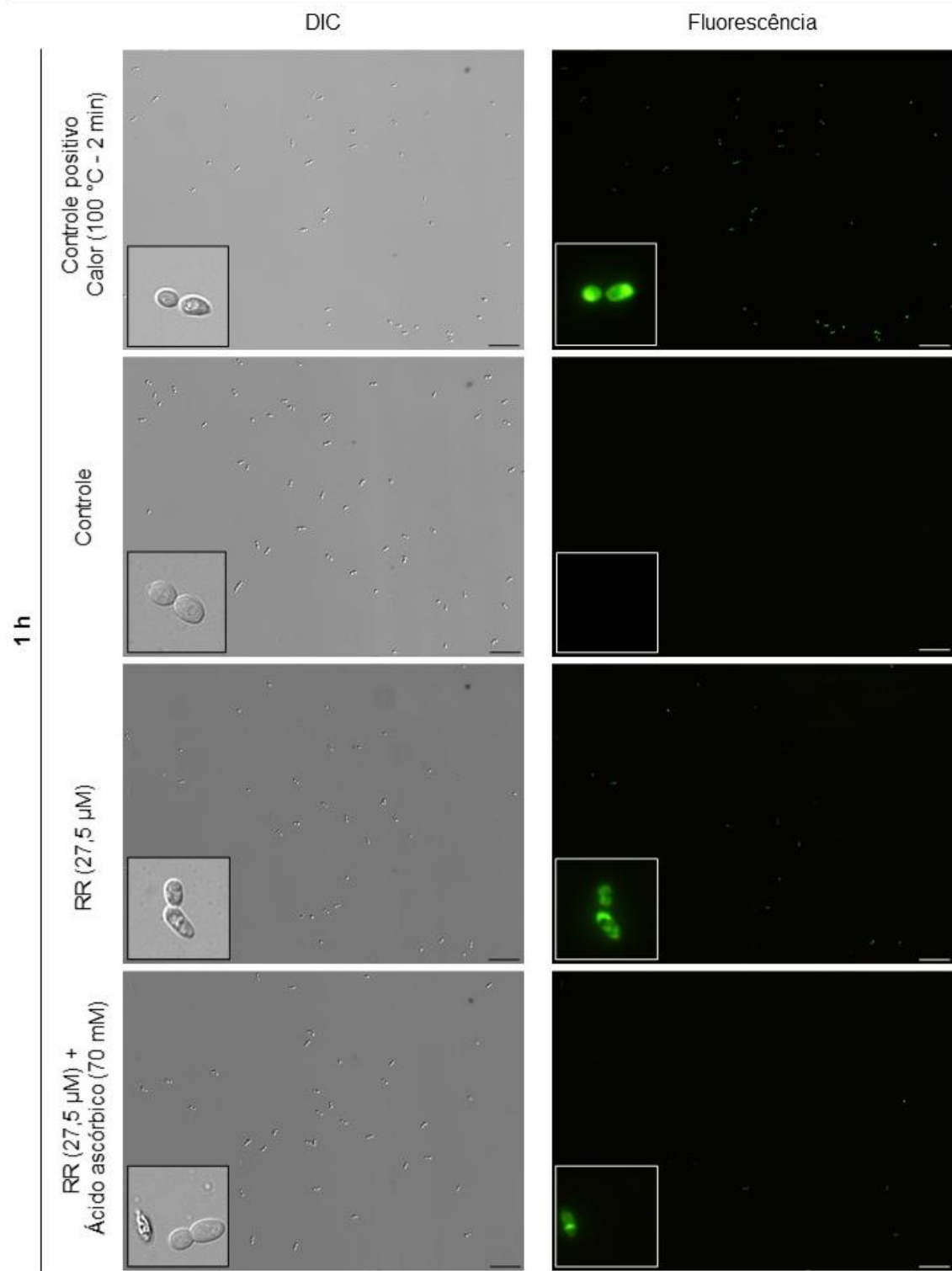
Para verificarmos se os peptídeos RR e WR causam a permeabilização das membranas plasmáticas de *C. tropicalis* e *C. albicans*, respectivamente, usamos a sonda fluorescente Sytox Green. Além disso, usamos ácido ascórbico nos testes com *C. tropicalis* e RR, para avaliarmos o possível envolvimento da produção de ROS na permeabilização de membrana plasmática desta levedura. A fim de identificar se há permeabilização logo no início do contato entre a levedura e o peptídeo, as leveduras *C. tropicalis* e *C. albicans* foram incubadas com os peptídeos RR e WR por 1 h e 20 min, respectivamente.

O sinal fluorescente emitido pelas células de *C. tropicalis* tratadas com RR, indicou que houve a permeabilização de 80,5% células (**Figura 27**) já em 1 h de

incubação. Também foi possível observar em DIC, a redução de células por campos quando comparamos o controle (58,77) com o tratado (33). Já na presença do ácido ascórbico, o tratamento com peptídeo RR também levou a uma redução do número de células (27,13) quando comparado ao controle, mas apenas 14,7% das células de *C. tropicalis* estavam permeabilizadas (**Figura 27B**). Este resultado pode indicar que a permeabilização celular de *C. tropicalis* é um evento dependente de ROS e não uma ação direta de RR.

(A)

Candida tropicalis



(B)

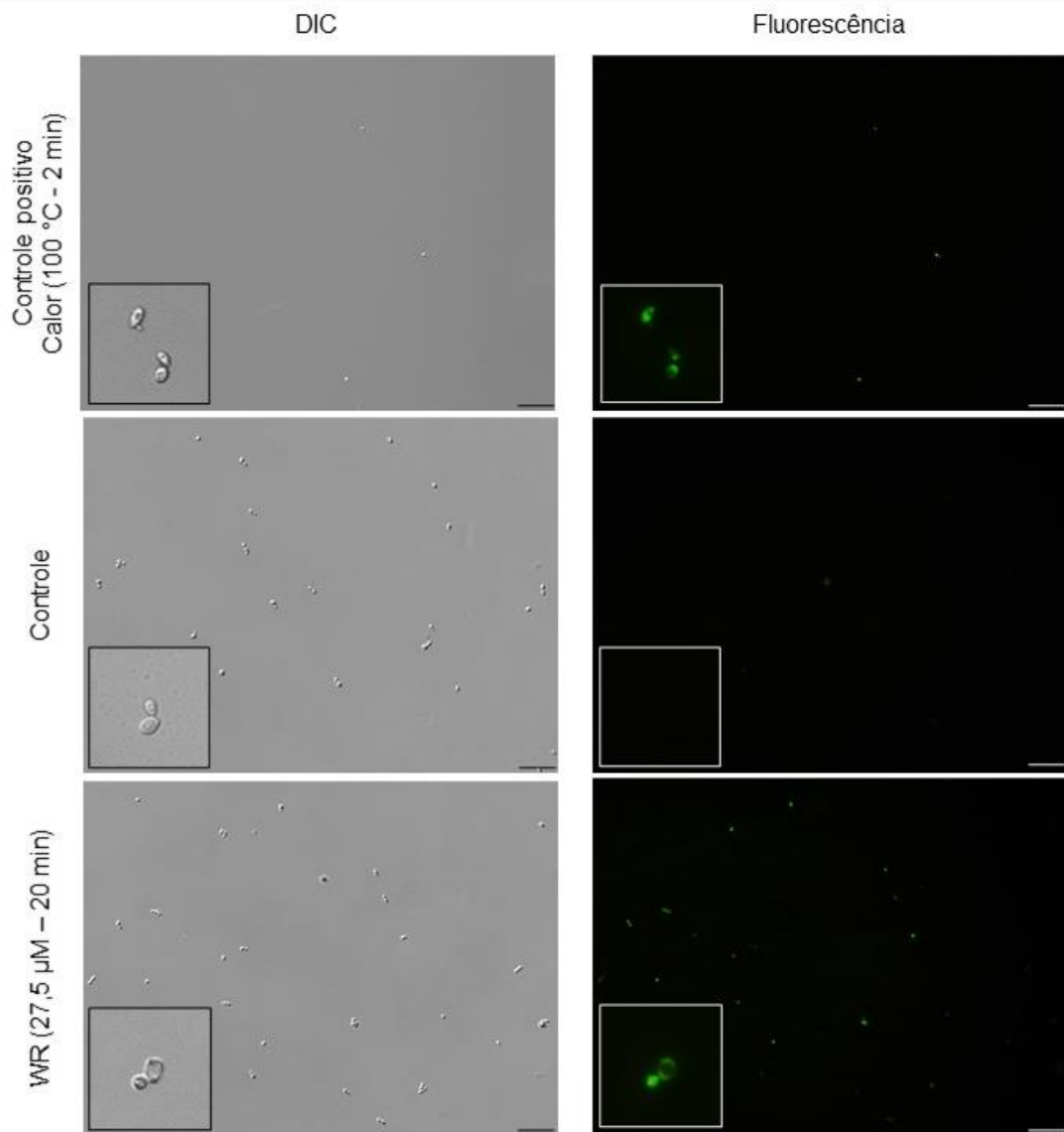
Amostras	Campos contados	Número de células em DIC	Número de células fluorescentes	Porcentagem (%) de células permeabilizadas
Controle positivo (Calor)	7	32,14 ± 12,14	31,43 ± 12,23 ^a	97,8
Controle	4	58,75 ± 7,6	2,25 ± 1,26 ^b	3,8
<i>C. tropicalis</i> + RR	7	33 ± 5,5	26,57 ± 4,54 ^a	80,5
<i>C. tropicalis</i> + RR + ácido ascórbico	8	27,13 ± 23,23	4 ± 2,62 ^b	14,7

Figura 27: Permeabilização de membrana plasmática de *C. tropicalis* tratada com RR. **(A)** A fluorescência verde indica a permeabilização de membrana. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência, todas nos mesmos tempos de exposição. A imagem dentro da caixa mostra detalhes das células e da fluorescência em um aumento de 630x. Barras: 50 µm. **(B)** Número de células permeabilizadas determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. As imagens mostradas são representativas de um experimento independente de três.

Quando tratamos as células de *C. albicans* com WR por 20 min, observamos a permeabilização da membrana plasmática de 89,5% das leveduras (**Figura 28**).

(A)

Candida albicans



(B)

Amostras	Número de campos contados	Número de células em DIC	Número de células fluorescentes	Porcentagem (%) de células permeabilizadas
Controle positivo (Calor)	10	8,6 ± 2,01	8,6 ± 1,78 ^{ab}	100
Controle	9	25,44 ± 4,13	0,33 ± 0,70 ^b	1,3
<i>C. albicans</i> + WR	9	16,89 ± 10,43	15,11 ± 11,01 ^a	89,5

Figura 28: Permeabilização de membrana plasmática de *C. albicans* tratada com WR. **(A)** A fluorescência verde indica a permeabilização de membrana. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência, todas nos mesmos tempos de exposição. A imagem dentro da caixa mostra detalhes das células e da fluorescência em um aumento de 630x. Barras: 50 µm. **(B)** Número de células permeabilizadas determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. As imagens mostradas são representativas de um experimento independente de três.

4.7.8 Análise da Atividade de Caspases na Ação dos Peptídeos Desenhados

Para determinar se os peptídeos desenhados induzem a ativação de caspases nas leveduras, foi feito um ensaio antimicrobiano utilizando o inibidor de caspases Z-VAD-FMK. Este composto entra nas células e se liga irreversivelmente ao sítio catalítico das caspases, inativando-as. Como resultado, pode-se observar que a adição de 50 µM do inibidor de caspases no ensaio antifúngico não protegeu as leveduras da ação dos peptídeos (**Figura 29**), indicando que estas proteases não estão envolvidas na via de morte. Portanto, este resultado pode indicar que a via de morte ativada pelos peptídeos nas leveduras não é a apoptose.

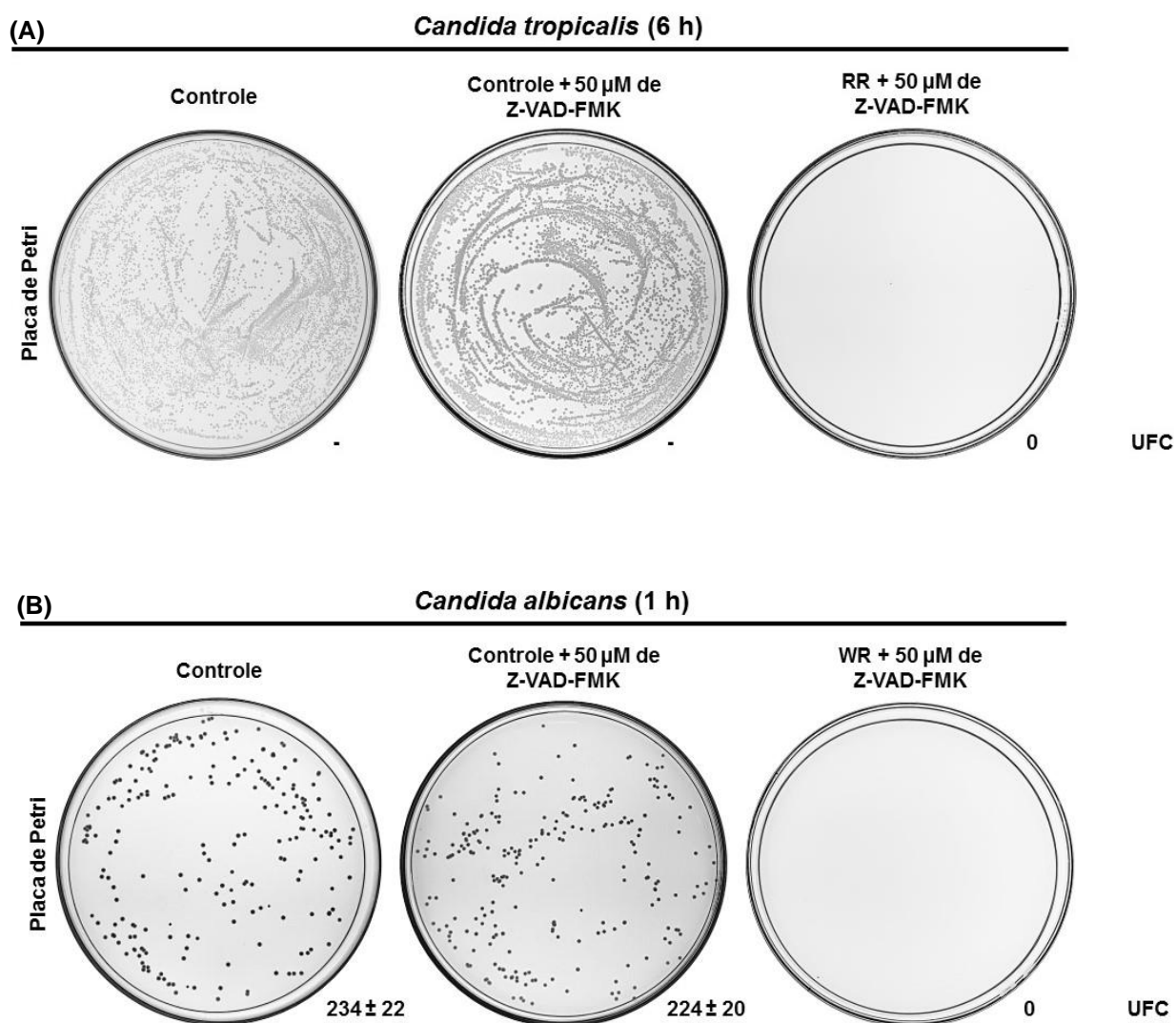


Figura 29: Análise do envolvimento de caspases na morte de *C. tropicalis* **(A)** e *C. albicans* **(B)** induzida pelos peptídeos RR e WR, respectivamente. Note que a adição do inibidor de caspases Z-VAD-FMK não protegeu as leveduras. UFC = Médias com desvio padrão das unidades formadoras de colônias. (-) = Número excessivo de colônias crescidas que impediu a contagem de colônias. A imagem é representativa de um ensaio independente de três.

