PROCESSO DE MORTE CELULAR REGULADA EM FUNGOS INDUZIDA POR PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS BIOINSPIRADOS NO *γ-CORE* DA DEFENSINA DE *VIGNA UNGUICULATA* L. WALP. (FEIJÃO-DE-CORDA): CORRELAÇÃO ENTRE A HIPERPOLARIZAÇÃO MITOCONDRIAL, ESTRESSE OXIDATIVO E A PROTEÇÃO DA MORTE MEDIADA POR ÍONS

MARILUCIA DE CARVALHO RIBEIRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JUNHO DE 2026

PROCESSO DE MORTE CELULAR REGULADA EM FUNGOS INDUZIDA POR PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS BIOINSPIRADOS NO *γ-CORE* DA DEFENSINA DE *VIGNA UNGUICULATA* L. WALP. (FEIJÃO-DE-CORDA): CORRELAÇÃO ENTRE A HIPERPOLARIZAÇÃO MITOCONDRIAL, ESTRESSE OXIDATIVO E A PROTEÇÃO DA MORTE MEDIADA POR ÍONS

MARILUCIA DE CARVALHO RIBEIRO

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. André de Oliveira Carvalho

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos

- LFBM no Centro de Biociências e Biotecnologia - CBB.

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JUNHO DE 2026

PROCESSO DE MORTE CELULAR REGULADA EM FUNGOS INDUZIDA POR PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS BIOINSPIRADOS NO γ-CORE DA DEFENSINA DE *VIGNA UNGUICULATA* L. WALP. (FEIJÃO-DE-CORDA): CORRELAÇÃO ENTRE A HIPERPOLARIZAÇÃO MITOCONDRIAL, ESTRESSE OXIDATIVO E A PROTEÇÃO DA MORTE MEDIADA POR ÍONS

MARILUCIA DE CARVALHO RIBEIRO

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 Doutor em Biociências e Biotecnologia.

APROVADO EM: ___/___/_____

_____

Prof.ª Desiely Silva Gusmão
Instituto Federal Fluminense – IFF

_____

Prof. Sérgio Henrique Seabra
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

_____

Prof. Antônio Jesus Dorighetto Cogo
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

_____

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

DEDICO

Aos meus pais, Rose Mara e Luis Carlos, a meu marido Maycon, a minha filha Maria Alice, aos meus amigos Rodrigo e Thaynã e ao meu professor orientador André por todo apoio sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me sustentar nos momentos mais difíceis e por me conceder saúde, força e sabedoria para seguir adiante na busca por esta realização.

À minha mãe, **Rose Mara**, meu maior exemplo de força e perseverança, por nunca deixar de me incentivar, mesmo nos momentos em que eu própria duvidei da minha capacidade de alcançar meus objetivos. Suas palavras sempre me impulsionaram a continuar.

Ao meu marido **Carlos Maycon**, pelo apoio constante, pelos conselhos nos momentos decisivos e por estar sempre disposto a me ajudar, sendo fundamental em toda essa trajetória.

À minha filha **Maria Alice**, meu maior motivo de perseverança, que me inspira diariamente a enfrentar os caminhos mais difíceis e a buscar ser um exemplo de determinação e superação.

Ao Prof. **André de Oliveira Carvalho**, meu orientador, pela paciência, dedicação e confiança depositadas em mim. Seus ensinamentos foram essenciais para a construção deste trabalho e para a concretização deste sonho. Sou imensamente grata pela parceria e pelo incentivo ao longo de toda a caminhada.

Aos meus amigos **Rodrigo** e **Thaynã**, por toda a ajuda, companheirismo e ensinamentos ao longo da minha trajetória acadêmica, especialmente no desenvolvimento dos experimentos.

Aos técnicos do LFBM, pela manutenção e cuidado com o laboratório, em especial **Luis, Valéria, Zila e Noil**, que me auxiliaram na adaptação à rotina de trabalho em laboratório de manipulação de microrganismos durante o mestrado e o doutorado. Agradeço pelo apoio, pela colaboração e pela amizade.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem participar da minha defesa e por suas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

A todos os professores e funcionários do **PGBB**, pelo apoio e pelos ensinamentos ao longo desta formação.

À **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF)** e ao **Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia**, pela estrutura oferecida, pela concessão da bolsa, pelo apoio institucional e pela oportunidade de realizar este curso.

Agradeço também o apoio financeiro dado pelas agências brasileiras **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** (número 306429/2023-3), **Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)** (número E-26/210.484/2024, APQ1; número E-26/203.948/2024-Bolsa), **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** (Código Financeiro 001), a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (PAPIC, número SEI-260002/007051/2024 - AUXÍLIO).

RESUMO

RIBEIRO, Marilucia de Carvalho, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, maio de 2025**. Processo de morte celular regulada em fungos induzida por peptídeos antimicrobianos bioinspirados no ϒ-core da defensina de *Vigna unguiculata* L. Walp. (feijão-de-corda): correlação entre a hiperpolarização mitocondrial, estresse oxidativo e a proteção da morte mediada por íons**

Orientador: André de Oliveira Carvalho

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas catiônicas e anfipáticas, geralmente de baixo peso molecular, presentes em organismos de diferentes reinos — incluindo bactérias, plantas, invertebrados e vertebrados — como parte fundamental da imunidade inata. Caracterizam-se por estruturas ricas em resíduos carregados positivamente e regiões hidrofóbicas, o que lhes confere afinidade por membranas biológicas e capacidade de interagir com alvos intracelulares. Além da ação direta sobre a membrana plasmática, evidências crescentes indicam que muitos AMPs desencadeiam respostas celulares complexas, envolvendo disfunção mitocondrial, desequilíbrio redox e ativação de vias de morte celular regulada. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo investigar o envolvimento da mitocôndria, do estresse oxidativo e do balanço iônico na morte celular induzida pelos peptídeos bioinspirados RR, D-RR e WR em *Candida tropicalis* e *Candida albicans*. Os peptídeos induziram hiperpolarização significativa do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) a partir de 10 min de exposição, associada ao aumento da atividade das NAD-desidrogenases, evidenciando um estado de estresse bioenergético precoce e disfunção mitocondrial. A modulação desses efeitos por íons revelou papel central do desequilíbrio iônico na progressão da morte celular: a suplementação com Na^{+}, Mg^{+2} e Ca^{+2} preveniu tanto a hiperpolarização mitocondrial quanto a elevação da atividade metabólica, enquanto o K^{+}, embora revertesse o encolhimento celular, manteve a atividade mitocondrial elevada, indicando um efeito diferencial desse cátion sobre a fisiologia mitocondrial fúngica. As análises de espécies reativas de oxigênio (ROS) demonstraram perfis distintos entre os tratamentos, sugerindo que a produção de ROS não se origina majoritariamente da mitocôndria, apontando para fontes oxidativas alternativas envolvidas na citotoxicidade dos peptídeos. Adicionalmente, os peptídeos promoveram redução do volume celular, compatível com processos de morte celular regulada, efeito revertido pela adição dos íons, reforçando seu papel protetor. Em conjunto, os resultados demonstram que a ação letal dos peptídeos RR, D-RR e WR está associada à integração entre disfunção mitocondrial precoce, intensificação do metabolismo respiratório e colapso da homeostase iônica, acompanhados por aumento do estresse oxidativo, configurando eventos determinantes para o desencadeamento da morte celular em leveduras do gênero *Candida*.

Palavras-chave: Peptídeo Antimicrobiano, Antifúngico, Mitocondrias, Leveduras.

ABSTRACT

RIBEIRO, Marilucia de Carvalho, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, may of 2025**. Process of regulated cell death in fungi induced by antimicrobial peptides bioinspired by the ϒ-core of defensin from Vigna unguiculata L. Walp. (Cowpea): correlation between mitochondrial hyperpolarization, oxidative stress and protection from ion-mediated death**

Advisor: André de Oliveira Carvalho.

Antimicrobial peptides (AMPs) are cationic and amphipathic molecules, generally of low molecular weight, found in organisms from different kingdoms — including bacteria, plants, invertebrates, and vertebrates — as fundamental components of innate immunity. They are characterized by the presence of positively charged residues and hydrophobic regions, which confer high affinity for biological membranes and the ability to interact with intracellular targets. In addition to their direct effects on the plasma membrane, increasing evidence indicates that many AMPs trigger complex cellular responses involving mitochondrial dysfunction, redox imbalance, and activation of regulated cell death pathways. In this context, this study aimed to investigate the involvement of mitochondria, oxidative stress, and ionic homeostasis in cell death induced by the bioinspired peptides RR, D-RR, and WR in *Candida tropicalis* and *Candida albicans*. The peptides induced significant hyperpolarization of the mitochondrial membrane potential (Δψm) after 10 minutes of exposure, accompanied by increased NAD dehydrogenase activity, indicating early bioenergetic stress and mitochondrial dysfunction. Modulation of these effects by ions revealed a central role of ionic imbalance in the progression of cell death: supplementation with Na^{+}, Mg^{+2}, and Ca^{+2} prevented both mitochondrial hyperpolarization and the increase in metabolic activity, whereas K^{+}, although reversing cell shrinkage, maintained elevated mitochondrial activity, indicating a distinct effect of this cation on fungal mitochondrial physiology. Reactive oxygen species (ROS) analyses showed distinct profiles among treatments, suggesting that ROS production is not predominantly of mitochondrial origin and pointing to alternative oxidative sources involved in peptide-induced cytotoxicity. In addition, the peptides promoted a reduction in cell volume consistent with regulated cell death, an effect that was reversed by ion supplementation, reinforcing their protective role. Taken together, these results demonstrate that the lethal action of the peptides RR, D-RR, and WR is associated with the integration of early mitochondrial dysfunction, intensified respiratory metabolism, and collapse of ionic homeostasis, accompanied by increased oxidative stress, constituting key events in the triggering of cell death in *Candida* species.

Keywords: Antimicrobial Peptide, Antifungal, Mitochondria, Yeast.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 01. Representação esquemática das principais classes estruturais de AMPs. As estruturas usadas como exemplo foram resolvidas por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou difração de raio-X. Os aminoácidos foram coloridos de acordo com a escala de hidrofobicidade de Eisenberg (cinza claro – hidrofílico; vermelho – hidrofóbico) 05

Figura 02. Exemplos dos diferentes tipos de interações entre peptídeos antimicrobianos e membranas citoplasmáticas de bactérias 06

Figura 03. Padrões de sequência enantiomérica em peptídeos antimicrobianos contendo cisteína. Os representantes são, em ordem decrescente (nome do peptídeo, código de acesso GI do GenBank): α-defensinas (HNP-3, 229858); β-defensinas (mBD-8, 15826276); defensinas de insetos (phormicin, 118432); peptídeos CS-α de insetos (drosomicina, 2780893); peptídeos CS-α de plantas (Ah-AMP-1, 6730111); peptídeos CS-α de crustáceos (MGD-1, 12084380); protegrinas (protegrina-1, 3212589); big defensin (2493577); gaegurinas (gaegurina-1, 1169813); taquiplesinas (taquiplesina-1, 84665); polifemusinas (polyphemusin-1, 130777); mitilinas (mytilin A, 6225740); gomesina (20664097); thanatina (6730068); e AFP-1 (1421258)
..... 10

Figura 04. A. Alinhamento da estrutura primária da Vu-Defr e da defensina Vigna radiata 2 (PDB ID: 2GL1). As linhas abaixo dos resíduos de Cys (destacado em negrito) em Vu-Defr indica as pontes dissulfeto entre os resíduos. Os quatro resíduos de aminoácidos que diferem entre as duas estruturas primárias estão marcados em verde na sequência da VrD2 e também um resíduo de metionina adicional incluído na estrutura primária de Vu-Defr como requisito da clonagem é marcada em vermelho. Os resíduos de aminoácidos marcados em azul correspondem a região do γ-core. Os resíduos de aminoácidos indicados na caixa correspondem a região de loop. Os números acima da sequência indicam o tamanho do peptideo em aminoácidos. **B.** Estrutura tridimensional da Vu-Defr modelada com Modeller com base na estrutura de VrD2. Em cinza estão representados os elementos não estruturais, em vermelho representada α-hélice, azul claro representam folhas β, e em azul escuro representa a região do γ-core. **C.** Passos do design do peptídeo sintético. **D.** O mesmo que descrito em B) com o peptídeo sintético γ32-46Vu-Def indicado em roxo. E. Características bioquímicas do peptídeo sintético γ32-46Vu-Def 11