4.7.9 Análise da Via de Necrose

No ensaio anterior, as leveduras não foram protegidas da ação dos peptídeos quando incubadas com o inibidor de caspases Z-VAD-FMK. Este resultado levantou a hipótese de que a via de morte ativada pelos peptídeos nas leveduras não é a

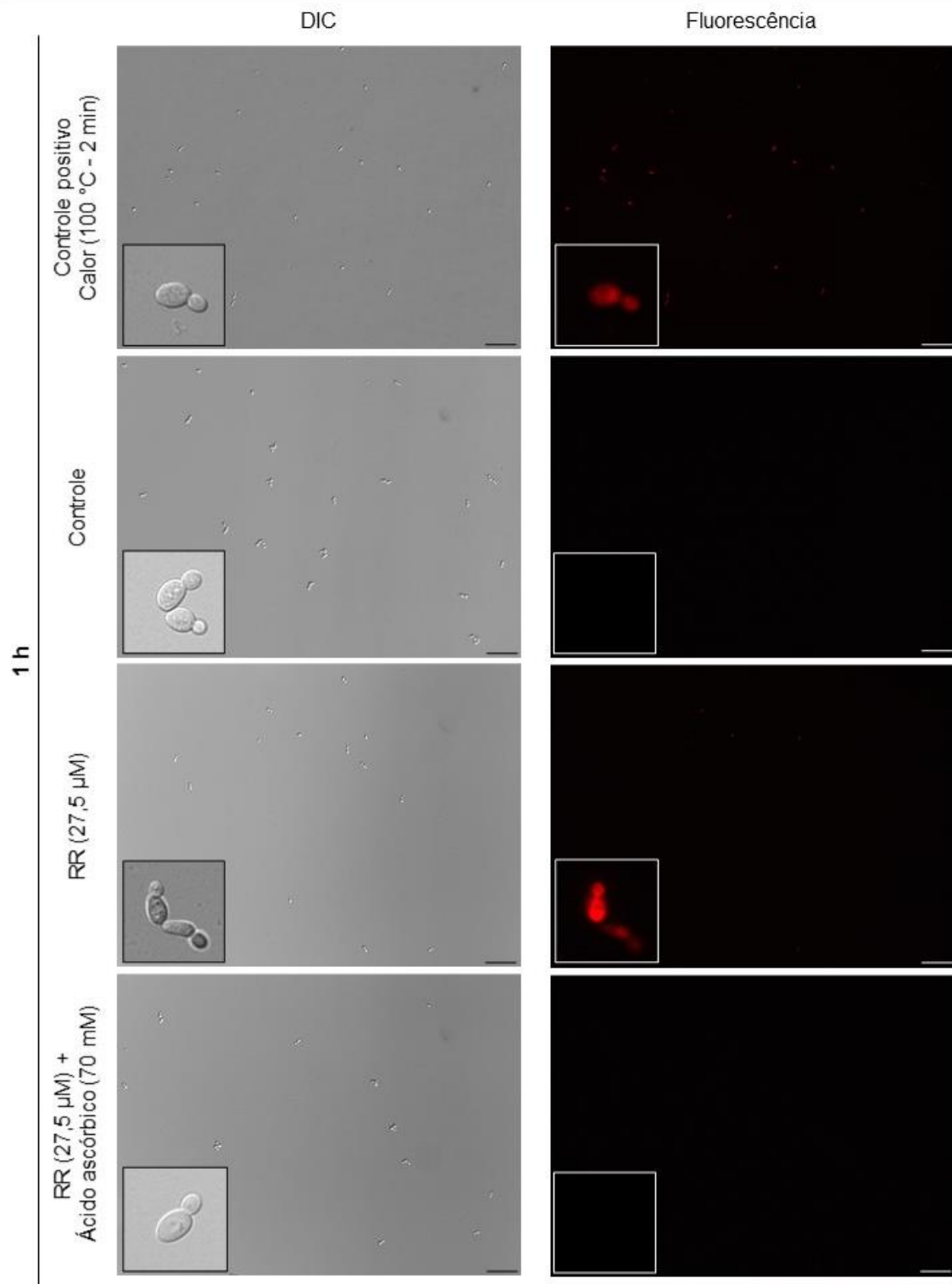
apoptose, podendo ser necrose. Para testarmos esta hipótese, foi feito um ensaio de microscopia de fluorescência com o marcador de necrose IP.

A análise da ativação da via de necrose por *C. tropicalis* tratada com o peptídeo RR, foi feita nos tempos de 1 h e 6 h. Como resultado, podemos observar que após 1 h de tratamento 53,2% das células já apresentavam sinal positivo para o marcador de necrose (**Figura 30**) e, após 6 h, 45,2% (**Figura 31**).

Como os ensaios foram feitos em dias diferentes (1 e 6 h), os parâmetros de ajuste do microscópio também foram diferentes. Por esse motivo, decidimos manter as imagens separadas (**Figura 30 e Figura 31**).

(A)

Candida tropicalis



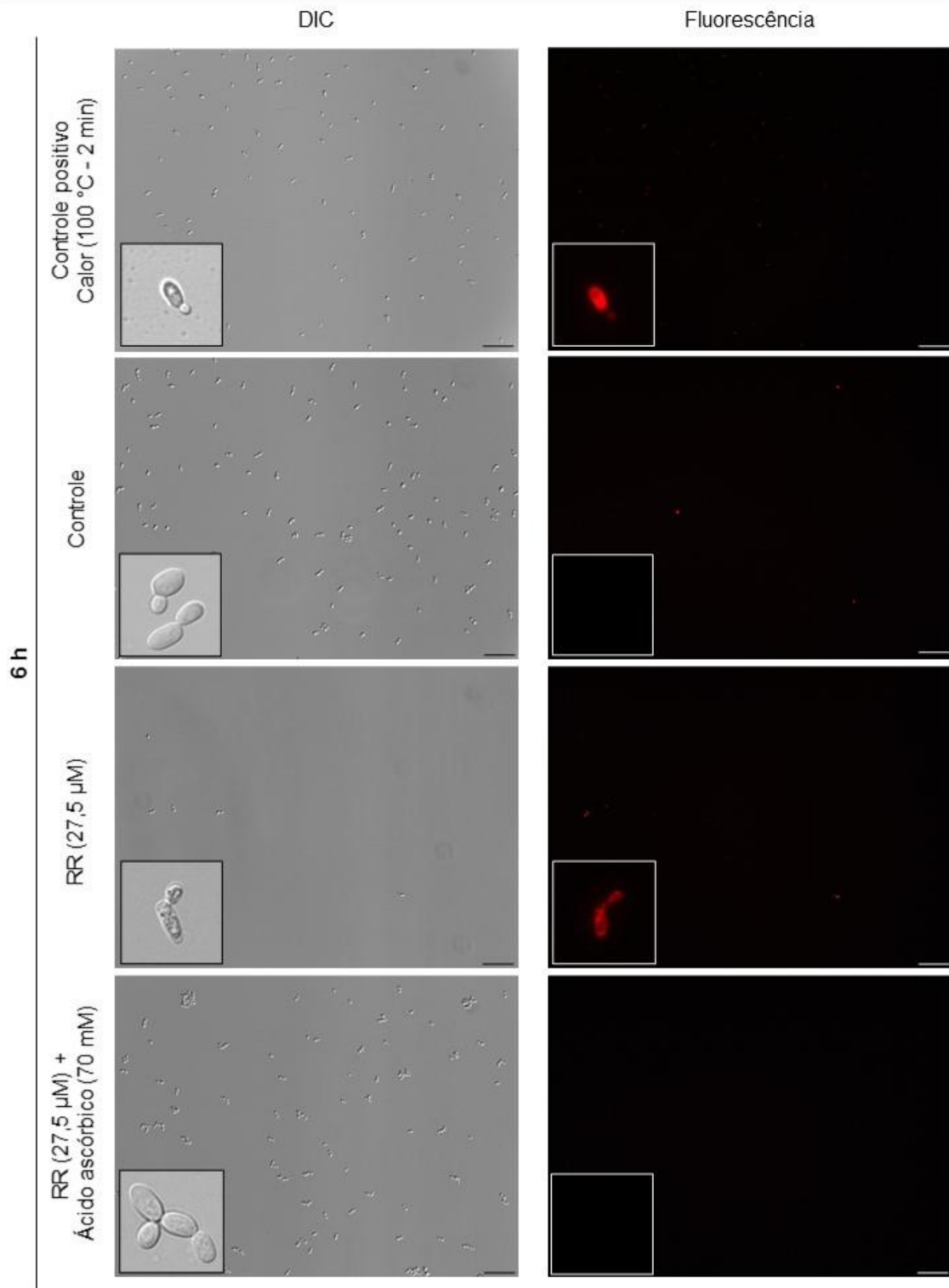
(B)

Amostras	Número de campos contados	Número de células em DIC	Número de células fluorescentes	Porcentagem (%) de células necrosadas
Controle positivo (Calor)	7	29,57 ± 12,26	29,57 ± 12,26 ^a	100
Controle	4	54,25 ± 26,47	0 ± 0 ^b	0
<i>C. tropicalis</i> + RR	10	20,30 ± 5,68	10,80 ± 5,01 ^a	53,2
<i>C. tropicalis</i> + RR + ácido ascórbico	9	22,44 ± 7,84	0,33 ± 0,71 ^b	1,5

Figura 30: Necrose em *C. tropicalis* tratada com RR por 1 h. **(A)** A fluorescência vermelha indica a necrose celular. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência, todas nos mesmos tempos de exposição. A imagem dentro da caixa mostra detalhes das células e da fluorescência em um aumento de 630x. Barras: 50 µm. **(B)** Número de células necrosadas determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. As imagens mostradas são representativas de um experimento independente de três.

(A)

Candida tropicalis



(B)

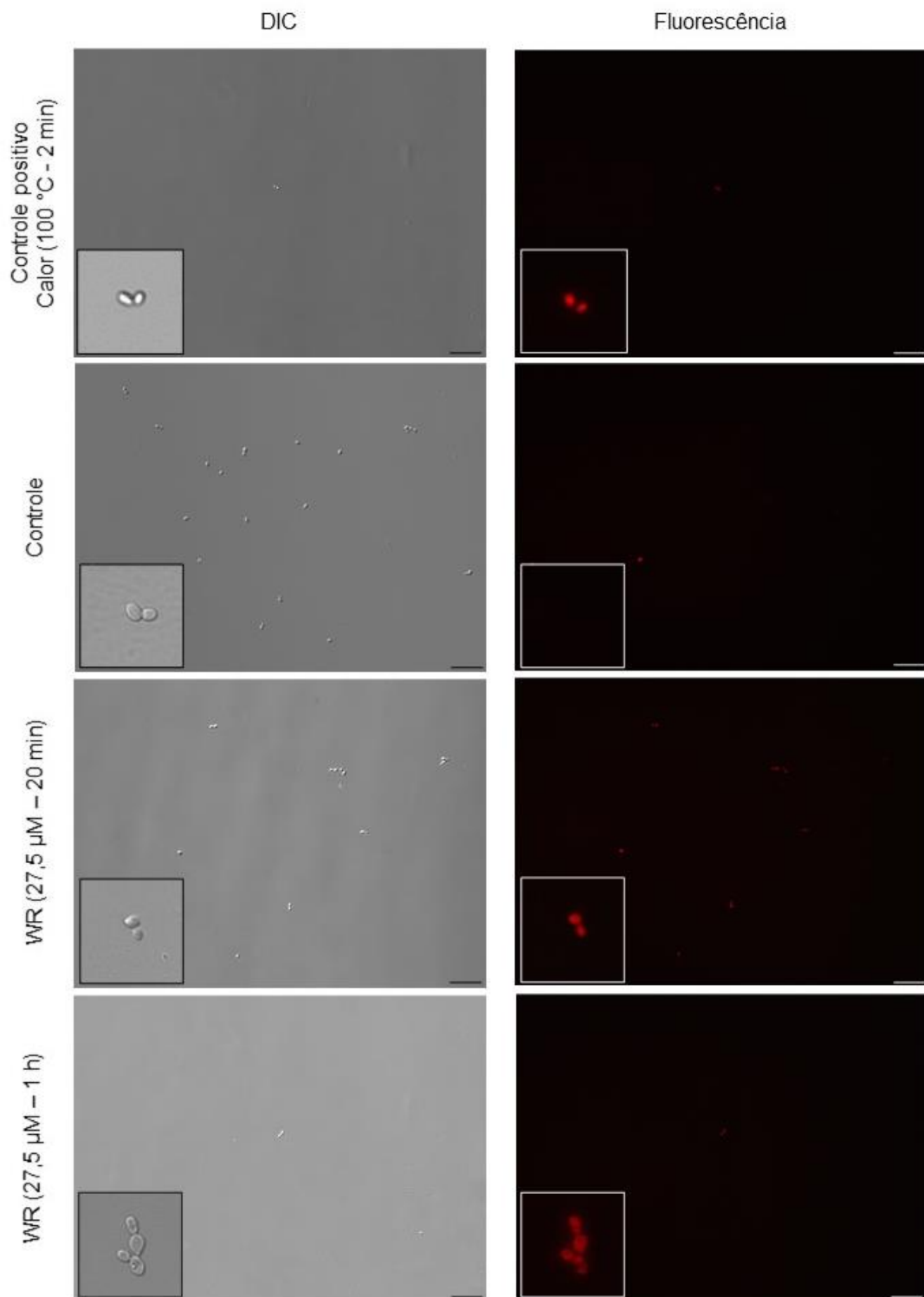
Amostras	Número de campos contados	Número de células em DIC	Número de células fluorescentes	Porcentagem (%) de células necrosadas
Controle positivo (Calor)	2	138,0 ± 42,43	136,0 ± 41,01 ^a	98,6
Controle	2	120,5 ± 21,92	2,5 ± 0,71 ^b	2,1
<i>C. tropicalis</i> + RR	10	6,2 ± 2,78	2,8 ± 2,15 ^b	45,2
<i>C. tropicalis</i> + RR + ácido ascórbico	2	120,5 ± 7,78	3 ± 1,41 ^b	2,5

Figura 31: Necrose em *C. tropicalis* tratada com RR por 6 h. **(A)** A fluorescência vermelha indica a necrose celular. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência, todas nos mesmos tempos de exposição. A imagem dentro da caixa mostra detalhes das células e da fluorescência em um aumento de 630x. Barras: 50 µm. **(B)** Número de células necrosadas determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. As imagens mostradas são representativas de um experimento independente de três.

A análise da ativação da via de necrose por *C. albicans* tratada com o peptídeo WR, foi feita nos tempos de 20 min e 1 h. Como resultado, podemos observar que após 20 min de tratamento 95,9% das células já estavam necrosadas e, após 1 h, 100% **(Figura 32)**.

(A)

Candida albicans



(B)

Amostras	Número de campos contados	Número de células em DIC	Número de células fluorescentes	Porcentagem (%) de células necrosadas
Controle positivo (Calor)	11	8,0 ± 1,34	7,91 ± 1,30 ^b	98,9
Controle	9	24,67 ± 7,09	1,56 ± 1,01 ^a	6,3
<i>C. albicans</i> + WR (20 min)	10	9,70 ± 6,43	9,30 ± 6,52 ^b	95,9
<i>C. albicans</i> + WR (1 h)	9	2,89 ± 2,47	2,89 ± 2,47 ^a	100

Figura 32: Necrose em *C. albicans* tratada com RR por 20 min e 1 h. **(A)** A fluorescência vermelha indica a necrose celular. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência, todas nos mesmos tempos de exposição. A imagem dentro da caixa mostra detalhes das células e da fluorescência em um aumento de 630x. Barras: 50 µm. **(B)** Número de células necrosadas determinadas após contagem de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. As imagens mostradas são representativas de um experimento independente de três.

5. DISCUSSÃO

Em um trabalho realizado anteriormente por Souza e colaboradores (2019), foi visto que o peptídeo DD, derivado do γ -core da defensina *VuDef₁*, na concentração de 18,5 μ M e após 24 h de incubação, foi capaz de inibir em 41% o crescimento de *L. amazonensis*, percentagem de inibição estatisticamente igual a *VuDef₁* inteira. Este resultado mostra que a atividade inibitória sobre *L. amazonensis* da *VuDef₁* está localizada na região do γ -core. Devido à sua boa atividade inibitória sobre *L. amazonensis* decidimos testar neste trabalho a atividade antifúngica de DD, já que vários trabalhos têm demonstrado que a região do γ -core é importante para a atividade antifúngica das defensinas de plantas, tais como *Rs-AFP₂*, *MtDef₄*, *Hs-AFP₁* (defensina de *Heuchera sanguinea* Engelm., planta coral) (Schaaper *et al.*, 2001; Sagaram *et al.*, 2011; Cools *et al.*, 2017b). Dessa forma, a atividade antifúngica de DD foi testada sobre seis espécies de leveduras, incluindo leveduras patogênicas para humanos, usando os mesmos parâmetros de tempo e concentração determinados para o protozoário por Souza e colaboradores (2019).

Os ensaios antifúngicos realizados neste trabalho mostraram que DD não possuiu atividade antifúngica significativa sobre as leveduras e nas condições testadas (**Figura 10**). Estudos mostraram que alguns peptídeos sintéticos derivados do γ -core das defensinas de plantas não possuem atividade antimicrobiana ou possuem atividade antimicrobiana menor que a defensina inteira (De Samblanx *et al.*, 1996; Muñoz *et al.*, 2014; Sagaram *et al.*, 2011; Mello *et al.*, 2019). No peptídeo DD, as C_{36,42,44} foram substituídas por A, tornando-o um pouco menos hidrofóbico (+20,42 kcal/mol), segundo a escala usada (quanto mais negativo for o valor, mais hidrofóbico será o peptídeo), que a região correspondente ao γ -core da defensina original (+21,98 kcal/mol), mas manteve a mesma carga líquida de +2, o que pode ter influenciado em sua atividade (**Tabela 2**). Peptídeos semelhantes ao DD, como o GMA1, derivado da *MsDef₁*, e γ ₃₃₋₄₁*PvD₁*, derivado da *PvD₁*, ambos com cargas líquidas positivas de +1, também não apresentaram atividade sobre os fungos testados (**Tabela 1**).

A espécie fúngica parece ser relevante para o processo de inibição gerado pelos peptídeos. Vários trabalhos têm demonstrado que os lipídeos, especialmente os carregados negativamente, que compõem a membrana fúngica, tais como manosildiinositol fosforilceramida (M(IP)₂C), ácido fosfatídico (PA) e fosfatidilinositol

4,5 bifosfato (PI_(4,5)P₂), podem ser os alvos das defensas de plantas e os aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos da região do γ -core são importantes nesta interação (Parisi *et al.*, 2019b). A defesa *MtDef*₄, por exemplo, atua de formas diferentes sobre os fungos ascomicetos *Neurospora crassa* e *F. graminearum*. Foi proposto pelos autores que a concentração diferencial de esfingolipídeos nesses fungos, poderia explicar as diferentes formas de ação da *MtDef*₄ (El-Mounadi *et al.*, 2016). Ramamoorthy e colaboradores (2007) observaram que a inibição do fungo *F. graminearum* pela defesa *MsDef*₁ dependia do esfingolipídeo glicosilceramida (GlcCer), mas não a inibição causada pela *MtDef*₄. Algo semelhante ocorre com a defesa *Rs-AFP*₂, a levedura *S. cerevisiae*, que não possui GlcCer em sua membrana é resistente à *Rs-AFP*₂, enquanto que as leveduras *Pichia pastoris* e *C. albicans* que possuem GlcCer são sensíveis à *Rs-AFP*₂. Adicionalmente, *P. pastoris* e *C. albicans* mutantes, sem GlcCer em suas membranas, apresentam fenótipo de resistência à *Rs-AFP*₂ (Thevissen *et al.*, 2004). Estes trabalhos nos levam a supor que talvez as leveduras testadas neste trabalho não possuam o alvo específico de DD o que explicaria a sua falta de atividade.

Para algumas defensas, os aminoácidos determinantes para a interação com a membrana fúngica estão fora da região do γ -core. Talvez isso também possa explicar o porquê do peptídeo DD não possuir atividade antifúngica sobre as leveduras testadas. Foi visto, por exemplo, que a atividade biológica da defesa *NaD*₁ (defensa de *Nicotiana glauca* Link & Otto, tabaco) e *TPP*₃ (defensa de *Solanum lycopersicum* L., tomate) é dependente da dimerização e este processo é fundamental para a ligação destas defensas ao seu alvo de membrana, o PI_(4,5)P₂. O interessante é que resíduos de lisina (K₄ de *NaD*₁ e K₆ de *TPP*₃, ambos na posição 7 da Tabela 1) estão fora do γ -core e são essenciais para a ligação ao alvo fúngico e a dimerização, uma vez que quando estes resíduos foram substituídos pelo resíduo alanina, estas duas defensas perderam a capacidade de formar dímeros e de se ligar a lipídeos, e conseqüentemente, sua atividade antifúngica e antitumoral (Lay *et al.*, 2012; Baxter *et al.*, 2015). Algo semelhante ocorre com a defesa *OsAFP*₁. Os autores viram, que os resíduos R₁, H₂, L₄, R₉ e F₁₀, que também estão fora do γ -core, são fundamentais para a dimerização da defesa e ligação ao lipídeo de membrana fosfatidilinositol (3)-fosfato (PI(3)P) de *C. albicans*. A substituição destes resíduos por alanina, impediu a formação do dímero e causou perda da atividade antifúngica (Ochiai *et al.*, 2020).

A baixa atividade antifúngica de DD sobre as leveduras testadas e sua boa atividade inibitória sobre *L. amazonensis*, nos incentivou a melhorar a atividade deste peptídeo alterando seus parâmetros bioquímicos através da troca de aminoácidos. Para que estas trocas fossem direcionadas e racionais, foi feito um levantamento bibliográfico de vários artigos que correlacionavam a estrutura e a atividade biológica das defensinas de plantas e peptídeos sintéticos derivados e estes foram organizados na **Tabela 1**. A partir do estudo dessa tabela, foi possível perceber que, em geral, as alterações foram feitas na região do γ -core e que as trocas de aminoácidos que aumentaram a carga positiva e a hidrofobicidade das moléculas melhoraram a sua atividade biológica. Estudos que correlacionam a estrutura e o mecanismo de ação das defensinas mostram que a atração de cargas opostas entre as defensinas carregadas positivamente com as membranas dos microrganismos carregadas negativamente garante a interação inicial. Em seguida, a região hidrofóbica da defensina interage com a parte hidrofóbica da membrana, podendo causar a sua desestabilização (Giuliani *et al.*, 2007; Parisi *et al.*, 2019b; Kovaleva *et al.*, 2020).

A carga e a hidrofobicidade são fatores importantes para a atividade antimicrobiana das defensinas. Este fato é corroborado por trabalhos com mutações direcionadas nos resíduos de aminoácidos ou estudos que analisam as isoformas de defensinas. As isoformas das defensinas *Rs*-AFP₁ e *Rs*-AFP₂ diferem apenas em dois resíduos (E₅ é Q e N₂₇ é R em *Rs*-AFP₂) (posições 7 e 30, respectivamente, na **Tabela 1**), resultando em carga líquida positiva (de +3,7 para +5,6), hidrofobicidade (de +35,91 para 34,01 kcal/mol) e atividade antimicrobiana maiores em *Rs*-AFP₂ quando comparada a *Rs*-AFP₁ (**Tabela 1**; Terras *et al.*, 1992). A defensina *VrD*₁ (carga de +5,5 e hidrofobicidade de 37,26 kcal/mol), como já citada na **Introdução**, possui atividade inibitória sobre α -amilase de insetos, já a sua isoforma *VrD*₂ (carga de +2,7 e hidrofobicidade de 54,42 kcal/mol) não. Uma quimera de *VrD*₂, chamada *VrD*_{2c}, feita com a troca dos aminoácidos DDFR presentes no γ -core de *VrD*₂ pelos aminoácidos GMTRT presentes no γ -core de *VrD*₁, garantiu um aumento da carga positiva (de +2,7 para +3,7) e da hidrofobicidade (de +54,4 para +48,02 kcal/mol) em *VrD*_{2c} comparada a *VrD*₂. Esta quimera possuiu atividade inibitória sobre α -amilase de insetos, inexistente em *VrD*₂ (**Tabela 1**; Lin *et al.*, 2007). Como outro exemplo, podemos citar as variantes de *MtDef*₄ (carga de +5,8 e hidrofobicidade de +49,16), que foram sintetizadas trocando aminoácidos importantes para a atividade biológica desta

defensina por alanina ($MtDef4^{RGFRRR/AAAARR}$; $MtDef4^{RGFRRR/RGAARR}$; $MtDef4^{RGFRRR/RGFRAA}$). Todas as variantes possuíram carga positiva menor (+3,8; +4,8; +3,8, respectivamente) e também apresentaram atividade antifúngica reduzida, comparada a defensina $MtDef4$. Vale ressaltar que as variantes $MtDef4^{RGFRRR/AAAARR}$ e $MtDef4^{RGFRRR/RGFRAA}$ tiveram sua hidrofobicidade aumentada (+48,10 e +46,54 kcal/mol, respectivamente) e a variante $MtDef4^{RGFRRR/RGAARR}$ teve a hidrofobicidade reduzida (+50,6 kcal/mol) (**Tabela 1**; Sagaram *et al.*, 2013). A variante $OefDef1.1_V5$ também mostrou uma atividade antifúngica melhorada quando comparada a defensina original $OefDef1.1$ (defensina de *Olea europaea* L., oliveira). Neste caso, a substituição dos resíduos KHYG por AAAA diminuiu um pouco a carga positiva (de +8,1 em $OefDef1.1$ para +7,0 em $OefDef1.1_V5$), mas aumentou a hidrofobicidade (de +50,31 kcal/mol em $OefDef1.1$ para +46,74 kcal/mol em $OefDef1.1_V5$) (**Tabela 1**; Li *et al.*, 2019).

O estudo da **Tabela 1**, nos mostrou ainda que o aumento da carga positiva não é o único fator importante, mas também a posição em que estes resíduos carregados positivamente se encontram na molécula. De Samblanx e colaboradores (1997), por exemplo, propuseram que um aumento na carga líquida de $Rs-AFP_2$ pela substituição de certos resíduos por arginina poderia aumentar a sua atividade antifúngica. No entanto, algumas destas substituições reduziram a atividade antifúngica nas variantes de $Rs-AFP_2$, com as substituições de P₇R, S₁₂R, I₂₆R, L₂₈R, V₃₉R, A₄₂R, I₄₆R, F₄₉R (posições 9, 15, 29, 31, 43, 48, 53 e 56 na tabela 1, respectivamente). Além disso, a retirada destes resíduos reduziu a hidrofobicidade (+36,45, +36,13, +37,71, +37,84, +35,36, +37,05, +36,09, +37,71, +38,30 kcal/mol, respectivamente) em relação à defensina original (+34,78 kcal/mol) o que pode ter contribuído para a diminuição da atividade antifúngica.

Ainda sobre a posição destes resíduos carregados positivamente, foi possível perceber através do alinhamento que foi feito, que a carga positiva nas posições 41 e 50 (posição de referência da **Tabela 1**) é conservada e importante para a atividade biológica das defensinas. A defensina $Rs-AFP_2$, por exemplo, não possui o resíduo positivo conservado na posição 41 e sim uma asparagina. Quando este resíduo é substituído por uma arginina, a defensina tem a sua atividade antifúngica melhorada. Além disso, a $Rs-AFP_2$ possui o resíduo positivo conservado na posição 50, uma lisina, e quando este foi substituído por uma glutamina, a atividade da defensina

diminuiu. Algo semelhante ocorre com a defensina *NaD*₁, quando a arginina da posição 50 é substituída por um ácido glutâmico, a defensina perde atividade biológica. A defensina *OsAFP*₁ possui os resíduos positivos (lisinas) conservados nas posições 41 e 50, e quando estes são substituídos por alanina, a defensina perde sua atividade. Também podemos observar a importância destes resíduos positivos conservados com a defensina *MtDef*₂, que não possui atividade antifúngica, e a defensina *MsDef*₁, que possui atividade antifúngica. A defensina *MtDef*₂ não possui uma carga positiva na posição 50 e sim uma glutamina e quando esta é substituída por uma arginina a *MtDef*₂ passa a ter atividade antifúngica. Da mesma forma que a substituição da arginina na posição 50 de *MsDef*₁ pela glutamina, faz com que a *MsDef*₁ perca sua atividade antifúngica (**Tabela 1**). Em conjunto, os resultados obtidos através do estudo da **Tabela 1** indicam que não só o incremento da carga é importante para a atividade biológica, mas também sua posição na estrutura primária e a hidrofobicidade da molécula.

Outro resultado interessante que a **Tabela 1** mostrou foi em relação ao tamanho dos peptídeos sintéticos derivados da região do γ -core. Foi possível perceber que, além da carga positiva e hidrofobicidade, há um tamanho mínimo em resíduos de aminoácidos para que estes peptídeos tenham atividade. Peptídeos muito curtos, com menos de 10 resíduos de aminoácidos, abrangendo somente a região do γ -core ou menores, possuem pouca ou nenhuma atividade quando comparada ao peptídeo que abrange a região do γ -core e alguns resíduos que os flanqueiam das fitas β_2 e β_3 . Por exemplo, o peptídeo GMA1 de 9 resíduos de aminoácidos, que abrange somente o γ -core da defensina *MsDef*₁, não possui atividade antifúngica. Já o peptídeo GMA1-C que possui os 9 resíduos do γ -core mais 6 aminoácidos da fita β_3 possui atividade antifúngica. Algo semelhante ocorre com o peptídeo GMA4 de 10 resíduos de aminoácidos, que abrangem somente o γ -core da defensina *MtDef*₄. Este peptídeo possui atividade antifúngica menor que GMA4-C, que possuem o γ -core mais 6 aminoácidos da fita β_3 . O peptídeo $\gamma_{31-45}PvD_1^{++}$ de 15 resíduos, derivado do γ -core da defensina *PvD*₁ mais dois aminoácidos da fita β_2 e mais quatro aminoácidos da fita β_3 , também apresenta uma atividade antifúngica maior que o peptídeo mais curto $\gamma_{33-41}PvD_1^{++}$, que abrange somente os 9 resíduos da região do γ -core (**Tabela 1**). Vale ressaltar que esta quantidade mínima de resíduos de aminoácidos em peptídeos biologicamente ativos parece ser algo conservado na natureza e pode ser observado

nas temporinas (AMPs de 10 a 13 resíduos de aminoácidos isolados originalmente do anfíbio anuro *Rana temporaria*, sapo comum europeu) (Simmacco *et al.*, 1996; Mishra *et al.*, 2018) e nas bacterenecinas (AMPs de 13 resíduos de aminoácidos isolados de neutrófilos bovinos) (Cherkasov *et al.*, 2009).

A partir destas análises, dois novos peptídeos de 15 resíduos cada, baseados no peptídeo DD, foram desenhados. Em um dos peptídeos decidimos pelo aumento da carga positiva, substituindo os dois resíduos negativos de ácido aspártico na posição 47 e 48 (D_{47,48}) por dois resíduos de argininas, e o chamamos de A_{36,42,44}R_{38,39}V₃₂₋₄₆VuDef, abreviado como RR. Estas trocas garantiram à RR uma carga positiva de +6 e uma hidrofobicidade de +18,32 kcal/mol (**Tabela 2**). No segundo peptídeo, além do aumento da carga positiva, decidimos pelo o aumento da hidrofobicidade substituindo a alanina (A₃₆) e a valina (V₄₀) pelo resíduo aromático triptofano (W) e, com as duas substituições, o peptídeo foi chamado de A_{42,44}R_{38,39}W_{36,40}V₃₂₋₄₆VuDef, abreviado como WR. Estas trocas garantiram à WR uma carga positiva de +6 e uma hidrofobicidade de +14,10 kcal/mol (**Tabela 2**). O triptofano foi escolhido para as nossas modificações por ser um aminoácido aromático neutro encontrado em alta proporção em AMPs curtos biologicamente ativos como indolicidina (AMP de neutrófilos bovinos) e tritripticina (AMP de medula óssea de porco) (Mirsha *et al.*, 2018). Sua cadeia lateral aromática não carregada possui a capacidade de formar ligações de hidrogênio e se inserir de forma única nas membranas microbianas (Strøm *et al.*, 2000; Bi *et al.*, 2013). Além disso, frequentemente, peptídeos ricos em triptofano com atividade biológica também contém resíduos de arginina. A carga positiva desse aminoácido auxilia na atração eletrostática inicial e formação de pontes de hidrogênio entre o peptídeo e a membrana alvo. Em seguida, o triptofano ancora-se na membrana com alta afinidade (Chan *et al.*, 2006). Trabalhos realizados com indolicidina, tritripticina, lactoferrina bovina (AMP derivado da digestão da proteína lactoferrina) e temporinas têm mostrado que as propriedades únicas das cadeias laterais dos resíduos de triptofano e arginina tornam os peptídeos curtos altamente ativos, com atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antitumoral, e com baixa atividade hemolítica (Lawyer *et al.*, 1996; Strøm *et al.*, 2000; Bi *et al.*, 2013; Shagaghi *et al.*, 2016).

Os peptídeos RR e WR foram testados sobre as mesmas leveduras e nas mesmas condições testadas para o peptídeo DD. Como esperado, somente o

aumento da carga líquida positiva, de +2 para +6 em posições específicas, em RR foi suficiente para uma melhora na atividade antifúngica deste quando comparado ao peptídeo original DD. Os ensaios antimicrobianos mostraram que RR foi ativo sobre três das seis leveduras testadas, *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. tropicalis*. (**Figura 12A**). O peptídeo WR, por sua vez, possuiu a melhor atividade antifúngica, quando comparado a DD e RR. O aumento da carga positiva (de +2 para +6) e da hidrofobicidade (de +21.98 para +14.1 kcal/mol) em WR fizeram com que este peptídeo fosse ativo sobre quatro das seis leveduras testadas, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. tropicalis* (**Figura 12B**). Os ensaios antimicrobianos realizados nos indicaram que a inibição fúngica causada pelos nossos peptídeos depende da carga, da hidrofobicidade e é fungo-dependente, podendo depender de um alvo específico na membrana fúngica, como já discutido no terceiro parágrafo desta seção. Ensaios de sobreposição lipídica outiras contendo PIP imobilizado poderiam confirmar essa hipótese, indicando os lipídeos alvo na membrana fúngica. Sagaram e colaboradores (2011) demonstraram que os resíduos de aminoácidos carregados positivamente e a hidrofobicidade da região do γ -core das defensinas *MsDef₁* e *MtDef₄* são determinantes para a atividade antifúngica e alterações morfológicas causadas por essas moléculas. O γ -core da defensina *MtDef₄* (GRCRGFRRRC) possui carga positiva de +4.9 e hidrofobicidade de +17.50 kcal/mol, sendo mais positivo e mais hidrofóbico que o γ -core da *MsDef₁* (GRCRDDFRC), cujas carga e hidrofobicidade são, respectivamente, +0.9 e +20.01 kcal/mol. Tais características conferem uma atividade antifúngica maior à *MtDef₄* comparada a *MsDef₁*. Posteriormente, Sagaram e colaboradores (2013) confirmaram que a sequência de aminoácidos RGFRRR é necessária para ligação ao PA e internalização da *MtDef₄* na célula fúngica.