Figura 05. Representação esquemática do transporte de elétrons em *C. albicans*. Os elétrons provenientes do NADH são transferidos para o complexo I bombeador de prótons (C I) ou para as desidrogenases externas e internas de NADH. Em seguida, os elétrons são direcionados para a coenzima Q (CoQ), que também pode ser reduzida por elétrons derivados do succinato, canalizados através do complexo II (C II). Os elétrons coletados pela CoQ podem ser direcionados ao O_2 por meio da AOX, PAR ou da CRC bombeadora de prótons, contendo o complexo III (C III), o citocromo c (cyt c) e o complexo IV (C IV). A rotenona inibe o complexo I e a desidrogenase interna de NADH. O BHAM inibe a AOX, enquanto antimicina A e KCN inibem os complexos III e IV, respectivamente. O KCN também inibe a oxidase terminal PAR

..... 14

Figura 06. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com RR utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Nos ensaios, células de *C. tropicalis* foram incubadas com JC-1 (20 µM) por 50 min e RR (27,5 µM) por 5 e 10 min. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm 25

Figura 07. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com RR (27,5 µM) e K^+ (100 mM de KCl), utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. K^+: células incubadas com K^+. RR + K^+: células co-incubadas com K^+ e RR. 5 min e 10 min: células incubadas com K^+ por 10 e 5 min após a adição de RR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm 26

Figura 08. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com RR (27,5 µM) e Na^+ (100 mM de NaCl), utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Na^+: células incubadas com Na^+. RR + Na^+: células co-incubadas com Na^+ e RR. 5 min e 10 min: células incubadas com Na^+ por 10 e 5 min após a adição de RR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm 27

Figura 09. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com RR (27,5 µM) e Mg^{+2} (100 mM de $MgCl_2$), utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Mg^{+2}: células incubadas com Mg^{+2}. RR + Mg^{+2}: células co-incubadas com Mg^{+2} e RR. 5 min e 10 min: células incubadas com Mg^{+2} por 10 e 5 min após a adição de RR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm

..... 28

Figura 10. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com RR (27,5 µM) e Ca^{+2} (100 mM de $CaCl_2$), utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Ca^{+2}: células incubadas com Ca^{+2}. RR + Ca^{+2}: células co-incubadas com Ca^{+2} e RR. 5 min e 10 min: células incubadas com Ca^{+2} por 10 e 5 min após a adição de RR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm
..... 29

Figura 11. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em células de *Candida tropicalis* tratadas com RR utilizando a sonda 2',7'-dicloroflurescеína diacetato por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com 20 µM da sonda por 30 min. Controle negativo: células incubadas com Triton X-100 a 2% e 20 µM da sonda por 30 min. Controle positivo: células incubadas com 333 mM de ácido acético (AcA). Controle com K^+, Na^+, Mg^{+2}, Ca^{+2}: células incubadas com 20 µM da sonda por 30 min e os diferentes íons (100 mM dos sais KCl, ou NaCl, ou $MgCl_2$, ou $CaCl_2$). RR + K^+, RR + Na^+, RR + Mg^{+2} e RR + Ca^{+2}: células de *C. tropicalis* foram co-incubadas com a sonda e 27,5 µM do peptídeo RR os íons indicados. K^+ 5 e 10 min, Na^+ 5 e 10 min, Mg^{+2} 5 e 10 min e Ca^{+2} 5 e 10 min: células de *C. tropicalis* tratadas com 27,5 µM de RR por 20 e 25 min e posteriormente incubadas com os íons indicados por 5 min e 10 min. Barras = 10 µm
..... 32

Figura 12. Avaliação da viabilidade celular de *Candida tropicalis* tratada com a dose letal (27,5 µM) do peptídeo RR nos tempos de 0 (apenas no tempo necessário para a montagem do experimento) 30 min e 60 min após a exposição. UFC: unidades formadoras de colônias. O controle consistiu em células submetidas ao mesmo procedimento, porém sem adição do peptídeo. O percentual de perda da viabilidade celular foi calculado considerando UFC do controle como 100% de viabilidade. **** $P < 0,0001$. O ensaio é representativo de um ensaio independente de três
..... 34

Figura 13. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com D-RR, utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Nos ensaios, células de *C. tropicalis* foram incubadas com JC-1 (20 µM) por 50 min e D-RR (23 µM) por 5 e 10 min. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm
..... 35

Figura 14. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com D-RR (23 µM) e K^+ (100 mM de KCl), utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. K^+: células incubadas com KCl. D-RR + K^+: células co-incubadas com K^+ e D-RR. 5 e 10 min: células incubadas com K^+ por 5 e 10 min da adição de D-RR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm 36

Figura 15. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com D-RR (23 µM) e Na^+ (100 mM de NaCl), utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Na^+: células incubadas com Na^+. D-RR + Na^+: células co-incubadas com Na^+ e D-RR. 5 min e 10 min: células incubadas com Na^+ após 5 e 10 min da adição de D-RR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm 37

Figura 16. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com D-RR (23 µM) e Mg^{+2} (100 mM de $MgCl_2$), utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Mg^{+2}: células incubadas com $MgCl_2$. D-RR + Mg^{+2}: células co-incubadas com Mg^{+2} e D-RR. 5 min e 10 min: células incubadas com Mg^{+2} por 5 e 10 min da adição de D-RR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm 38

Figura 17. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com D-RR (23 µM) e Ca^{+2} (100 mM de $CaCl_2$), utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Ca^{+2}: células incubadas com $CaCl_2$. D-RR + Ca^{+2}: células co-incubadas com Ca^{+2} e D-RR. 5 min e 10 min: células incubadas com $CaCl_2$ após 5 e 10 min da adição de D-RR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm 39

Figura 18. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em células de *Candida tropicalis* tratadas com D-RR utilizando a sonda 2',7'-dicloroflurescеína diacetato por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com 20 µM da sonda por 30 min. Controle negativo: células incubadas com Triton X-100 a 2% e 20 µM da sonda por 30 min. Controle positivo: células incubadas com 333 mM de ácido acético (AcA). Controle com K^+, Na^+, Mg^{+2}, Ca^{+2}: células incubadas com 20 µM da sonda por 30 min e os diferentes íons (100 mM dos sais KCl, ou NaCl, ou $MgCl_2$, ou $CaCl_2$). D-RR + K^+, D-RR + Na^+, D-RR + Mg^{+2} e D-RR + Ca^{+2}: células de *C. tropicalis* foram co-incubadas com a sonda e 23 µM do peptídeo RR os íons indicados. K^+ 5 e 10 min, Na^+ 5 e 10 min, Mg^{+2} 5 e 10 min e Ca^{+2} 5 e 10 min: células de *C. tropicalis* tratadas com 23 µM de D-RR por 20 e 25 min e posteriormente incubadas com os íons indicados por 5 min e 10 min. Barras em 10 µm 42

Figura 19. Avaliação da viabilidade celular de *Candida tropicalis* tratada com a dose letal (23 µM) do peptídeo D-RR nos tempos de 0 (apenas no tempo necessário para a montagem do experimento) 30 min e 60 min após a exposição. UFC: unidades formadoras de colônias. O controle consistiu em células submetidas ao mesmo procedimento, porém sem adição do peptídeo. O percentual de perda da viabilidade celular foi calculado considerando UFC do controle como 100% de viabilidade. **** $P < 0,0001$. O ensaio é representativo de um ensaio independente de três
..... 44

Figura 20. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida albicans* tratadas com WR, utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 30 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 30 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Nos ensaios, células de *C. albicans* foram incubadas com JC-1 (20 µM) por 30 min e WR (27,5 µM) por 5 e 10 min. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm 45

Figura 21. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida albicans* tratadas com WR, utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 30 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 30 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. K^+: células incubadas com K^+. WR + K^+: células co-incubadas com K^+ e WR.. 5 min e 10 min: células incubadas com K^+ por 5 e 10 min após a adição de WR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde Barras de escala = 10 µm 46

Figura 22. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida albicans* tratadas com WR, utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 30 min.

Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 30 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Na^+: células incubadas com Na^+. WR + Na^+: células co-incubadas com Na^+ e WR. 5 min e 10 min: células incubadas com Na^+ por 5 e 10 min após a adição de WR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm 47

Figura 23. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida albicans* tratadas com WR, utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 30 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 30 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Mg^{+2}: células incubadas com Mg^{+2}. WR + Mg^{+2}: células co-incubadas com Mg^{+2} e WR. 5 min e 10 min: células incubadas com Mg^{+2} por 5 e 10 min após a adição de WR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm 48

Figura 24. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida albicans* tratadas com WR, utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 30 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 30 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Ca^{+2}: células incubadas com Ca^{+2}. WR + Ca^{+2}: células co-incubadas com Ca^{+2} e WR. 5 min e 10 min: células incubadas com Ca^{+2} por 5 e 10 min após a adição de WR.A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. As imagens foram adquiridas com excitação/emissão em 514/529 nm (verde) e 514/590 nm (vermelho). Barras de escala = 10 µm 49

Figura 25. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em células de *Candida albicans* tratadas com WR utilizando a sonda 2',7'-dicloroflurescéina diacetato por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com 20 µM da sonda por 30 min. Controle negativo: células incubadas com Triton X-100 a 2% e 20 µM da sonda por 30 min. Controle positivo: células incubadas com 333 mM de ácido acético (AcA). Controle com K^+, Na^+, Mg^{+2}, Ca^{+2}: células incubadas com 20 µM da sonda por 30 min e os diferentes íons (200 mM dos sais KCl, ou NaCl, ou $MgCl_2$, ou $CaCl_2$). WR + K^+, WR + Na^+, WR + Mg^{+2} e WR + Ca^{+2}: células de *C. albicans* foram co-incubadas com a sonda e 27,5 µM do peptídeo WR os íons indicados. K^+ 5 e 10 min, Na^+ 5 e 10 min, Mg^{+2} 5 e 10 min e Ca^{+2} 5 e 10 min: células de *C. albicans* tratadas com 27,5 µM de WR por 20 e 25 min e posteriormente incubadas com os íons indicados por 5 min e 10 min. Barras = 10 µm 52

Figura 26. Avaliação da viabilidade celular de *Candida albicans* tratada com a dose letal (27,5 µM) do peptídeo WR nos tempos de 0 (apenas no tempo

necessário para a montagem do experimento) e 30 min após a exposição. UFC: unidades formadoras de colônias. O controle consistiu em células submetidas ao mesmo procedimento, porém sem adição do peptídeo. O percentual de perda de viabilidade celular foi calculado considerando UFC do controle como 100% de viabilidade. **** P < 0,0001. O ensaio é representativo de um ensaio independente de três
..... 53

Figura 27. Ensaio de viabilidade celular com células de *Candida tropicalis* na presença de azida sódica em diferentes tempos após o tratamento com RR. No controle, as células foram incubadas com meio. Para controle positivo, células foram incubadas com 1 mM azida sódica. Para o teste, as células foram incubadas com 27,5 µM RR e a azida sódica foi pós-incubada com 5 e 10 min após a adição do RR. UFC: unidades formadoras de colônias. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos considerando que o controle representa 100% de viabilidade celular. **** P < 0,0001. O ensaio é representativo de um ensaio independente de três
..... 55