Com base nos primeiros ensaios antimicrobianos, a combinação da levedura mais sensível e clinicamente relevante e o peptídeo desenhado mais ativo foram escolhidos para os próximos ensaios. São estes: *C. tropicalis* tratada com RR e *C. albicans* tratada com WR. Inicialmente, decidimos determinar a MIC₁₀₀. Como resultado, a MIC₁₀₀ de RR sobre *C. tropicalis* foi de 27,5 μ M e a MIC₁₀₀ (**Figura 13A**) de WR sobre *C. albicans* foi de 18,5 μ M (**Figura 13B**). Ao fazer o plaqueamento das leveduras nestas concentrações (ensaio de viabilidade), vimos que 27,5 μ M de RR foi capaz de inibir a formação de colônias de *C. tropicalis*, indicando que esta

concentração é a DL₁₀₀ (**Figura 14A**). No entanto, 18,5 µM não inibiu a formação de colônias de *C. albicans*, o que nos levou a plaquear as concentrações seguintes. Como resultado, a concentração 27,5 µM de WR foi capaz de inibir a formação de colônias de *C. albicans* e foi considerada como DL₁₀₀ (**Figura 14B**). Em seguida, confrontamos o efeito antifúngico dos peptídeos com um fármaco de referência usado clinicamente, o fluconazol. O tratamento das leveduras com fluconazol, na mesma concentração da DL₁₀₀ dos peptídeos, não inibiu o desenvolvimento de colônias (**Figura 15**). O fluconazol, um antifúngico fungistático para leveduras, da família dos azóis, age ligando-se e inibindo a enzima intracelular 14α-desmetilase (lanosterol desmetilase), envolvida na biossíntese de ergosterol, principal esteroide presente na membrana celular fúngica (Lewis, 2011). Este fármaco é amplamente utilizado no tratamento de candidemias e devido ao uso prolongado e negligenciado, os problemas de resistência tem se acentuado (Spampinato e Leonardi, 2013; Arendrup e Patterson, 2017). Thevissen e colaboradores (2007) demonstraram em seus ensaios *in vitro* que as defensinas *Hs-AFP*₁, *Rs-AFP*₂ e *Dm-AMP*₁ (defensina de *Dahlia merckii* Lehm., dália) foram fungicidas para as espécies de *Candida* testadas e mais eficiente em matar as leveduras quando comparadas aos antifúngicos comerciais, entre eles o fluconazol. Nossos peptídeos também mostraram ação fungicida, o que diminui as chances de surgir cepas resistentes, sendo uma característica importante na produção de novos fármacos (Levy e Marshall, 2004; Thevissen *et al.*, 2007).

Em geral, as defensinas de plantas possuem baixa toxicidade para as células de mamíferos (Carvalho e Gomes, 2011; Vriens *et al.*, 2014). Esta é outra característica importante na produção de novos fármacos. Dessa forma, foi feito um ensaio de citotoxicidade em células de macrófagos murinos (células aderentes) e monócitos humanos (células não aderentes). Para as duas linhagens a toxicidade foi baixa em todas as concentrações testadas (**Figura 16**). Vale ressaltar que a linhagem THP-1 não é aderente, o que a torna naturalmente mais sensível por ter mais “superfície de contato” com o peptídeo e mesmo assim a toxicidade foi baixa. Estudos, como o de Tavares e colaboradores (2008), reforçam a baixa toxicidade das defensinas de plantas para células de mamíferos. Naquele estudo, foi demonstrado que a *Rs-AFP*₂ não possui toxicidade significativa sobre células endoteliais do cérebro humano ou linhagem U87. Em outro estudo, realizado por Lay e colaboradores (2019), foi avaliado a atividade hemolítica de *NoD173* sobre eritrócitos humanos. Como

resultado, a atividade hemolítica foi muito baixa, mesmo na concentração mais alta testada (100 mM), apenas 12% das células foram lisadas. Em um modelo de estudo *in vivo* não mamífero que vem sendo usado no desenvolvimento de fármacos pré-clínicos, Skalska e colaboradores (2020) testaram a toxicidade da defensina PvD_{1S} (defensina sintética de *Phaseolus vulgaris* L., feijão) sobre larvas de *Galleria mellonella* (mariposa da cera). Os autores relataram que a PvD_{1S} não possuiu efeito tóxico e 100% de sobrevivência das larvas foi observada, mesmo na concentração de 74 µM. Vale ressaltar, que neste mesmo modelo, a defensina, na concentração de 18,35 µM, foi capaz de aumentar a sobrevivência de larvas infectadas com *Candida*. O interessante é que assim como os nossos peptídeos, a ação da PvD_{1S} foi fungo-dependente, a taxa de sobrevivência foi maior para as larvas infectadas com *C. buinensis* e *C. tropicalis* (> 80%) do que aquelas infectadas com *C. albicans* e *C. parapsilosis* (<20%).

Após a determinação da DL₁₀₀, passamos a estudar a caracterização dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na interação entre os peptídeos desenhados e as leveduras. Com base no efeito fungicida, decidimos determinar o tempo mínimo que os peptídeos levam à morte celular das leveduras após a interação inicial. O ensaio de determinação do tempo de morte, nos mostrou que o peptídeo RR causa a perda total da viabilidade de células de *C. tropicalis* a partir de 6 h e WR causa a perda total da viabilidade de células de *C. albicans* a partir de 1 h, já havendo uma significativa diminuição da formação de colônias a partir de 3 h e 0 h, respectivamente (**Figura 17** e **Figura 18**). Soares e colaboradores (2017) também relataram uma queda gradual da população de células de *S. cerevisiae* após tratamento com a defensina ApDef₁ (defensina de *Adenantha pavonina* L., carolina) até completa perda de viabilidade em 18 h. Neste caso, os autores associaram a ação da defensina a alguma fase do ciclo celular, já que após a sincronização das células na fase G1/S, ocorreu a completa perda da viabilidade celular em 3 h. No entanto, acreditamos que tal mecanismo não pode ser aplicado para WR devido a sua rápida ação fungicida sobre *C. albicans*. Côte e colaboradores (2009) mostraram que as células sincronizadas de *C. albicans* iniciam a fase de replicação (S) em 60 min com finalização do ciclo em aproximadamente 2 h. Como o peptídeo WR leva a perda da viabilidade celular de 97% da população em 0 h de incubação, acreditamos que não há a participação do ciclo celular no processo de morte.

Com os parâmetros de concentração e tempo já determinados, decidimos investigar quais são as possíveis vias que levam a morte das leveduras. Vários trabalhos têm demonstrado que as defensinas de plantas levam a produção e acúmulo de ROS nas células fúngicas como consequência da atividade antifúngica (Aerts *et al.*, 2007; 2011; Soares *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019). Nos eucariotos, as mitocôndrias são as principais produtoras de ROS, tais como radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil, como subproduto do normal funcionamento da cadeia transportadora de elétrons (Kwon *et al.*, 2015). Em níveis moderados, ROS atuam como moléculas de sinalização significativas, que estão amplamente envolvidas em processos fisiológicos importantes, tais como o controle da proliferação e morte celular (Görlach *et al.*, 2015). No entanto, em situações de estresse, as células podem aumentar a produção de ROS e falhar na sua detoxificação. Este problema leva ao acúmulo de ROS, desestabilizando completamente a célula, gerando danos às próprias mitocôndrias, material genético, oxidação de proteínas, lipídeos e carboidratos, podendo levar à morte celular (Sommer, 2020). Sendo assim, decidimos investigar se os nossos peptídeos geram estresse oxidativo nas leveduras testadas. Para isso, fizemos um ensaio antimicrobiano na presença de dois agentes antioxidantes, o ácido ascórbico e a NAC. O ácido ascórbico possui ação antioxidante não enzimática através do ascorbato, o qual tem propriedades doadoras de elétrons. Este composto possui dois grupos hidroxila ionizáveis, sendo um excelente agente redutor, podendo realizar duas oxidações consecutivas e formar subprodutos não reativos (**Figura 33**) (Du *et al.*, 2012). A NAC, um precursor da glutathiona, possui um grupo tiol livre, que pode interagir com os elétrons livres das ROS e, então, aumentar a capacidade antioxidante total da célula (**Figura 33**) (Zhang *et al.*, 2018).

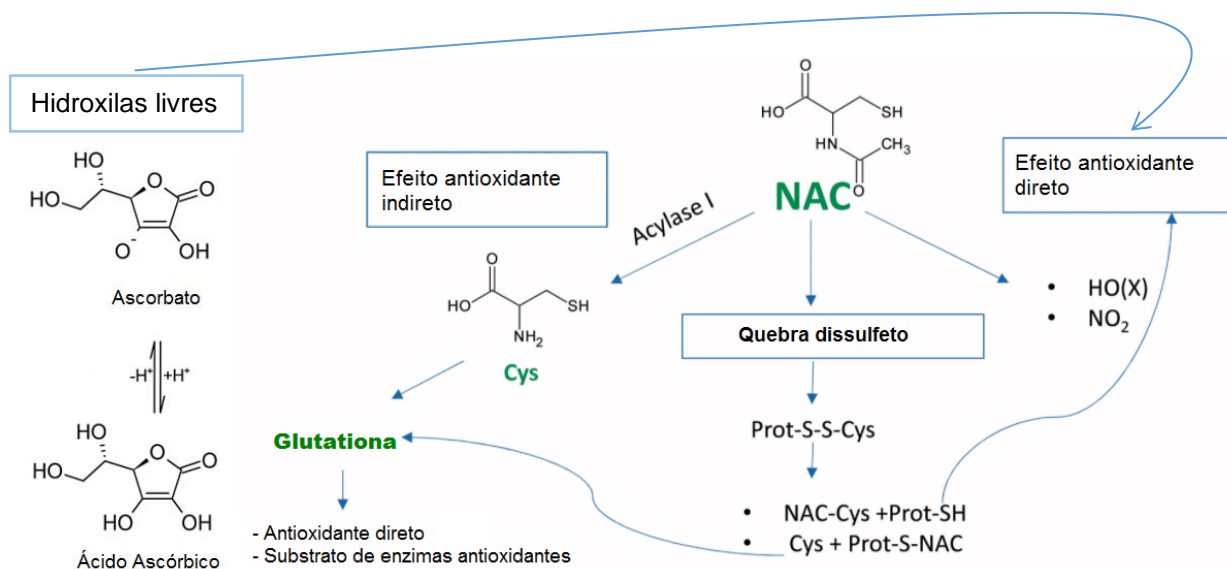


Figura 33: Visão geral da ação antioxidante do ácido ascórbico (Adaptado de Lima *et al.*, 2016) e da N-acetil-L-cisteína (NAC) (Adaptado de Aldini *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos neste ensaio nos mostraram que o peptídeo RR não foi capaz de matar as células de *C. tropicalis*, na presença de ácido ascórbico (**Figura 19A**), o que pode indicar que o estresse oxidativo é um efeito direto da atividade antifúngica deste peptídeo. Em um ensaio semelhante ao nosso, Soares e colaboradores (2017) demonstraram o efeito protetor do ácido ascórbico em células de *S. cerevisiae*, protegendo-as da ação da defensina *ApDef₁*. A defensina *NaD₁* (Hayes *et al.*, 2013) e a *Rs-AFP₂* (Aerts *et al.*, 2007) também perderam suas atividades antifúngicas contra *C. albicans* na presença de ácido ascórbico. Tais trabalhos corroboram nossa hipótese. No entanto, o ácido ascórbico não protegeu as células de *C. albicans* da ação do peptídeo WR (**Figura 19B**). Talvez o estresse oxidativo não seja uma consequência da atividade antifúngica de WR sobre *C. albicans*. Em um estudo feito por Parisi e colaboradores (2019a), foi visto que a defensina *NaD₁* estimula a produção de ROS em *S. cerevisiae*, mas *Dm-AMP₁* não. Os diferentes mecanismos de ação destas defensinas são consequência da variação nos resíduos de aminoácidos, o que talvez explique os diferentes mecanismos apresentados pelos peptídeos RR e WR.

A NAC não protegeu as leveduras da ação dos peptídeos (**Figura 19**). Para atuar como um antioxidante em uma matriz biológica, a taxa de reação, em relação

aos oxidantes, deve ser maior do que a dos antioxidantes endógenos e claramente muito maior do que a dos substratos (Aldini *et al.*, 2018). Talvez concentração de NAC usada em nossos ensaios tenha sido baixa para a quantidade de ROS produzida pelas leveduras. Outra hipótese leva em consideração a síntese da glutathiona, já que a NAC é uma precursora desta molécula. Em eucariotos, a glutathiona possui um papel importante na resistência ao estresse oxidativo, juntamente com a enzima glutathiona redutase que recicla a glutathiona oxidada de volta à forma reduzida. A biossíntese desta molécula ocorre através de duas reações enzimáticas consecutivas dependentes de ATP, catalisadas pela γ -glutamylcisteína sintetase e glutathiona sintase a partir de ácido glutâmico, L-cisteína e glicina (Lin *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004). Se os peptídeos RR e WR estiverem afetando o balanço ATP intracelular, a síntese de glutathiona pode estar sendo inibida e, conseqüentemente, a NAC esteja perdendo sua atividade antioxidante. Muitos peptídeos catiônicos possuem atividade antimicrobiana a partir de uma interação específica com algum componente da membrana microbiana, seguido da formação de agregados localizados, levando à formação de poros na membrana plasmática. Estes poros permitem a liberação de ATP e íons, despolarização da membrana, desregulação osmótica e, por fim, morte celular (Vylkova *et al.*, 2007a). AMPs como a Histatina 5 (peptídeo da saliva humana), a HNP-1 (defensina de neutrófilo humano) (Edgerton *et al.*, 2000), as β -defensinas humanas (hBD-2 e hBD-3) (Vylkova *et al.*, 2007b) e a dermaseptina (peptídeo isolado da pele de rã arbórea sul-americana, *Phyllomedusa sauvagii*) (Coote *et al.*, 1998) possuem a atividade antifúngica, inclusive sobre *C. albicans*, por levar a perda de íons e ATP após a interação com a membrana fúngica. No entanto, mais estudos precisam ser feitos para afirmarmos que os nossos peptídeos atuam sobre ATP celular.

Ainda na intenção de entendermos melhor as possíveis vias que levam a morte das leveduras, decidimos analisar as alterações estruturais geradas pelos peptídeos por microscopia óptica. No entanto, antes de iniciarmos os ensaios de microscopia, fizemos um ensaio antimicrobiano com uma quantidade maior de células, 40.000 células/mL, usando a mesma concentração da DL₁₀₀. Para a nossa surpresa, os peptídeos mantiveram sua toxicidade sobre as leveduras, mesmo nesta quantidade maior de células (**Figura 20**). Mas este resultado levantou um questionamento: Por que a concentração de 27,5 μ M de RR e WR é capaz de matar quase 100% das 40.000 células/mL, mas concentrações menores que essa, como as testadas no

ensaio de MIC₁₀₀, não são capazes de matar 2.000 células/mL? O que acreditamos é que talvez haja uma concentração crítica, ou seja, uma quantidade mínima de peptídeo que tenha que interagir com a célula para que ocorra a morte. A defensina NaD₁, por exemplo, permanece um tempo médio de 4 min na superfície da célula de *C. albicans* antes de ser internalizada. Cerca de 0,67 min depois, a defensina se espalha por todo o citoplasma e inicia o dano às organelas. Os autores propuseram que este “atraso” entre o primeiro contato e as alterações intracelulares foi reflexo de uma captação inicial de NaD₁ em pequena quantidade e que há uma quantidade limite de peptídeo necessária para ligar à superfície da célula antes que a sua absorção, ou permeabilização da membrana, possa ocorrer (Hayes *et al.*, 2018). Em um estudo feito por Jang e colaboradores (2010), foi demonstrado que a aplicação de uma concentração mais alta de Histatina-5 (31 µM) em células de *C. albicans* resultou tanto em uma absorção mais rápida do peptídeo como sua saturação nas células, comparado a concentração mais baixa (15,5 µM). Os autores demonstraram ainda que a translocação vacuolar é dependente da dose. Na concentração de 15,5 µM, apenas 45% das células continham Histatina-5 no citoplasma celular, enquanto que na concentração de 31 µM, 95% das células continham Histatina-5 no citoplasma, após 30 min de incubação. Estudos futuros precisam ser feitos para entendermos melhor a relação existente entre a concentração dos nossos peptídeos e a morte das leveduras.

Assim que começamos a observar as células das leveduras tratadas com os peptídeos no microscópio óptico, percebemos que haviam alterações estruturais nas células, tais como granulação/vacuolização do citoplasma (**Figura 21**). Alterações semelhantes foram observadas por Sagaram e colaboradores (2013). Em seu estudo foi visto que a defensina *Mt-Def4* induziu a granulação e encolhimento do citoplasma de células de *F. graminearum*. Fernández e colaboradores (2021), ao tratar *F. graminearum* com peptídeos derivados do α -core (*SmAP* _{α 1-21}) e γ -core (*SmAP* _{γ 27-44}) da defensina *DefSm₂* (defensina de *Silybum marianum* (L.) Gaertn., cardo-mariano) identificaram alterações ultraestruturais das células fúngicas através da microscopia eletrônica de transmissão. Neste estudo, foi visto que os conídios expostos ao *SmAP* _{α 1-21} possuíam uma aparência recortada ao redor das células, além de um citoplasma granular e desorganizado, enquanto o *SmAP* _{γ 27-44} levou a uma segregação do citoplasma da periferia da célula, ou seja, um “descolamento” da parede celular.

Além disso, em ambos os casos, houve alteração nos peroxissomos, quando comparado às células controle. Os autores sugeriram que os peptídeos possuem ação sobre a parede celular, o que poderia explicar a granulação observada nos nossos ensaios, no entanto para confirmarmos se os nossos peptídeos possuem a mesma ação, ensaios de microscopia eletrônica deverão ser feitos. Vale ressaltar que uma possível vacuolização do citoplasma também foi observada. Em fungos, as mudanças no tamanho do vacúolo ocorrem como resultado da absorção ou liberação de água e solutos para equilibrar as concentrações de íons citoplasmáticos em casos de estresse osmótico (Efe *et al.*, 2005). Além disso, esta organela também é o local de armazenamento de aminoácidos, fosfato, metais e algumas toxinas (Weisman, 2003). A expansão vacuolar, observada em células de *C. albicans* tratadas com Histatina-5, por exemplo, é um reflexo das mudanças no equilíbrio iônico como resultado da perda de íons citosólicos (Edgerton *et al.*, 2000). Além disso, o transporte do peptídeo para o vacúolo da levedura pode levar ao restabelecimento da homeostase iônica e redução da toxicidade (Jang *et al.*, 2010). Semelhante aos nossos resultados, Parisi e colaboradores (2019a) mostraram que na ausência da defensina NaD_1 os vacúolos de *S. cerevisiae* estavam pequenos e a célula apresentou um aspecto uniforme, mas quando tratados com NaD_1 , por 20 min, os vacúolos estavam maiores e mais inchados. O interessante é que há uma internalização da defensina na célula, mas, diferentemente da Histatina-5, não há internalização de NaD_1 no vacúolo. Talvez nossos peptídeos estejam desregulando o fluxo de íons da célula ou ainda sendo translocados para o vacúolo, no entanto, mais estudos precisam ser feitos para entendermos essa relação existente entre os nossos peptídeos e a vacuolização celular.

Esta observação inicial, principalmente em *C. tropicalis*, também mostrou que as células tratadas com ácido ascórbico, um agente antioxidante, não possuíam alterações intracelulares, sendo muito similares às células controle (**Figura 21**). E as células tratadas com RR eram muito similares aquelas tratadas com ácido acético (controle positivo), conhecido por induzir apoptose e, em altas concentrações, necrose em leveduras (Ludovico *et al.*, 2001b). A produção descontrolada de ROS em leveduras possui um papel central no processo de apoptose (Madeo *et al.*, 2004). Soares e colaboradores (2017) propuseram que a defensina $ApDef_1$, após a interação com células de *S. cerevisiae*, leva a produção descontrolada de ROS, causando a

permeabilização de membrana, condensação de cromatina e por fim morte celular por apoptose. Sendo assim, ao iniciar nossas análises por microscopia óptica de fluorescência, decidimos começar investigando a produção de ROS pelas células. Para isso, usamos a sonda H₂DCFDA, que na presença de ROS, emite um sinal verde. Como esperado, as células de *C. tropicalis*, após tratamento com RR por 1 h, emitiram um sinal positivo, indicando a produção de ROS, mas quando tratado juntamente com ácido ascórbico não (**Figura 22**). Apesar das células de *C. albicans* não serem protegidas da morte pelos agentes antioxidantes, indicando que talvez ROS não fosse importante para a morte, as células de *C. albicans* após tratamento com WR por 20 min também emitiram um sinal positivo (**Figura 23**), descartando aquela suposição de que WR não induzia a produção ROS. É possível perceber, no entanto, que a emissão de fluorescência por *C. albicans* é fraca, talvez pelo tempo escolhido (20 min). Como neste caso o tempo de morte é de apenas 1 h, futuramente investigaremos a produção de ROS com um menor tempo de incubação. Acreditamos que, devido a rápida ação do peptídeo, há a possibilidade da produção de ROS já estar diminuindo com 20 min.

Como já mencionado, vários AMPs, incluindo as defensinas de plantas, induzem o estresse oxidativo como consequência da sua atividade antimicrobiana e a principal fonte de ROS é a mitocôndria. Sendo assim, decidimos analisar a funcionalidade mitocondrial com o auxílio da sonda rodamina 123. Esta sonda fluorescente se difunde livremente pela membrana plasmática e se acumula eletroforicamente na matriz da mitocôndria metabolicamente ativa, resultando na emissão de uma coloração vermelha. Decidimos observar a funcionalidade mitocondrial em dois momentos, no início do contato com o peptídeo e próximo ao tempo de morte. Curiosamente, nossos resultados mostraram que a fluorescência emitida pelas células tratadas com os peptídeos não diminuiu com o passar do tempo (**Figura 24, Figura 25 e Figura 26**), pelo contrário, aumentou até mais que o controle, principalmente nas células de *C. tropicalis* tratadas com RR. Neste caso, o tratamento com ácido ascórbico manteve uma fluorescência semelhante ao controle. Este aumento da fluorescência observada em nossos resultados não foi observado, por exemplo, por Mello e colaboradores (2019). Os autores demonstraram que quando células de *C. buinensis* foram tratadas com o peptídeo sintético $\gamma_{33-41}PvD_1^{++}$, derivado da defensina *PvD*₁, houve uma perda da fluorescência emitida, relacionada a perda

do potencial de membrana e disfunção mitocondrial. É interessante ressaltar que as células de *L. amazonensis*, após tratamento com peptídeo DD, também emitiram um sinal positivo na marcação com rodamina 123 e, assim como os nossos resultados, a marcação foi forte, difusa e presente em todo o citoplasma. Os autores relacionaram esta marcação com possível despolarização e/ou fragmentação da mitocôndria e alteração no potencial de membrana de outras organelas e vesículas, caracterizando o sinal fluorescente em todo o citoplasma das células tratadas (Souza *et al.*, 2019). Resultados semelhantes foram obtidos para *L. amazonensis* tratados com uma fração de *Bertholletia excelsa* (castanha do Brasil), onde o citoplasma das células tratadas apresentou uma marcação mais forte para rodamina 123 quando comparado ao controle, indicando uma alteração no potencial de membrana das organelas (Fardin *et al.*, 2016). Tais evidências podem indicar que os peptídeos RR e WR estejam alterando o potencial de membrana plasmática ou ainda alterando o equilíbrio eletroquímico das células, já que a rodamina 123 tende a se acumular em locais onde o potencial eletroquímico é alto. Outra hipótese seria a alta atividade mitocondrial. Talvez a presença de ROS induza o aumento da produção de ATP ou do funcionamento de bombas de efluxo para tentar estabilizar a célula, esse poderia inclusive expulsar rodamina 123 do interior da mitocôndria (Prudêncio *et al.*, 2000; Ludovico *et al.*, 2001a).

Outro mecanismo de ação bem caracterizado para as defensinas de plantas é a indução da permeabilização de membrana plasmática das células fúngicas (Sagaram *et al.*, 2013; Poon *et al.*, 2014; Baxter *et al.*, 2015; Islam *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019; Mello *et al.*, 2019). Estes trabalhos mostram inclusive que os aminoácidos carregados positivamente e hidrofóbicos da região do γ -core são fundamentais na interação e permeabilização da membrana fúngica. O trabalho de Soares e colaboradores (2017) com a defensina ApDef₁, no entanto, mostrou que a permeabilização de membrana é um evento secundário dependente do acúmulo de ROS e não um evento direto da ação da defensina sobre a membrana plasmática. Como nossos peptídeos são carregados positivamente e hidrofóbicos e induzem a produção ROS, decidimos investigar a permeabilização da membrana plasmática com o auxílio da sonda fluorescente Sytox green. Nossos resultados mostraram que os peptídeos RR e WR causam a permeabilização das membranas de *C. tropicalis* e *C. albicans* (**Figura 27** e **Figura 28**). Podemos afirmar inclusive que para *C. tropicalis*, a

permeabilização gerada por RR é um evento indireto e dependente de ROS, pois quando as células são tratadas com ácido ascórbico são protegidas da permeabilização em 85,3%.

Vários estudos têm sugerido que as defensinas de planta possuem atividade antifúngica através de um processo apoptótico (Aerts *et al.*, 2009; 2011; Soares *et al.*, 2017, Mello *et al.*, 2019). Com base nestes trabalhos e nos resultados obtidos até o momento, decidimos investigar se os nossos peptídeos matam as leveduras através de apoptose. A apoptose é um programa de suicídio celular altamente regulado. Em leveduras, o estresse oxidativo parece ser crucial para esse processo e o envolvimento de reguladores apoptóticos, como as caspases, também já foi identificado (Madeo *et al.*, 2004). Sendo assim, realizamos um ensaio antimicrobiano utilizando o inibidor de caspases Z-VAD-FMK e, como resultado, observamos que os peptídeos não perderam sua atividade antifúngica (**Figura 29**). Este resultado nos levou a supor que a via de morte ativada pelos peptídeos nas leveduras poderia não ser a apoptose. Com esse resultado, decidimos realizar outro ensaio antimicrobiano, mas na presença de um marcador de necrose, o IP, marcador impermeável às membranas íntegras. A necrose cada vez mais tem sido reconhecida como causa primária de morte celular em levedura. O dano contundente à integridade de estruturas celulares como o vacúolo, organela importante na manutenção da homeostase celular e regulação de pH intracelular, pode resultar em morte celular necrótica (Eisenberg *et al.*, 2010). Ao incubar as leveduras com IP, foi possível observar um sinal positivo já no início do contato com os peptídeos, indicando possivelmente um processo necrótico (**Figura 30, Figura 31 e Figura 32**). É interessante ressaltar que a marcação com IP foi melhor observada em *C. albicans* (100% das células) do que em *C. tropicalis* (cerca de 50% das células), reflexo talvez da rápida ação de WR sobre *C. albicans*. O antifúngico anfotericina B em altas concentrações induzem a necrose de *C. albicans*. Nesta situação é possível observar mudanças ultraestruturais e níveis reduzidos de ROS (Phillips *et al.*, 2003). Estes autores relataram ainda o processo necrótico gerado por altas concentrações de ácido acético e, assim como os nossos resultados, as células apresentavam granulosidade do citoplasma e vacuolização. Além disso, as células de *C. albicans*, diferentemente de *C. tropicalis*, emitiram um sinal mais fraco no nosso ensaio de detecção de ROS, o que reforça a nossa hipótese de que WR causa a morte de *C. albicans* por necrose. O ensaio com IP, nos mostrou

ainda, que para *C. tropicalis* esse processo é induzido por estresse oxidativo, pois o tratamento com ácido ascórbico protegeu as células da necrose. Mais ensaios precisam ser feitos para confirmar nossas hipóteses, principalmente para *C. tropicalis*. Como nesse caso a marcação foi em apenas metade das células, talvez a marcação de IP não represente necessariamente que a via de morte gerada por RR seja a necrose e a fluorescência observada seja consequência da permeabilização de membrana gerada por ROS.

Se os peptídeos RR e WR entram nas células das leveduras, ainda não sabemos. Mas nossos resultados mostram que os peptídeos, após o contato com as leveduras, induzem a produção de ROS, alterações morfológicas intracelulares, permeabilização da membrana plasmática e, possivelmente, morte por necrose. Nossos resultados parecem indicar ainda que há algum desbalanço iônico no interior da célula, que precisa ser melhor investigado. Futuramente esperamos identificar os possíveis alvos celulares dos peptídeos RR e WR e, assim, elucidar os seus possíveis mecanismos de ação. Estas pesquisas serão de fundamental importância para o desenvolvimento de novos peptídeos com atividade antimicrobiana melhorada.

6. CONCLUSÕES

As análises realizadas no desenvolvimento deste trabalho, nos permitiram concluir que:

- O peptídeo DD não possui atividade antifúngica sobre as leveduras testadas e nas condições testadas;
- A análise da correlação entre a estrutura primária das defensinas e a atividade biológica pode ser uma boa ferramenta para o desenho de novos peptídeos com atividade biológica melhorada;
- Em geral, o aumento da carga positiva e da hidrofobicidade, principalmente na região γ -core, melhora a atividade antimicrobiana das defensinas e peptídeos sintéticos derivados, como mostrado para RR e WR.
- Os peptídeos desenhados RR e WR, com alterações em carga e hidrofobicidade, e nas mesmas condições testadas para o peptídeo original DD, apresentaram uma melhora na atividade antifúngica;
- O peptídeo RR apresentou atividade antifúngica sobre *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. tropicalis*;
- O peptídeo WR apresentou a melhor atividade antifúngica, sendo ativo sobre *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. tropicalis*;
- O efeito inibitório de RR sobre *C. tropicalis* foi fungicida, com DL₁₀₀ de 27,5 μ M e tempo de morte de 6 h;
- O efeito inibitório de WR sobre *C. albicans* foi fungicida, com DL₁₀₀ de 27,5 μ M e tempo de morte de 1 h;
- Os peptídeos RR e WR, quando confrontados com o fluconazol na mesma concentração de DL₁₀₀ e nas mesmas leveduras, apresentaram uma atividade antifúngica melhor que o fármaco comercial;
- Os peptídeos RR e WR apresentaram baixa citotoxicidade para as células de mamíferos macrófagos murinos (RAW 264,7) e monócitos humanos (THP-1);
- Os peptídeos RR e WR causaram alterações estruturais nas células de *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente;
- O tratamento com os peptídeos RR e WR induz o aumento da produção endógena de ROS pelas células de *C. tropicalis* e *C. albicans*, respectivamente;

- O estresse oxidativo está envolvido na atividade antifúngica de RR e WR sobre *C. tropicalis* e *C. albicans*, respectivamente;
- Não foi observado a perda da funcionalidade mitocondrial das células de *C. tropicalis* e *C. albicans* tratadas com os peptídeos RR e WR, respectivamente;
- As atividades fungicidas dos peptídeos RR e WR tem como parte do mecanismo de ação a permeabilização da membrana plasmática das leveduras;
- A permeabilização da membrana plasmática das células de *C. tropicalis* é um evento indireto da ação do peptídeo RR e, provavelmente, induzida pelo aumento de ROS;
- A atividade das caspases não estão envolvidas na morte das leveduras induzida pelos peptídeos;
- A necrose pode ser a possível via de morte induzida pelos peptídeos RR e WR nas células de *C. tropicalis* e *C. albicans*, respectivamente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerts AM, Bammens L, Govaert G, Carmona-Gutierrez D, Madeo F, Cammue BP, Thevissen K (2011) The antifungal plant defensin *HsAFP₁* from *Heuchera sanguinea* induces apoptosis in *Candida albicans*. **Front Microbiol** 2:47. Doi: 10.3389/fmicb.2011.00047.
- Aerts AM, Carmona-Gutierrez D, Lefevre S, Govaert G, François IE, Madeo F, Santos R, Cammue BP, Thevissen K (2009) The antifungal plant defensin *RsAFP₂* from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. **FEBS Lett** 583(15):2513-6. Doi: 10.1016/j.febslet.2009.07.004.
- Aerts AM, François IE, Meert EM, Li QT, Cammue BP, Thevissen K (2007) The antifungal activity of *RsAFP₂*, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. **J Mol Microbiol Biotechnol** 13(4):243-7. Doi: 10.1159/000104753.
- Aldini G, Altomare A, Baron G, Vistoli G, Carini M, Borsani L, Sergio F (2018) N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. **Free Radical Research** 52(7):751-762. Doi: 10.1080/10715762.2018.1468564.
- Allaw F, Kara Zahreddine N, Ibrahim A, Tannous J, Taleb H, Bizri AR, Dbaibo G, Kanj SS (2021) First *Candida auris* outbreak during a COVID-19 pandemic in a Tertiary-Care Center in Lebanon. **Pathogens** 10(2):157. Doi: 10.3390/pathogens10020157.
- Antimicrobial Peptide Database (APD). Disponível em: <<https://wangapd3.com/main.php>>. Acesso em: março de 2021.
- Aoki W, Ueda M (2013) Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics. **Pharmaceuticals (Basel)** 6(8):1055-81. Doi: 10.3390/ph6081055.
- Arendrup MC, Patterson TF (2017) Multidrug-resistant *Candida*: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **J Infect Dis** 216(suppl_3):S445-S451. Doi: 10.1093/infdis/jix131.
- Ashraf N, Kubat RC, Poplin V, Adenis AA, Denning DW, Wright L, McCotter O, Schwartz IS, Jackson BR, Chiller T, Bahr NC (2020) Re-drawing the Maps for Endemic Mycoses. **Mycopathologia** 185(5):843-865. Doi: 10.1007/s11046-020-00431-2.
- Bahar AA, Ren D (2013) Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals (Basel)** 6(12):1543-75. Doi: 10.3390/ph6121543.
- Bals R (2000) Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. **Respir Res** 1(3):141-150. Doi:10.1186/rr25.