Figura 28. Ensaio de viabilidade celular com células de *Candida tropicalis* na presença de azida sódica em diferentes tempos após o tratamento com D-RR. No controle, as células foram incubadas com meio. Para controle positivo, células foram incubadas com 1 mM azida sódica. Para o teste, as células foram incubadas com 23 µM D-RR e a azida sódica foi pós-incubada com 5 e 10 min após a adição do D-RR. UFC: unidades formadoras de colônias. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos considerando que o controle representa 100% de viabilidade celular. **** P < 0,0001. O ensaio é representativo de um ensaio independente de três
..... 55

Figura 29. Ensaio de viabilidade celular com células de *Candida albicans* na presença de azida sódica em diferentes tempos após o tratamento com WR. No controle, as células foram incubadas com meio. Para controle positivo, células foram incubadas com 1 mM azida sódica. Para o teste, as células foram incubadas com 27,5 µM WR e a azida sódica foi pós-incubada com 5 e 10 min após a adição do WR. UFC: unidades formadoras de colônias. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos considerando que o controle representa 100% de viabilidade celular. **** P < 0,0001. O ensaio é representativo de um ensaio independente de três
..... 56

Figura 30. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* e *Candida albicans* utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas com 20 µM da sonda por 50 min. Controle negativo: células incubadas com Triton X-100 a 2% e 20 µM da sonda JC-1 por 50 min. No teste, células tratadas com 1 mM de azida sódica por 10 min adicionado após 40 min da adição da sonda JC-1. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm
..... 57

Figura 31. Determinação da atividade metabólica mitocondrial utilizando WST-1 na presença de azida sódica (NaN_3). Os valores acima das barras de teste indicam a atividade mitocondrial em comparação com o controle para cada tempo estudado. Os controles correspondem a células de levedura cultivadas em meio, enquanto o controle positivo corresponde ao tratamento Triton X-100. **** P < 0,0001; O ensaio é representativo de um ensaio independente de três 58

Figura 32. Determinação da atividade metabólica mitocondrial utilizando WST-1 na presença de azida sódica (NaN_3). Os valores acima das barras de teste indicam a atividade mitocondrial em comparação com o controle para cada tempo estudado. Os controles correspondem a células de levedura cultivadas em meio, enquanto o controle positivo corresponde ao tratamento Triton X-100. **** P < 0,0001; O ensaio é representativo de um ensaio independente de três 58

TABELAS

Tabela 01. Principais classes de antifúngicos, mecanismos de ação e mecanismos de resistência associados 02

Tabela 02. Principais classes de peptídeos antimicrobianos de origem vegetal e suas características gerais 07

Tabela 03. Estrutura primária e propriedades biofísicas dos peptídeos desenhados baseados no *γ-core* da defensina *Vu*Def1. 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* 13

Tabela 04. Avaliação da atividade mitocondrial por redução de WST-1 a formazan em células de *Candida tropicalis* tratadas com RR isoladamente ou em combinação dos íons K^+, Na^+, Mg^{+2}, Ca^{+2} nos tempos indicados 30

Tabela 05. Avaliação da atividade mitocondrial por redução de WST-1 a formazan em células de *Candida tropicalis* tratadas com D-RR isoladamente ou em combinação dos íons K^+, Na^+, Mg^{+2}, Ca^{+2} nos tempos indicados 40

Tabela 06. Avaliação da atividade mitocondrial por redução de WST-1 a formazan em células de *Candida albicans* tratadas com WR isoladamente ou em combinação dos íons K^+, Na^+, Mg^{+2}, Ca^{+2} nos tempos indicados 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido ascórbico

AcA – Ácido acético

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

ATP – Adenosina trifosfato

cDNA – DNA complementar

CoQ – Coenzima Q

$CoQH_2$ – Coenzima Q10

CTE – Cadeia transportadora de elétrons

D – Conformação dextrogira (D-enantiômeros)

DD – $A_{36,42,44}\gamma_{32–46}$*Vu*Def, peptídeo sintético de 15 aminoácidos bioinspirado no *γ-core* da defensina de planta *Vu*-Def1

dAMPs – Peptídeos antimicrobianos projetados (do inglês *designed AMPs*)

DL_{100} – Dose letal definida como a quantidade do peptídeo (em μM) que, administrada em dose única, causa a morte de toda a população celular do ensaio

D-RR – D-$A_{36,42,44}R_{37,38}\gamma_{32–46}$*Vu*Def, peptídeo sintético de 15 aminoácidos bioinspirado no *γ-core* da defensina de planta *Vu*-Def1

H^+ – Íon hidrogênio (próton)

H_2DCFDA – 2',7'-diacetato diclorofluoresceína

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

HCl – Ácido clorídrico

JC-1 – Corante fluorescente catiônico utilizado para medir o potencial de membrana mitocondrial

LTPs – Proteínas transportadoras de lipídeos (do inglês *lipid transfer proteins*)

mM – Milimolar

MOMP – Permeabilização da membrana externa mitocondrial (do inglês *mitochondria outer membrane permeabilization*)

μL – Microlitro

μM – Micromolar

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NaN_3 – Azida sódica

$O_2^{\bullet -}$ – Superóxido

OMS – Organização Mundial da Saúde

pH – Potencial hidrogeniônico

PTP – Poro de permeabilidade mitocondrial

RCD – Morte celular regulada (do inglês *regulated cell death*)

ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*)

RR – $A_{36,42,44}R_{37,38}\gamma_{32–46}$VuDef, peptídeo sintético de 15 aminoácidos bioinspirado no *γ-core* da defensina de planta Vu-Def1

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa

TP4 – Piscidina 4

UCP-2 – Proteína desacopladora 2

UFC – Unidade formadora de colônias

Vu-Def1 – *Vigna unguiculata* defensin one

WR – $A_{42,44}R_{37,38}W_{36–39}\gamma_{32–46}$*Vu*-Def, peptídeo sintético de 15 aminoácidos bioinspirado no γ-core da defensina de planta *Vu*-Def1