- Baxter AA, Richter V, Lay FT, Poon IK, Adda CG, Veneer PK, Phan TK, Bleackley MR, Anderson MA, Kvensakul M, Hulett MD (2015) The tomato defensin TPP3 binds phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate via a conserved dimeric cationic grip conformation to mediate cell lysis. **Mol Cell Biol** 35(11):1964–1978. Doi: <https://doi.org/10.1128/MCB.00282-15>.
- Beer KD, Jackson BR, Chiller T, Verweij PE, Van de Veerdonk FL, Wauters J (2020) Does pulmonary aspergillosis complicate coronavirus disease 2019? **Crit Care Explor** 2(9):e0211. Doi: 10.1097/CCE.0000000000000211.
- Berman J, Krysan DJ (2020) Drug resistance and tolerance in fungi. **Nat Rev Microbiol** 18(6):319-331. Doi: 10.1038/s41579-019-0322-2.
- Bi X, Wang C, Ma L, Sun Y, Shang D (2013) Investigation of the role of tryptophan residues in cationic antimicrobial peptides to determine the mechanism of antimicrobial action. **J Appl Microbiol** 115(3):663-72. Doi:10.1111/jam.12262.
- Bleackley MR, Payne JA, Hayes BM, Durek T, Craik DJ, Shafee TM, Poon IK, Hulett MD, van der Weerden NL, Anderson MA (2016) *Nicotiana glauca* defensin chimeras reveal differences in the mechanism of fungal and tumor cell killing and an enhanced antifungal variant. **Antimicrob Agents Chemother** 60(10):6302–6312. Doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.01479-16>.
- Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW (2017) Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. **J Fungi** 3(4):57. Doi: <https://doi.org/10.3390/jof3040057>.
- Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Osborn RW (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. **Plant Physiol** 108(4):1353-8. Doi: 10.1104/pp.108.4.1353.
- Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Vanderleyden J (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiol Lett** 69(1–2):55–59. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04174.x>.
- Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections (2012) **Sci Transl Med** 4(165):165rv13. Doi: 10.1126/scitranslmed.3004404. PMID: 23253612.
- Brown L, Leck AK, Gichangi M, Burton MJ, Denning DW (2020) The global incidence and diagnosis of fungal keratitis. **Lancet Infect Dis** 21(3):E49-57. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30448-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30448-5).
- Bruix M, Jiménez MA, Santoro J, González C, Colilla FJ, Méndez E, Rico M (1993) Solution structure of γ 1-H and γ 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by $^1\text{H-NMR}$: a structural motif common to toxic arthropod proteins. **Biochemistry** 32(2):715-24. Doi: 10.1021/bi00053a041.

- Carvalho A de O, Gomes VM (2009) Plant defensins--prospects for the biological functions and biotechnological properties. **Peptides** 30(5):1007-20. Doi: 10.1016/j.peptides.2009.01.018.
- Carvalho A de O, Gomes VM (2011) Plant defensins and defensin-like peptides - biological activities and biotechnological applications. **Curr Pharm Des** 17(38):4270-93. Doi: 10.2174/138161211798999447.
- Carvalho A de O, Machado OLT, Da Cunha M, Santos IS, Gomes VM (2001) Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. **Plant Physiol Biochem** 39(2):137-146. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)01230-4](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)01230-4).
- CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. **Department of Health and Human Services**. Doi: <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>.
- Chan DI, Prenner EJ, Vogel HJ (2006) Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. **Biochim Biophys Acta** 1758(9):1184-202. Doi: 10.1016/j.bbamem.2006.04.006.
- Chen X, Liao B, Cheng L, Peng X, Xu X, Li Y, Hu T, Li J, Zhou X, Ren B (2020) The microbial coinfection in COVID-19. **Appl Microbiol Biotechnol** 104(18):7777-7785. Doi: 10.1007/s00253-020-10814-6.
- Cherkasov A, Hilpert K, Jenssen H, Fjell CD, Waldbrook M, Mullaly SC, Volkmer R, Hancock RE (2009) Use of artificial intelligence in the design of small peptide antibiotics effective against a broad spectrum of highly antibiotic-resistant superbugs. **ACS Chem Biol** 4(1):65-74. Doi: <https://doi.org/10.1021/cb800240j>.
- Colilla FJ, Rocher A, Mendez E (1990) γ -Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. **FEBS Lett** 270(1-2):191-4. Doi: 10.1016/0014-5793(90)81265-p.
- Cools TL, Struyfs C, Drijfhout JW, Kucharíková S, Lobo Romero C, Van Dijck P, Ramada MHS, Bloch C Jr, Cammue BPA, Thevissen K (2017a) A linear 19-mer plant defensin-derived peptide acts synergistically with caspofungin against *Candida albicans* biofilms. **Front Microbiol** 8:2051. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02051>.
- Cools TL, Vriens K, Struyfs C, Verbandt S, Ramada MHS, Brand GD, Bloch C Jr, Koch B, Traven A, Drijfhout JW, Demuyser L, Kucharíková S, Van Dijck P, Spasic D, Lammertyn J, Cammue BPA, Thevissen K (2017b) The antifungal plant defensin HsAFP₁ is a phosphatidic acid-interacting peptide inducing membrane permeabilization. **Front Microbiol** 8:2295. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02295>.
- Coote PJ, Holyoak CD, Bracey D, Ferdinando DP, Pearce JA (1998) Inhibitory action of a truncated derivative of the amphibian skin peptide dermaseptin S3 on

Saccharomyces cerevisiae. **Antimicrob Agents Chemother** 42(9):2160-70. Doi: 10.1128/AAC.42.9.2160.

Cornet B, Bonmatin JM, Hetru C, Hoffmann JA, Ptak M, Vovelle F (1995) Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. **Structure** 3(5):435-48. Doi: 10.1016/s0969-2126(01)00177-0.

Corrêa JAF, Evangelista AG, Nazareth TM, Luciano FB (2019) Fundamentals on the molecular mechanism of action of antimicrobial peptides. **Materialia** 8:100494. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2019.100494>.

Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG (2020) *Candida albicans* antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: the triad yeast-host-antifungal. **Microorganisms** 8(2):154. Doi: 10.3390/microorganisms8020154.

Côte P, Hogues H, Whiteway M (2009) Transcriptional analysis of the *Candida albicans* cell cycle. **Mol Biol Cell** 20(14):3363-3373. Doi:10.1091/mbc.e09-03-0210.

Data Repository of Antimicrobial Peptides (DRAMP). Disponível em: <<http://dramp.cpu-bioinfor.org>>. Acesso em março de 2021.

Denning DW, Kneale M, Sobel JD, Richardson R (2018) Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. **Lancet Infect Dis** 18(11):E339-347. Doi [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30103-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30103-8).

De Samblanx GW, Fernandez del Carmen A, Sijtsma L, Plasman HH, Schaaper WM, Posthuma GA, Fant F, Meloen RH, Broekaert WF, van Amerongen A (1996) Antifungal activity of synthetic 15-mer peptides based on the RsAFP₂ (*Raphanus sativus* antifungal protein 2) sequence. **Pept Res** 9(6):262–268.

De Samblanx GW, Goderis IJ, Thevissen K, Raemaekers R, Fant F, Borremans F, Acland DP, Osborn RW, Patel S, Broekaert WF (1997) Mutational analysis of a plant defensin from radish (*Raphanus sativus* L.) reveals two adjacent sites important for antifungal activity. **J Biol Chem** 272(2):1171–1179. Doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.2.1171>.

Dos Santos IS, Carvalho Ade O, de Souza-Filho GA, do Nascimento VV, Machado OL, Gomes VM (2010) Purification of a defensin isolated from *Vigna unguiculata* seeds, its functional expression in *Escherichia coli*, and assessment of its insect α -amylase inhibitory activity. **Protein Expr Purif** 71(1):8-15. Doi: 10.1016/j.pep.2009.11.008.

Du H, Bing J, Hu T, Ennis CL, Nobile CJ, Huang G (2020) *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. **PLoS Pathog** 16(10): e1008921. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008921>.

Du J, Cullen JJ, Buettner GR (2012) Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochim Biophys Acta** 1826(2):443-57. Doi: 10.1016/j.bbcan.2012.06.003.

- Edgerton M, Koshlukova SE, Araujo MW, Patel RC, Dong J, Bruenn JÁ (2000) Salivary histatin 5 and human neutrophil defensin 1 kill *Candida albicans* via shared pathways. **Antimicrob Agents Chemother** 44(12):3310-6. Doi: 10.1128/aac.44.12.3310-3316.2000.
- Efe JA, Botelho RJ, Emr SD (2005) The Fab1 phosphatidylinositol kinase pathway in the regulation of vacuole morphology. **Curr Opin Cell Biol** 17(4):402-8. Doi: 10.1016/j.ceb.2005.06.002.
- Eisenberg T, Carmona-Gutierrez D, Büttner S, Tavernarakis N, Madeo F (2010) Necrosis in yeast. **Apoptosis** 15(3):257-68. Doi: 10.1007/s10495-009-0453-4.
- El-Mounadi K, Islam KT, Hernández-Ortiz P, Read ND, Shah DM (2016) Antifungal mechanisms of a plant defensin *MtDef4* are not conserved between the ascomycete fungi *Neurospora crassa* and *Fusarium graminearum*. **Mol Microbiol** 100(3):542–559. Doi: <https://doi.org/10.1111/mmi.13333>.
- Fardin JM, Carvalho LP, Nascimento VV, Melo EJT, Gomes VM, Machado OLT, Vieira-Silva FC, Carvalho AO (2016) Biochemical purification of proteins from *Bertholletia excelsa* seeds and their antileishmanial action *in vitro*. **World J Pharm Res** 5:233–300. Doi: <https://doi.org/10.20959/wjpr20167-6609>.
- Fernández A, Colombo ML, Curto LM, Gómez GE, Delfino JM, Guzmán F, Bakás L, Malbrán I, Vairo-Cavalli SE (2021). Peptides derived from the α -core and γ -core regions of a putative *Silybum marianum* flower defensin show antifungal activity against *Fusarium graminearum*. **Front Microbiol** 12:632008. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.632008>.
- Finkina EI, Melnikova DN, Bogdanov IV, Ovchinnikova TV (2018) Peptídeos do sistema imunológico inato das plantas. Parte I. Estrutura, atividade biológica e mecanismos de ação. **Russ J Bioorg Chem** 44:573–585. Doi: <https://doi.org/10.1134/S1068162019010060>.
- Galocha M, Pais P, Cavalheiro M, Pereira D, Viana R, Teixeira MC. Divergent approaches to virulence in *C. albicans* and *C. glabrata*: Two sides of the same coin (2019) **Int J Mol Sci** 20(9):2345. Doi: 10.3390/ijms20092345.
- Garcia-Vidal C, Sanjuan G, Moreno-García E, Puerta-Alcalde P, Garcia-Pouton N, Chumbita M, Fernandez-Pittol M, Pitart C, Inciarte A, Bodro M, Morata L, Ambrosioni J, Grafia I, Meira F, Macaya I, Cardozo C, Casals C, Tellez A, Castro P, Marco F, García F, Mensa J, Martínez JA, Soriano A (2021) COVID-19 Researchers Group. Incidence of co-infections and superinfections in hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study. **Clin Microbiol Infect** 27(1):83-88. Doi: 10.1016/j.cmi.2020.07.041.
- Ghosh C, Sarkar P, Issa R, Haldar J (2019) Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance. **Trends Microbiol** 27(4):323-338. Doi: 10.1016/j.tim.2018.12.010.

- Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF (2007) Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics. **Cent Eur J Biol** 2:1–33. Doi: <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0010-5>.
- Global Action Fund for Fungal Infections (GAFFI). Disponível em: <https://www.gaffi.org/why/fungal-disease-frequency/> Acesso em: março de 2021.
- Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O (2015) Calcium and ROS: A mutual interplay. **Redox Biol** 6:260-271. Doi: 10.1016/j.redox.2015.08.010.
- Hammond EE, McDonald CS, Vestbo J, Denning DW (2020) The global impact of *Aspergillus* infection on COPD. **BMC Pulm Med** 20(1):241. Doi: 10.1186/s12890-020-01259-8.
- Hayes BM, Bleackley MR, Anderson MA, van der Weerden NL (2018) The plant defensin NaD₁ enters the cytoplasm of *Candida albicans* via endocytosis. **J Fungi (Basel)** 4(1):20. Doi: 10.3390/jof4010020.
- Hayes BM, Bleackley MR, Wiltshire JL, Anderson MA, Traven A, van der Weerden NL (2013) Identification and mechanism of action of the plant defensin NaD₁ as a new member of the antifungal drug arsenal against *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother** 57(8):3667-75. Doi: 10.1128/AAC.00365-13.
- Hexima: Plant Derived Antifungals. Disponível em: <https://hexima.com.au> Acesso em: março de 2021.
- Hoeningl M (2020) Invasive fungal disease complicating COVID-19: when it rains it pours. **Clin Infect Dis** 5:ciaa1342. Doi: 10.1093/cid/ciaa1342.
- Horton MV, Johnson CJ, Kernien JF, Patel TD, Lam BC, Cheong JZA, Meudt JJ, Shanmuganayagam D, Kalan LR, Nett JE (2020) *Candida auris* forms high-burden biofilms in skin niche conditions and on porcine skin. **mSphere** 5(1):e00910-19. Doi: 10.1128/mSphere.00910-19.
- Huang HW (2006) Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. **Biochim Biophys Acta** 1758(9):1292-302. Doi: 10.1016/j.bbamem.2006.02.001.
- Islam KT, Velivelli SLS, Berg RH, Oakley B, Shah DM (2017) A novel bi-domain plant defensin MtDef₅ with potent broadspectrum antifungal activity binds to multiple phospholipids and forms oligomers. **Sci Rep** 7:16157. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16508-w>.
- Jang WS, Bajwa JS, Sun JN, Edgerton M (2010) Salivary histatin 5 internalization by translocation, but not endocytosis, is required for fungicidal activity in *Candida albicans*. **Mol Microbiol** 77(2):354-70. Doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07210.x.
- Kaewklom S, Wongchai M, Petvises S, Hanpithakphong W, Aunpad R (2018) Structural and biological features of a novel plant defensin from *Brugmansia x*

- Kang HK, Kim C, Seo CH, Park Y (2017) The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. **J Microbiol** 55(1):1-12. Doi: 10.1007/s12275-017-6452-1.
- Koehler P, Cornely OA, Böttiger BW, Dusse F, Eichenauer DA, Fuchs F, Hallek M, Jung N, Klein F, Persigehl T, Rybniker J, Kochanek M, Böll B, Shimabukuro-Vornhagen A (2020) COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. **Mycoses** 63(6):528-534. Doi: 10.1111/myc.13096.
- Kovaleva V, Bukhteeva I, Kit OY, Nesselova IV (2020) Plant defensins from a structural perspective. **Int J Mol Sci** 21(15):5307. Doi: 10.3390/ijms21155307.
- Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK (2018) Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*. **Biomolecules** 8(1):4. Doi: 10.3390/biom8010004.
- Kwon YY, Choi KM, Cho C, Lee CK (2015) Mitochondrial efficiency-dependent viability of *Saccharomyces cerevisiae* mutants carrying individual electron transport chain component deletions. **Mol Cells** 38(12):1054-63. Doi: 10.14348/molcells.2015.0153.
- Lacerda AF, Vasconcelos EA, Pelegrini PB, Grossi de Sa MF (2014) Antifungal defensins and their role in plant defense. **Front Microbiol** 5:116. Doi: 10.3389/fmicb.2014.00116.
- Lawyer C, Pai S, Watabe M, Borgia P, Mashimo T, Eagleton L, Watabe K (1996) Antimicrobial activity of a 13 amino acid tryptophan-rich peptide derived from a putative porcine precursor protein of a novel family of antibacterial peptides. **FEBS Lett** 390(1):95-8. Doi: 10.1016/0014-5793(96)00637-0.
- Lay FT, Brugliera F, Anderson MA (2003) Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. **Plant Physiol** 131(3):1283-1293. Doi:10.1104/pp.102.016626.
- Lay FT, Mills GD, Poon IK, Cowieson NP, Kirby N, Baxter AA, van der Weerden NL, Dogovski C, Perugini MA, Anderson MA, Kvensakul M, Hulett MD (2012) Dimerization of plant defensin NaD₁ enhances its antifungal activity. **J Biol Chem** 287(24):19961–19972. Doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.331009>.
- Lay FT, Ryan GF, Caria S, Phan TK, Veneer PK, White JA, Kvensakul M, Hulett MD (2019) Structural and functional characterization of the membrane-permeabilizing activity of *Nicotiana occidentalis* defensin NoD173 and protein engineering to enhance oncolysis. **FASEB J** 33(5):6470–6482. Doi: <https://doi.org/10.1096/fj.201802540R>.

- Lai Y, Gallo RL (2009) AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends Immunol** 30(3):131-141. Doi:10.1016/j.it.2008.12.003.
- Le CF, Fang CM, Sekaran SD (2017) Intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides. **Antimicrob Agents Chemother** 61(4):e02340-16. Doi: 10.1128/AAC.02340-16.
- Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, Mackey V, Coy DH, He Q (2019) The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **Am J Transl Res** 11(7):3919-3931.
- Levy SB, Marshall B (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nat Med** 10(12 Suppl):S122-9. Doi: 10.1038/nm1145.
- Lewis RE. Current concepts in antifungal pharmacology (2011) **Mayo Clin Proc** 86(8):805-17. Doi: 10.4065/mcp.2011.0247.
- Li H, Velivelli SLS, Shah DM (2019) Antifungal potency and modes of action of a novel olive tree defensin against closely related ascomycete fungal pathogens. **Mol Plant Microbe Interact** 32(12):1649–1664. Doi: <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-19-0224-R>.
- Li P, Nielsen HM, Müllertz A (2012) Oral delivery of peptides and proteins using lipid-based drug delivery systems. **Expert Opin Drug Deliv** 9(10):1289-304. Doi: 10.1517/17425247.2012.717068.
- Lima D, Cossenza M, Garcia CG, Portugal C, Marques F, Paes-de-Carvalho R, Netto A (2016) Determination of ascorbic acid in the retina during chicken embryo development using high performance liquid chromatography and UV detection. **Anal Methods** 8:5441. Doi: 10.1039/c6ay01249c.
- Lin JP, Tian J, You JF, Jin ZH, Xu ZN, Cen PL (2004) An effective strategy for the co-production of S-adenosyl-L-methionine and glutathione by fed-batch fermentation. **Biochem Eng J** 21(1):19-25. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.04.013>.
- Lin KF, Lee TR, Tsai PH, Hsu MP, Chen CS, Lyu PC (2007) Structure-based protein engineering for alpha-amylase inhibitory activity of plant defensin. **Proteins** 68(2):530-40. Doi: 10.1002/prot.21378.
- Lionakis MS, Hohl TM (2020) Call to action: How to tackle emerging nosocomial fungal infections. **Cell Host Microbe** 27(6):859-862. Doi:10.1016/j.chom.2020.04.011.
- Liu H, Lin JP, Cen PL, Pan YJ (2004) Co-production of S-adenosyl-L-methionine and glutathione from spent brewer's yeast cells. **Process Biochemistry** 39(12):1993-1997. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.09.031>.
- Liu YJ, Cheng CS, Lai SM, Hsu MP, Chen CS, Lyu PC (2006) Solution structure of the plant defensin VrD₁ from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. **Proteins** 63(4):777-86. Doi: 10.1002/prot.20962.

- Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, Colombo AL, Calvo B, Cuomo CA, Desjardins CA, Berkow EL, Castanheira M, Magobo RE, Jabeen K, Asghar RJ, Meis JF, Jackson B, Chiller T, Litvintseva AP (2017) Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. **Clin Infect Dis** 64(2):134-140. Doi: 10.1093/cid/ciw691.
- Lone SA, Ahmad A (2019) *Candida auris* - the growing menace to global health. **Mycoses** 62(8):620-637. Doi: 10.1111/myc.12904.
- Ludovico P, Sansonetty F, Côte-Real M (2001a) Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. **Microbiology (Reading)** 147(12):3335-43. Doi: 10.1099/00221287-147-12-3335.
- Ludovico P, Sousa MJ, Silva MT, Leão CL, Côte-Real M (2001b) *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. **Microbiology (Reading)** 147(Pt 9):2409-2415. Doi: 10.1099/00221287-147-9-2409. PMID: 11535781.
- Madeo F, Herker E, Wissing S, Jungwirth H, Eisenberg T, Fröhlich KU (2004) Apoptosis in yeast. **Curr Opin Microbiol** 7(6):655-60. Doi: 10.1016/j.mib.2004.10.012.
- Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C (2016) Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. **Front Cell Infect Microbiol** 6:194. Doi:10.3389/fcimb.2016.00194.
- Mello EO, Taveira GB, Carvalho AO, Gomes VM (2019) Improved smallest peptides based on positive charge increase of the γ -core motif from *PvD₁* and their mechanism of action against *Candida* species. **Int J Nanomed** 14:407–420. Doi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S187957>.
- Mendez E, Moreno A, Colilla F, Pelaez F, Limas GG, Mendez R, Soriano F, Salinas M, de Haro C (1990) Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, γ -hordothionin, from barley endosperm. **Eur J Biochem** 194(2):533-9. Doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15649.x.
- Mercer DK, O'Neil DA (2020) Innate inspiration: antifungal peptides and other immunotherapeutics from the host immune response. **Front Immunol** 11:2177. Doi:10.3389/fimmu.2020.02177.
- Mirski T, Niemcewicz M, Bartoszcze M, Gryko R, Michalski A (2017) Utilisation of peptides against microbial infections - a review. **Ann Agric Environ Med** 25(2):205-210. Doi: 10.26444/aaem/74471.
- Mishra AK, Choi J, Moon E, Baek KH (2018) Tryptophan-rich and proline-rich antimicrobial peptides. **Molecules** 23(4):815. Doi:10.3390/molecules23040815.

- Mishra B, Wang X, Lushnikova T, Zhang Y, Golla RM, Narayana JL, Wang C, McGuire TR, Wang G (2018) Antibacterial, antifungal, anticancer activities and structural bioinformatics analysis of six naturally occurring temporins. **Peptides** 106:9-20. Doi: 10.1016/j.peptides.2018.05.011.
- Moodley S, Koorbanally NA, Moodley T, Ramjugernath D, Pillay M (2014) 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. **J Microbiol Meth** 104:72–78. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.06.014>.
- Mookherjee N, Anderson MA, Haagsman HP, Davidson DJ (2020) Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. **Nat Rev Drug Discov** 19(5):311-332. Doi: 10.1038/s41573-019-0058-8.
- Muñoz A, Chu M, Marris PI, Sagaram US, Kaur J, Shah DM, Read ND (2014) Specific domains of plant defensins differentially disrupt colony initiation, cell fusion and calcium homeostasis in *Neurospora crassa*. **Mol Microbiol** 92(6):1357–1374. Doi: <https://doi.org/10.1111/mmi.12634>.
- Nawrot R, Barylski J, Nowicki G, Broniarczyk J, Buchwald W, Goździcka-Józefiak A (2014) Plant antimicrobial peptides. **Folia Microbiol (Praha)** 59(3):181-96. Doi: 10.1007/s12223-013-0280-4.
- Nordström R, Malmsten M (2017) Delivery systems for antimicrobial peptides. **Adv Colloid Interface Sci** 242:17-34. Doi: 10.1016/j.cis.2017.01.005.
- Ochiai A, Ogawa K, Fukuda M, Ohori M, Kanaoka T, Tanaka T, Taniguchi M, Sagehashi Y (2018) Rice defensin OsAFP₁ is a new drug candidate against human pathogenic fungi. **Sci Rep** 8:11434. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29715-w>.
- Ochiai A, Ogawa K, Fukuda M, Suzuki M, Ito K, Tanaka T, Sagehashi Y, Taniguchi M (2020) Crystal structure of rice defensin OsAFP₁ and molecular insight into lipid-binding. **J Biosci Bioeng** 130(1):6-13. Doi: 10.1016/j.jbiosc.2020.02.011.
- Parisi K, Doyle SR, Lee E, Lowe RGT, van der Weerden NL, Anderson MA, Bleackley MR (2019a) Screening the *Saccharomyces cerevisiae* nonessential gene deletion library reveals diverse mechanisms of action for antifungal plant defensins. **Antimicrob Agents Chemother** 63(11):e01097-19. Doi: 10.1128/AAC.01097-19.
- Parisi K, Shafee TMA, Quimbar P, van der Weerden NL, Bleackley MR, Anderson MA (2019b) The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. **Semin Cell Dev Biol** 88:107-118. Doi: 10.1016/j.semcdb.2018.02.004.
- Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M (2012) Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. **Crit Rev Biotechnol** 32(2):143-71. Doi: 10.3109/07388551.2011.594423.

- Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A (2017) The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **Lancet Infect Dis** 17(12):e383-e392. Doi: 10.1016/S1473-3099(17)30316-X.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN (2019) Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: Results for *Candida* species from 1997-2016. **Open Forum Infect Dis** 6(Suppl 1):S79-S94. Doi: 10.1093/ofid/ofy358.
- Phillips AJ, Sudbery I, Ramsdale M (2003) Apoptosis induzida por estresses ambientais e anfotericina B em *Candida albicans*. **Proc Natl Acad Sci USA** 100(24): 14327-14332. Doi: 10.1073 / pnas.2332326100.
- 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, Kvensakul M, Hulett MD (2014) Phosphoinositide-mediated oligomerization of a defensin induces cell lysis. **Elife** 3:e01808. Doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.01808>.
- Prudêncio C, Sansonetty F, Sousa MJ, Côrte-Real M, Leão C (2000) Rapid detection of efflux pumps and their relation with drug resistance in yeast cells. **Cytometry** 39(1):26-35. Doi: 10.1002/(sici)1097-0320(20000101)39:1<26::aid-cyto5>3.0.co;2-c.
- Ramamoorthy V, Cahoon EB, Li J, Thokala M, Minto RE, Shah DM (2007) Glucosylceramide synthase is essential for alfalfa defensin-mediated growth inhibition but not for pathogenicity of *Fusarium graminearum*. **Mol Microbiol** 66(3):771–786. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05955.x>.
- Rigano MM, Romanelli A, Fulgione A, Nocerino N, D'Agostino N, Avitabile C, Frusciante L, Barone A, Capuano F, Capparelli R (2012) A novel synthetic peptide from a tomato defensin exhibits antibacterial activities against *Helicobacter pylori*. **J Pept Sci** 18(12):755-762. Doi: <https://doi.org/10.1002/psc.2462>.
- Rodrigues ML, Nosanchuk JD (2020) Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. **PLoS Negl Trop Dis** 14(2):e0007964. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007964>.
- Rončević T, Puizina J, Tossi A (2019) Antimicrobial peptides as anti-infective agents in pre-post-antibiotic era? **Int J Mol Sci** 20(22):5713. Doi: 10.3390/ijms20225713.
- Sagaram US, El-Mounadi K, Buchko GW, Berg HR, Kaur J, Pandurangi RS, Smith TJ, Shah DM (2013) Structural and functional studies of a phosphatidic acid-binding antifungal plant defensin *MtDef4*: Identification of an RGFRRR motif governing fungal cell entry. **PLoS ONE** 8(12):e82485. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082485>.
- Sagaram US, Pandurangi R, Kaur J, Smith TJ, Shah DM (2011) Structure-activity determinants in antifungal plant defensins *MsDef1* and *MtDef4* with different

modes of action against *Fusarium graminearum*. **PLoS One** 6(4):e18550. Doi: 10.1371/journal.pone.0018550.

Spampinato C, Leonardi D (2013) *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **Biomed Res Int** 2013:204237. Doi:10.1155/2013/204237.

Sathoff AE, Velivelli S, Shah DM, Samac DA (2019) Plant defensin peptides have antifungal and antibacterial activity against human and plant pathogens. **Phytopathology** 109(3):402-408. Doi:10.1094/PHYTO-09-18-0331-R.

Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H (2009) *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. **Microbiol Immunol** 53(1):41-4. Doi: 10.1111/j.1348-0421.2008.00083.x.

Schaaper WMM, Posthuma GA, Plasman HH, Sijtsma L, Fant F, Borremans FAM, Thevissen K, Broekaert WF, Meloen RH, van Amerongen A (2001) Synthetic peptides derived from the β 2- β 3 loop of *Raphanus sativus* antifungal protein 2 that mimic the active site. **J Peptide Res** 57(5):409–418. Doi: 10.1034/j.1399-3011.2001.00842.x.

Selsted ME, Brown DM, DeLange RJ, Harwig SS, Lehrer RI (1985) Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. **J Biol Chem** 260(8):4579–4584.

Shafee TM, Lay FT, Phan TK, Anderson MA, Hulett MD (2016) Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. **Cell Mol Life Sci** 74(4):663-682. Doi: 10.1007/s00018-016-2344-5.

Shagaghi N, Palombo EA, Clayton AH, Bhave M (2016) Archetypal tryptophan-rich antimicrobial peptides: properties and applications. **World J Microbiol Biotechnol** 32(2):31. Doi: 10.1007/s11274-015-1986-z.

Sher Khan R, Iqbal A, Malak R, Shehryar K, Attia S, Ahmed T, Ali Khan M, Arif M, Mii M (2019) Plant defensins: types, mechanism of action and prospects of genetic engineering for enhanced disease resistance in plants. **3 Biotech** 9(5):192. Doi: 10.1007/s13205-019-1725-5.

Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol Syst Biol** 7:539. Doi: <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.

Simmaco M, Mignogna G, Canofeni S, Miele R, Mangoni ML, Barra D (1996) Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. **Eur J Biochem** 242(3):788-92. Doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0788r.x.

Skalska J, Andrade VM, Cena GL, Harvey PJ, Gaspar D, Mello ÉO, Henriques ST, Valle J, Gomes VM, Conceição K, Castanho MARB, Andreu D (2020) Synthesis,

structure, and activity of the antifungal plant defensin PvD₁. **J Med Chem** 63(17):9391-9402. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00543.

Soares JR, José Tenório de Melo E, da Cunha M, Fernandes KVS, Taveira GB, da Silva Pereira L, Pimenta S, Trindade FG, Regente M, Pinedo M, de la Canal L, Gomes VM, de Oliveira Carvalho A (2017) Interaction between the plant ApDef₁ defensin and *Saccharomyces cerevisiae* results in yeast death through a cell cycle- and caspase-dependent process occurring via uncontrolled oxidative stress. **Biochim Biophys Acta Gen Subj** 1861(1 Pt A):3429-3443. Doi: 10.1016/j.bbagen.2016.09.005.

Sommer S (2020) Monitoring the functionality and stress response of yeast cells using flow cytometry. **Microorganisms** 8(4):619. Doi: 10.3390/microorganisms8040619.

Song X, Zhang M, Zhou Z, Gong W (2011) Ultra-high resolution crystal structure of a dimeric defensin SPE10. **FEBS Lett** 585(2):300–306. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.12.039>.

Souza GS, de Carvalho LP, de Melo EJT, da Silva FCV, Machado OLT, Gomes VM, Carvalho A de O (2019) A synthetic peptide derived of the β2-β3 loop of the plant defensin from *Vigna unguiculata* seeds induces *Leishmania amazonensis* apoptosis-like cell death. **Amino Acids** 51(10–12):1633–1648. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02800-8>.

Souza GS, do Nascimento VV, de Carvalho LP, de Melo EJ, Fernandes KV, Machado OL, Retamal CA, Gomes VM, Carvalho A de O (2013) Activity of recombinant and natural defensins from *Vigna unguiculata* seeds against *Leishmania amazonensis*. **Exp Parasitol** 135(1):116-25. Doi: 10.1016/j.exppara.2013.06.005.

Spampinato C, Leonardi D (2013) *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **Biomed Res Int** 2013:204237. Doi: 10.1155/2013/204237.

Spelbrink RG, Dilmac N, Allen A, Smith TJ, Shah DM, Hockerman GH (2004) Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. **Plant Physiol** 135(4):2055–2067. Doi: <http://doi.org/10.1104/pp.104.040873>.

Srivastava S, Dashora K, Ameta KL, Singh NP, El-Enshasy HA, Pagano MC, Hesham AE, Sharma GD, Sharma M, Bhargava A (2021) Cysteine-rich antimicrobial peptides from plants: The future of antimicrobial therapy. **Phytother Res** 35(1):256-277. Doi: 10.1002/ptr.6823.

Steiner H, Hultmark D, Engström A, Bennich H, Boman HG (1981) Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature** 292(5820):246–248. Doi: <https://doi.org/10.1038/292246a0>.

- Strøm MB, Rekdal O, Svendsen JS (2000) Antibacterial activity of 15-residue lactoferricin derivatives. **J Pept Res** 56(5):265-74. Doi: 10.1034/j.1399-3011.2000.00770.x.
- Tam JP, Wang S, Wong KH, Tan WL (2015) Antimicrobial peptides from plants. **Pharmaceuticals (Basel)** 8(4):711-57. Doi: 10.3390/ph8040711.
- Tavares PM, Thevissen K, Cammue BP, François IE, Barreto-Bergter E, Taborda CP, Marques AF, Rodrigues ML, Nimrichter L (2008) *In vitro* activity of the antifungal plant defensin Rs-AFP₂ against *Candida* isolates and its *in vivo* efficacy in prophylactic murine models of candidiasis. **Antimicrob Agents Chemother** 52(12):4522–4525. Doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00448-08>.
- Terras FR, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Torrekens S, Van Leuven F, Vanderleyden J, Bruno P, Cammue A, Broekaert WF (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. **Plant Cell** 7(5):573-88. Doi: 10.1105/tpc.7.5.573.
- Terras FR, Schoofs HM, De Bolle MF, Van Leuven F, Rees SB, Vanderleyden J, Cammue BP, Broekaert WF (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **J Biol Chem** 267(22):15301-9.
- Thevissen K, Kristensen HH, Thomma BP, Cammue BP, François IE (2007) Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. **Drug Discov Today** 12(21-22):966-71. Doi: 10.1016/j.drudis.2007.07.016.
- Thevissen K, Warnecke DC, François IE, Leipelt M, Heinz E, Ott C, Zähringer U, Thomma BP, Ferket KK, Cammue BP (2004) Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. **J Biol Chem** 279(6):3900–3905. Doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M311165200>.
- Ullivarri MF, Arbulu S, Garcia-Gutierrez E, Cotter PD (2020) Antifungal peptides as therapeutic agents. **Front Cell Infect Microbiol** 10:105. Doi: 10.3389/fcimb.2020.00105.
- Urbán P, Valle-Delgado JJ, Moles E, Marques J, Díez C, Fernández-Busquets X (2012) Nanotools for the delivery of antimicrobial peptides. **Curr Drug Targets** 13(9):1158-72. Doi: 10.2174/138945012802002302.
- van der Weerden N, Anderson MA (2013) Plant defensins: Common fold, multiple functions. **Fungal Biol Rev** 26(4):121-131. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.08.004>.
- van der Weerden N, Hayes B, McKenna J, Bleackley M, McCorkelle O, Weaver S, Turner R, Brown M, Baker M, Harvey P, Craik D, Anderson M (2018) The plant defensin HXP124 has the potential to be a safe and effective topical treatment for onychomycosis. In: **20th ISHAM Congress**. Amsterdam, Netherlands: The International Society for Human and Animal Mycology.