WST-1 – Sal de tetrazólio

ΔpH – Força próton-motriz

Δψm – Potencial transmembrana mitocondrial

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS iv
RESUMO vi
ABSTRACT vii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS viii
TABELAS xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS xvi
INTRODUÇÃO 1
1.4 Defensinas de plantas: *Vu*-Def1 como modelo para o design de peptídeos 8
1.5 Mitocôndria: Correlação entre os processos de morte celular em fungos 13
1.6 Íons inorgânicos: homeostase iônica em fungos 16
2. OBJETIVOS 17
2.1. Objetivo geral 17
2.2. Objetivos específicos 17
3. MATERIAIS E MÉTODOS 18
3.1. Peptídeos antimicrobianos 18
3.2. Microrganismos 18
3.3. Análise do envolvimento mitocondrial na morte celular induzida pelos peptídeos bioinspirados sobre fungos do gênero *Candida* 18
3.3.1. Determinação da funcionalidade mitocondrial em células de *C. tropicalis* e *C. albicans* tratadas com os peptídeos bioinspirados 18
3.3.2. Efeito dos íons K^+, Na^+, Mg^{+2} e Ca^{+2} sobre o potencial de membrana mitocondrial em células de *C. tropicalis* e *C. albicans* 20
3.3.3. Quantificação da NAD desidrogenases com reagente WST-1 20
3.3.4. Ensaio de determinação da indução de ROS intracelular em células *C. tropicalis* e *C. albicans* tratadas com os peptídeos 21
3.3.5. Determinação da indução de ROS intracelular em células *C. tropicalis* e *C. albicans* tratadas com os peptídeos com pós-incubação com os íons 22
3.3.6 Análise de viabilidade celular nos tempos iniciais da incubação com os peptídeos 22
3.3.7. Analise do bloqueio do potencial de membrana mitocondrial na morte celular induzida pelos peptídeos bioinspirados por azida sódica 23
3.3.8. Determinação da funcionalidade mitocondrial das células de *C. tropicalis* e *C. albicans* pré-incubadas com azida sódica 23
3.3.9. Quantificação da atividade metabólica mitocondrial com reagente WST-1 na presença de azida sódica 24
3.10. Analises estatísticas 24
4. RESULTADOS 24
4.1. Análise do envolvimento mitocondrial na morte celular induzida pelos peptídeos bioinspirados RR, D-RR e WR sobre fungos do gênero *Candida* 24
4.1.2 Atividade do Peptídeo WR em *Candida albicans* 45
4.2 Análise do envolvimento mitocondrial na morte celular induzida pelos peptídeos

bioinspirados sobre fungos do gênero *Candida* por azida sódica 54
5. DISCUSSÃO 59
5.1 Análise do envolvimento mitocondrial na morte celular induzida pelos peptídeos bioinspirados RR, D-RR e WR sobre fungos do gênero *Candida* 59
5.2 Inibição do complexo IV pela azida sódica e sua influência sobre os efeitos mitocondriais induzidos pelos peptídeos bioinspirados 66
6. CONCLUSÃO 68
REFERÊNCIAS 69

INTRODUÇÃO

1.1 Aspactos gerais

As doenças fúngicas vêm se consolidando como um desafio global significativo, com impactos diretos na saúde humana, no meio ambiente e na segurança alimentar. No meio ambiente, infecções causadas por fungos têm sido associadas à redução drástica de populações de animais silvestres, como morcegos e anfíbios, gerando importantes desequilíbrios ecológicos. Na agricultura, os prejuízos decorrentes de fitopatógenos fúngicos comprometem a produtividade e colocam em risco a segurança alimentar global — um cenário ainda mais preocupante frente às projeções de crescimento populacional, que indicam uma população mundial de aproximadamente 9,8 bilhões de pessoas até 2050 (FAO, 2017; FISHER et al., 2022).

No campo da saúde pública, observa-se um aumento alarmante na incidência de infecções fúngicas, que variam de manifestações superficiais, como micoses cutâneas, a quadros sistêmicos potencialmente fatais, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Estima-se que essas infecções afetem mais de 1 bilhão de pessoas anualmente, resultando em cerca de 3,75 milhões de mortes por ano, número que ultrapassa as mortes causadas por malária e tuberculose. Além disso, o crescimento da resistência fúngica aos antifúngicos clínicos, especialmente em espécies como *Candida* e *Aspergillus*, representa um agravante preocupante para o controle dessas infecções (ASHRAF et al., 2020; DENNING et al., 2024).

Nesse contexto, os antifúngicos constituem o principal recurso terapêutico para o tratamento das infecções fúngicas. Entretanto, diferentemente do que ocorre com os antibióticos utilizados no tratamento de infecções bacterianas, o número de classes de antifúngicos disponíveis é relativamente limitado. Atualmente, apenas cinco classes principais são empregadas na prática clínica: polienos, azóis, equinocandinas, alilaminas e análogos de pirimidina. Essa limitação decorre, em grande parte, da elevada similaridade estrutural e metabólica entre células fúngicas e células eucarióticas do hospedeiro, o que reduz o número de alvos terapêuticos seletivos e dificulta o desenvolvimento de novos fármacos (LEE et al., 2023; CZAJKA, 2023).

Somado a essa disponibilidade restrita de classes farmacológicas, o aumento da resistência antifúngica tem se tornado um desafio crescente para a saúde pública. Espécies patogênicas, particularmente do gênero *Candida*, apresentam diversos mecanismos adaptativos capazes de reduzir a eficácia dos fármacos. Entre esses mecanismos destacam-se modificações no alvo molecular do medicamento, superexpressão de bombas de efluxo, alterações na biossíntese de ergosterol e a

formação de biofilmes, que contribuem para a diminuição da suscetibilidade aos antifúngicos (LEE et al., 2023; CZAJKA, 2023; REVIE et al., 2018). Como consequência, as opções terapêuticas tornam-se cada vez mais limitadas, dificultando o manejo clínico de infecções fúngicas invasivas.

Diante desse cenário, torna-se fundamental compreender os principais mecanismos de ação dos antifúngicos e as estratégias de resistência desenvolvidas pelos fungos. A Tabela 1 apresenta as principais classes de antifúngicos utilizadas na clínica, bem como seus mecanismos de ação e os mecanismos de resistência mais frequentemente descritos.

Tabela 01. Principais classes de antifúngicos, mecanismos de ação e mecanismos de resistência associados.