- Velivelli SLS, Islam KT, Hobson E, Shah DM (2018) Modes of action of a bi-domain plant defensin *MtDef5* against a bacterial pathogen *Xanthomonas campestris*. **Front Microbiol** 9:934. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00934>.
- Vylkova S, Nayyar N, Li W, Edgerton M (2007a) Human beta-defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. **Antimicrob Agents Chemother** 51(1):154-61. Doi: 10.1128/AAC.00478-06.
- Vylkova S, Sun JN, Edgerton M (2007b) The role of released ATP in killing *Candida albicans* and other extracellular microbial pathogens by cationic peptides. **Purinergic Signal** 3(1-2):91-97. Doi:10.1007/s11302-006-9040-0.
- Villanueva-Lozano H, Treviño-Rangel RJ, González GM, Ramírez-Elizondo MT, Lara-Medrano R, Aleman-Bocanegra MC, Guajardo-Lara CE, Gaona-Chávez N, Castilleja-Leal F, Torre-Amione G, Martínez-Reséndez MF (2021) Outbreak of *Candida auris* infection in a COVID-19 hospital in Mexico. **Clin Microbiol Infect** 8:S1198-743X(20)30790-4. Doi: 10.1016/j.cmi.2020.12.030.
- Vriens K, Cammue BP, Thevissen K (2014) Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. **Molecules** 19(8):12280-303. Doi: 10.3390/molecules190812280.
- 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, Thevissen K (2015) Synergistic activity of the plant defensin *HsAFP1* and caspofungin against *Candida albicans* biofilms and planktonic cultures. **PLoS ONE** 10(8):e0132701. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132701>.
- Wang J, Dou X, Song J, Lyu Y, Zhu X, Xu L, Li W, Shan A (2019) Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era. **Med Res Rev** 39(3):831-859. Doi: 10.1002/med.21542.
- Weisman LS (2003) Yeast vacuole inheritance and dynamics. **Annu Rev Genet** 37:435-60. Doi: 10.1146/annurev.genet.37.050203.103207.
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nat Protoc** 3(2):163–175. Doi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>.
- Wimley W, White SH (1996) Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. **Nat Struct Biol**, v. 3, n.10, p.842- 848, out.1996.
- Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, Wu Y, Zhang L, Yu Z, Fang M, Yu T, Wang Y, Pan S, Zou X, Yuan S, Shang Y (2020) Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. **Lancet Respir Med** 8(5):475-481. Doi: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5.

- Yang YF, Cheng KC, Tsai PH, Liu CC, Lee TR, Lyu PC (2009) Alanine substitutions of noncysteine residues in the cysteine stabilized $\alpha\beta$ -motif. **Protein Sci** 18(7):1498–1506. Doi: <https://doi.org/10.1002/pro.164>.
- Yount NY, Yeaman MR (2004) Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. **Proc Natl Acad Sci USA** 101(19):7363–7368. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0401567101>.
- Zasloff M (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc Natl Acad Sci USA** 84(15):5449–5453. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.84.15.5449>.
- Zhang Q, Ju Y, Ma Y, Wang T (2018) N-acetylcysteine improves oxidative stress and inflammatory response in patients with community acquired pneumonia: A randomized controlled trial. **Medicine (Baltimore)** 97(45):e13087. Doi: [10.1097/MD.00000000000013087](https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013087).

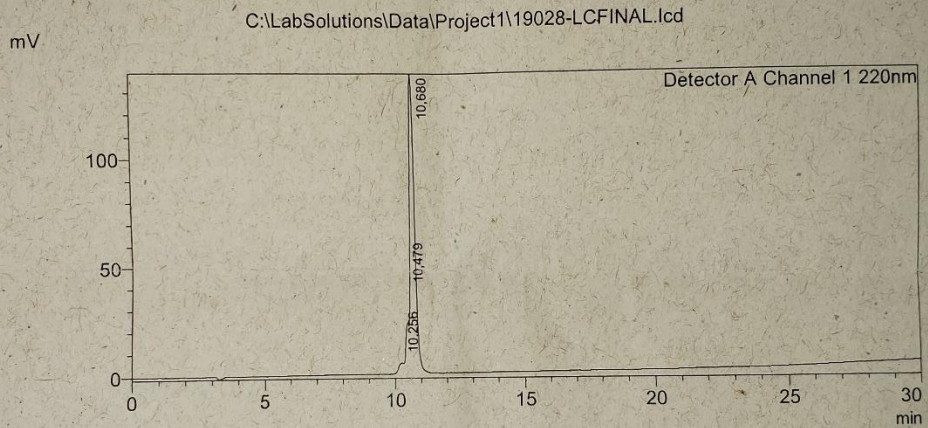
ANEXO 1

28/2/2019 11:54:15 1 / 1

AMINOTECH PESQUISA E DESENVOLVIMENTO - ANÁLISE POR HPLC

C:\LabSolutions\Data\Project1\19028-LCFINAL.lcd
Acquired by : System Administrator
Sample Name : 19028-LCFINAL
Sample ID : 19028-LCFINAL
Tray# : 1
Vial# : 1
Injection Volume : 20
Data File : C:\LabSolutions\Data\Project1\19028-LCFINAL.lcd
Method File : C:\LabSolutions\Data\Project1\AmT-AnalCOLETA-ISO.lcm
Report Format File : C:\LabSolutions\System\DEFAULT.lsr
Month-Day Acquired : 28/2/2019
Month-Day Processed : 28/2/2019

LSGRARDDVRAWATR-COOH



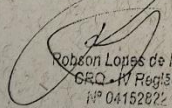
Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Area%	Height	Height%	Conc.	Mark
1	10,256	42395	2,207	4564	2,928	2,207	M
2	10,479	47425	2,469	13806	8,856	2,469	M
3	10,680	1830817	95,323	137514	88,216	95,323	M
Total		1920637	100,000	155883	100,000		

Condições de Análise

Coluna RP-C18, 4,6x250mm - Fluxo: 1mL/min
Solventes: A=TFA 0,1%/H₂O, B=CH₃CN/H₂O 9:1 com TFA 0,1%
Detector: 220nm - Gradiente: 5 a 100% de B em 25 min.

Químico Responsável:


Robson Lopes de Melo
CRQ - 4ª Região
nº 04152822

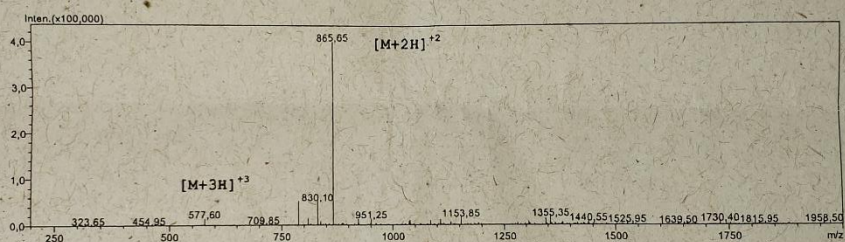
ESTE PRODUTO NÃO É DESTINADO PARA USO EM HUMANOS

C:\LabSolutions\Data\Project1\19028-LCFINAL.lcd

Análise por Espectrometria de Massas

LSGRARDDVRAWATR-COOH (Lote 19028)

Model: LCMS-2020	Entrance Lens: +20,0 V	M	1729,9
RF Gain: 5000	Interface: ESI	[M+H] ⁺	1730,9
RF Offset: 5100	Nebulizing Gas Flow: 1,50 L/min	[M+2H] ⁺²	866,0
Mainrod Bias: +5,0 V	Drying Gas Flow: 15,00 L/min	[M+3H] ⁺³	577,6
Conversion Dynode: +10,0 kV	Interface Bias: -3,50 kV	[M+4H] ⁺⁴	433,5
Detector: -1,10 kV	Interface Bias: -3,50 kV	[M+5H] ⁺⁵	347,0
PG: 0,0e+000 Pa	Interface Current: 0,0 uA	[M+6H] ⁺⁶	289,3
IG: 0,0e+000 Pa	Heat Block Temp.: 150 C		
DL Temp.: 150 C			



Químico Responsável:


Robson Lopes de Melo
CRQ - IV Região
nº 04152822

ESTE PRODUTO NÃO É DESTINADO PARA USO EM HUMANOS

ANEXO 2

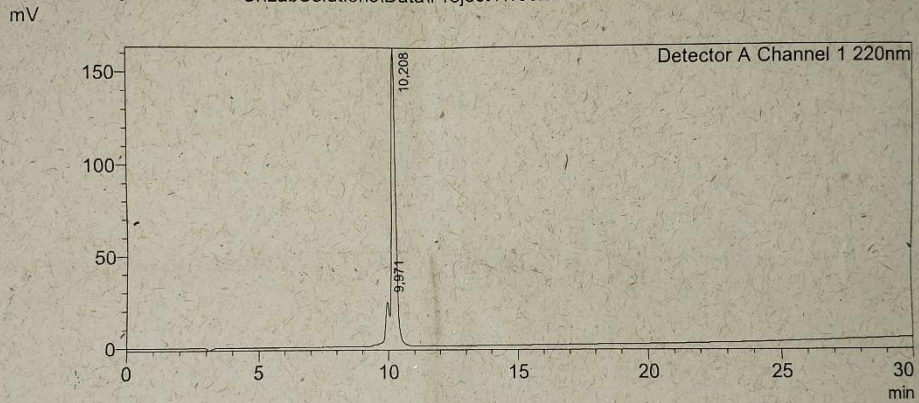
28/2/2019 13:03:00 1 / 1

AMINOTECH PESQUISA E DESENVOLVIMENTO - ANÁLISE POR HPLC

C:\LabSolutions\Data\Project1\19029-LCFINAL.lcd
Acquired by : System Administrator
Sample Name : 19029-LCFINAL
Sample ID : 19029-LCFINAL
Tray# : 1
Vial# : 1
Injection Volume : 20
Data File : C:\LabSolutions\Data\Project1\19029-LCFINAL.lcd
Method File : C:\LabSolutions\Data\Project1\AmT-AnalCOLETA-ISO.lcm
Report Format File : C:\LabSolutions\System\DEFAULT.lsr
Month-Day Acquired : 28/2/2019
Month-Day Processed : 28/2/2019

LSGRARRRVRAWATR-COOH

C:\LabSolutions\Data\Project1\19029-LCFINAL.lcd



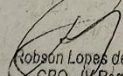
Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Area%	Height	Height%	Conc.	Mark
1	9,971	94999	4,738	20019	10,971	4,738	M
2	10,208	1910116	95,262	162452	89,029	95,262	M
Total		2005114	100,000	182472	100,000		

Condições de Análise

Coluna RP-C18, 4,6x250mm - Fluxo: 1mL/min
Solventes: A=TFA 0,1%/H2O, B=CH3CN/H2O 9:1 com TFA 0,1%
Detector: 220nm - Gradiente: 5 a 100% de B em 25 min.

Químico Responsável:


Robson Lopes de Melo
CRQ - IV Região
Nº 04152822

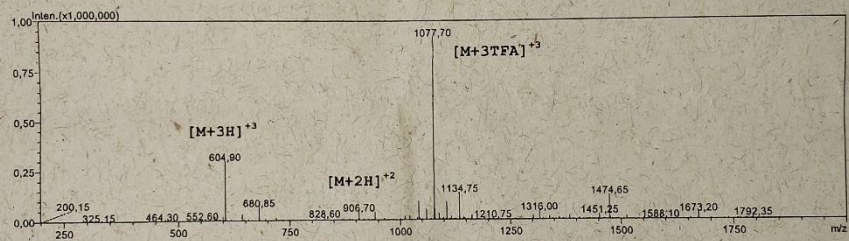
ESTE PRODUTO NÃO É DESTINADO PARA USO EM HUMANOS

C:\LabSolutions\Data\Project1\19029-LCFINAL.lcd

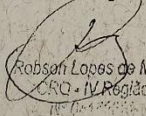
Análise por Espectrometria de Massas

LSGRARRRVRAWATR-COOH (Lote 19029)

Model: LCMS-2020	Entrance Lens: +20,0 V	M	1812,1
RF Gain: 5000	Interface: ESI	[M+H] ⁺	1813,1
RF Offset: 5100	Nebulizing Gas Flow: 1,50 L/min	[M+2H] ⁺²	907,1
Mainrod Bias: +5,0 V	Drying Gas Flow: 15,00 L/min	[M+3H] ⁺³	605,0
Conversion Dynode: +10,0 kV	Interface Bias: -3,50 kV	[M+4H] ⁺⁴	454,0
Detector: -1,10 kV	Interface Bias: -3,50 kV	[M+5H] ⁺⁵	363,4
PG: 0,0e+000 Pa	Interface Current: 0,0 uA	[M+6H] ⁺⁶	303,0
IG: 0,0e+000 Pa	Heat Block Temp.: 150 C		
DL Temp.: 150 C			



Químico Responsável:


Robson Lopes de Melo
CRQ - IV Região

ESTE PRODUTO NÃO É DESTINADO PARA USO EM HUMANOS

ANEXO 3

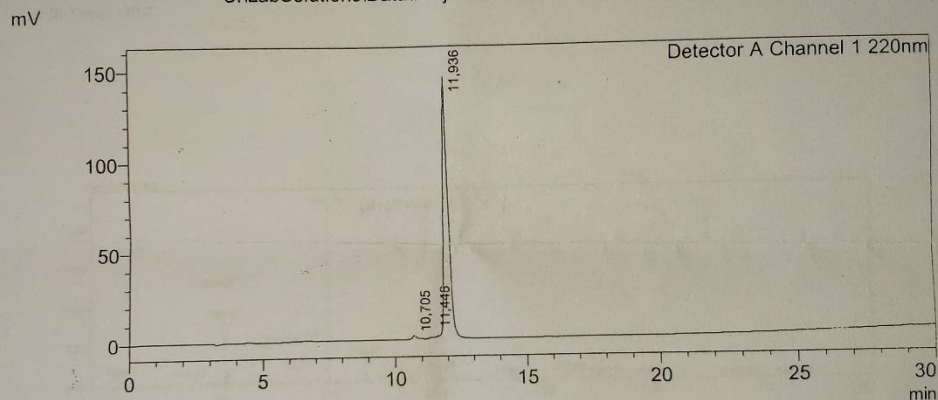
3/12/2019 12:50:31 1 / 1

AMINOTECH PESQUISA E DESENVOLVIMENTO - ANÁLISE POR HPLC

C:\LabSolutions\Data\Project1\19106R-LCFINAL-T09.lcd
 Acquired by : System Administrator
 Sample Name : 19106R-LCFINAL-T09
 Sample ID : 19106R-LCFINAL-T09
 Tray# : 1
 Vial# : 1
 Injection Volume : 20
 Data File : C:\LabSolutions\Data\Project1\19106R-LCFINAL-T09.lcd
 Method File : C:\LabSolutions\Data\Project1\AmT-AnalCOLETA-ISO.lcm
 Report Format File : C:\LabSolutions\System\DEFAULT.lsr
 Month-Day Acquired : 3/12/2019
 Month-Day Processed : 3/12/2019

LSGRWRRRRAWATR-COOH

C:\LabSolutions\Data\Project1\19106R-LCFINAL-T09.lcd



Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Area%	Height	Height%	Conc.	Mark
1	10,705	29274	1,433	2034	1,366	1,433	V
2	11,446	14553	0,712	1072	0,720	0,712	V
3	11,936	1998836	97,854	145793	97,914	97,854	SV
Total		2042662	100,000	148899	100,000		

Condições de Análise

Coluna RP-C18, 4,6x250mm - Fluxo: 1mL/min
 Solventes: A=TFA 0,1%/H2O, B=CH3CN/H2O 9:1 com TFA 0,1%
 Detector: 220nm - Gradiente: 5 a 100% de B em 25 min.

Químico Responsável:

Robson Lopes de Melo
 CRO - IV Região
 Nº 04152872

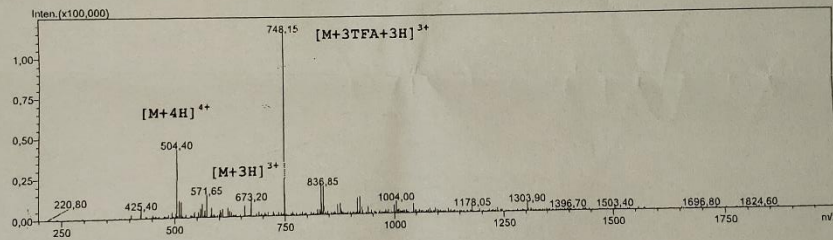
ESTE PRODUTO NÃO É DESTINADO PARA USO EM HUMANOS

C:\LabSolutions\Data\Project1\19106R-LCFINAL-T09.lcd

Análise por Espectrometria de Massas

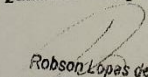
LSGRWRRRWAWATR-COOH (Lote 19106)

Model: LCMS-2020	Entrance Lens: +20,0 V	M	2013,1
RF Gain: 5000	Interface: ESI	[M+H] ⁺	2014,1
RF Offset: 5100	Nebulizing Gas Flow: 1,50 L/min	[M+2H] ⁺²	1007,6
Mainrod Bias: +5,0 V	Drying Gas Flow: 15,00 L/min	[M+3H] ⁺³	672,0
Conversion Dynode: +10,0 kV	Interface Bias: -3,50 kV	[M+4H] ⁺⁴	504,3
Detector: -1,10 kV	Interface Bias: -3,50 kV	[M+5H] ⁺⁵	403,6
PG: 0,0e+000 Pa	Interface Current: 0,0 uA	[M+6H] ⁺⁶	336,5
IG: 0,0e+000 Pa	Heat Block Temp.: 150 C		
DL Temp.: 150 C			



OBS. Peptídeo catiónico que apresenta alguns picos de agregado de trifluoroacetato, com mero artefato da análise.

Químico Responsável:


Robson Lopes de Melo
CRQ - IV Região
Nº 04152822

ESTE PRODUTO NÃO É DESTINADO PARA USO EM HUMANOS