Classe de antifúngico	Principais fármacos	Mecanismo de ação	Mecanismos de resistência
Polienos	Anfotericina B, nistatina	Ligam-se ao ergosterol da membrana plasmática fúngica, formando poros que levam ao extravasamento de íons e morte celular	Redução ou alteração do conteúdo de ergosterol na membrana; modificações na via de biossíntese de esteróis
Azóis	Fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol	Inibição da enzima lanosterol 14α-desmetilase (ERG11), bloqueando a biossíntese de ergosterol	Mutação ou superexpressão de ERG11; aumento de bombas de efluxo (CDR, MDR); alterações na via do ergosterol
Equinocandinas	Caspofungina, micafungina,	Inibição da enzima β-1,3-glucano sintase,	Mutação nos genes

	anidulafungina	comprometendo a síntese da parede celular fúngica	FKS1/FKS2, que codificam a glucano sintase
Alilaminas	Terbinafina	Inibição da esqualeno epoxidase, enzima da via de biossíntese do ergosterol	Mutação ou superexpressão do gene SQLE; alterações na via do ergosterol
Análogos de pirimidina	Flucitosina	Conversão intracelular em 5-fluorouracil, interferindo na síntese de RNA e DNA	Perda ou mutação de transportadores e enzimas envolvidas na conversão da droga (FCY1, FCY2, FUR1)

Assim, a combinação entre o número limitado de classes antifúngicas e o surgimento crescente de mecanismos de resistência representa um desafio significativo para o tratamento de infecções fúngicas, reforçando a necessidade de desenvolvimento de novas moléculas antifúngicas e estratégias terapêuticas alternativas (LEE et al., 2023; CZAIJKA, 2023; REVIE et al., 2018).

Destaca-se a emergência da levedura *Candida auris*, identificada pela primeira vez em 2009, que apresenta resistência a múltiplas classes de antifúngicos e alta persistência em ambientes hospitalares. Diante desse cenário, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou, em 2022, a primeira lista global de patógenos fúngicos prioritários, classificando *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* e *Candida auris* como patógenos de prioridade crítica, reforçando a necessidade de novas abordagens terapêuticas e estratégias de controle (WHO, 2022).

1.2 Peptídeos antimicrobianos: uma abordagem terapêutica

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) constituem uma classe diversa de moléculas bioativas que vêm despertando grande interesse científico devido ao seu potencial terapêutico. São sintetizados nos ribossomos a partir de genes codificadores e compostos por L-aminoácidos, geralmente com menos de 100 resíduos. Apresentam estruturas lineares ou cíclicas, com ampla variabilidade em sequência, conformação e estrutura tridimensional. Muitos desses peptídeos são ricos em resíduos de cisteína, o que possibilita a formação de pontes dissulfeto, conferindo-lhes alta estabilidade estrutural e resistência a condições extremas, como variações de temperatura, pH e atividade proteolítica (SILVA e MACHADO, 2012; HEGEDÜS e MARX, 2013; ROSCIA et al., 2013).

Nos organismos multicelulares (metazoários), os AMPs são produzidos como parte da resposta imune inata, sendo sintetizados ou induzidos frente à detecção de patógenos. Em microrganismos, por sua vez, os AMPs podem ser secretados para inibir ou eliminar competidores (MORETTA et al., 2021). Importante destacar que, em geral, esses peptídeos apresentam baixa ou nenhuma toxicidade para células de animais, o que amplia sua aplicabilidade biomédica (IZADPANAH e GALLO, 2005; HOSKIN e RAMAMOORTHY, 2008).

As estruturas dos AMPs são altamente diversas, o que está diretamente relacionado à sua versatilidade funcional. Suas conformações podem incluir: (i) α-hélices, como observado nas magaininas (encontradas na pele do sapo *Xenopus laevis*), cecropinas (insetos) e catelicidinas (mamíferos); (ii) folhas β, como na α-defensina 1 humana; (iii) combinação de α-hélices e folhas β, como nas β-defensinas e defensinas vegetais; (iv) estruturas cíclicas, como os ciclotídeos presentes em algumas plantas; e (v) formas lineares ou com *loops* flexíveis, como nas indolicidinas de neutrófilos bovinos (Fig. 01). Essa diversidade estrutural está associada à ampla gama de ações antimicrobianas dos AMPs (SILVA et al., 2011; BIN HAFEEZ et al., 2021).

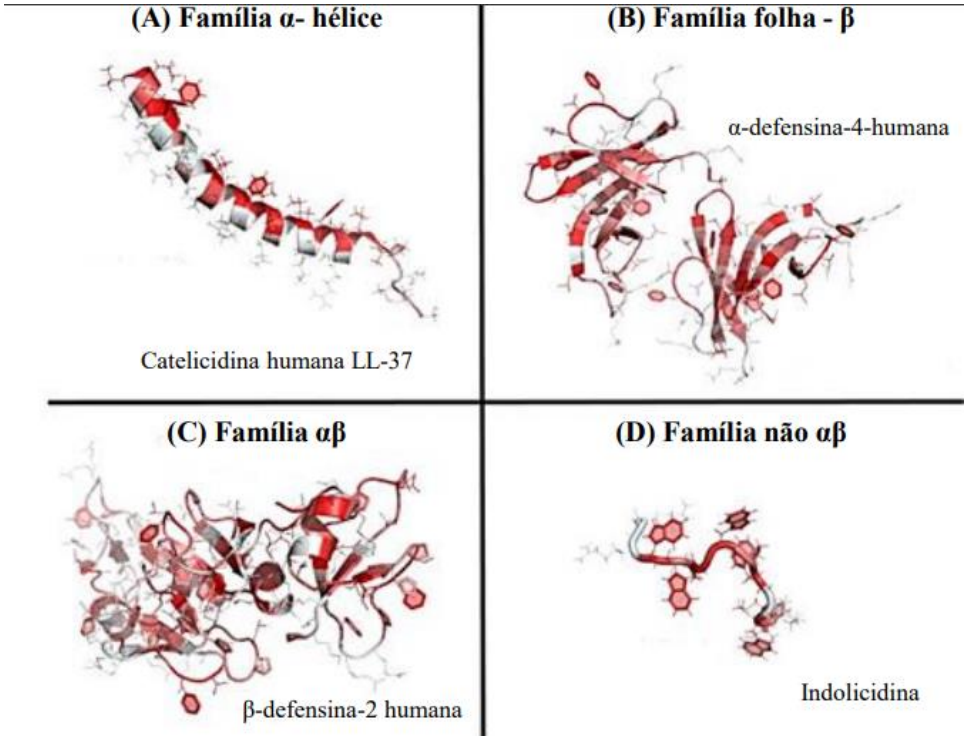


Figura 01. Representação esquemática das principais classes estruturais de AMPs. As estruturas usadas como exemplo foram resolvidas por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou difração de raio-X. Os aminoácidos foram coloridos de acordo com a escala de hidrofobicidade de Eisenberg (cinza claro – hidrofílico; vermelho – hidrofóbico). Adaptado de RONČEVIĆ et al. (2019).

A maioria dos AMPs possui caráter catiônico em pH fisiológico, devido à presença de resíduos de lisina e arginina, o que favorece a interação com as membranas carregadas negativamente dos microrganismos, sendo essa interação essencial para sua atividade antimicrobiana. Além disso, a presença de múltiplos resíduos de cisteína, frequentemente formando de 2 a 4 pontes dissulfeto, confere estabilidade a essas moléculas, mesmo sob condições físico-químicas adversas (BROEKAERT et al., 1997; BENKO-ISEPPON et al., 2010; SHABIR et al., 2018).

Os AMPs atuam principalmente por meio de interações com a membrana plasmática dos microrganismos, levando à sua desestabilização e morte. Três modelos clássicos de ação — baseados em experimentos com membranas bacterianas — são amplamente aceitos: aduela de barril, poro toroidal e modelo tapete (Fig. 02) (MOOKHERJEE et al., 2020).

No modelo de aduela de barril, os AMPs se inserem na membrana formando poros, com seus resíduos hidrofóbicos voltados para a bicamada lipídica e os hidrofílicos voltados para o interior do poro. No modelo de poro toroidal, os peptídeos induzem a

curvatura da membrana, arrastando os lipídios consigo e formando um poro contínuo composto por lipídios e peptídeos. Já no modelo tapete, os AMPs se alinham sobre a superfície da membrana como um "tapete" anfipático, desorganizando-a de forma semelhante a um detergente, o que leva à sua ruptura. A ação detergente é geralmente dependente da concentração do peptídeo (BOTO; DE LA LASTRA; GONZÁLEZ, 2018).

Os AMPs apresentam não apenas atividades antimicrobiana e antifúngica, mas também propriedades antitumorais e imunomoduladoras, funcionando como moléculas sinalizadoras no sistema imunológico. Essas características tornam os AMPs candidatos promissores ao desenvolvimento de novas terapias profiláticas e curativas (GIULIANI; PIRRI; NICOLETTO, 2007; PUSHPANATHAN; GUNASEKARAN; RAJENDHRAN, 2013). Diante do aumento da resistência microbiana aos fármacos convencionais, cresce o interesse por fontes naturais de compostos antimicrobianos, como microrganismos, plantas, vertebrados e invertebrados (CARVALHO et al., 2001)

Dentre essas fontes, os AMPs vegetais têm se destacado devido à sua baixa toxicidade para o hospedeiro e seus múltiplos mecanismos de ação antifúngica, incluindo a interação com lipídios específicos da membrana celular, indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e promoção de estresse na parede celular dos patógenos (TAVARES et al., 2008; ISHAAQ; BILAL; IQBAL, 2019).

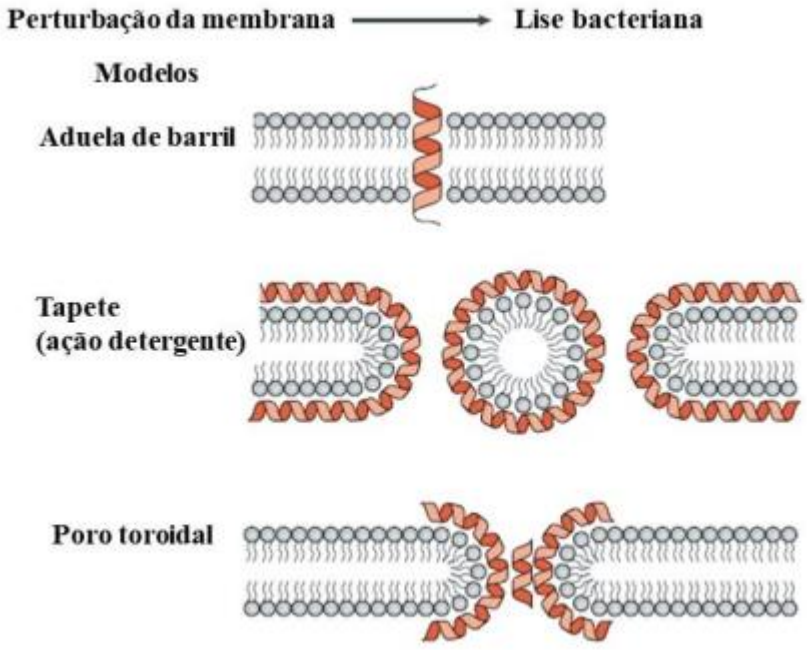


Figura 02. Exemplos dos diferentes tipos de interações entre peptídeos antimicrobianos e membranas citoplasmáticas de bactérias. Fonte: Adaptado de Mookherjee et al. (2020).

1.3 Peptídeos antimicrobianos de plantas

Por serem organismos sésseis, as plantas não podem se locomover para evitar condições adversas, e por isso desenvolveram mecanismos de defesa altamente especializados para lidar com estresses bióticos e abióticos (GACHOMO; SEUFFERHELD; KOTCHONI, 2010). Dentre esses mecanismos, destaca-se a produção de compostos antimicrobianos, especialmente os AMPs, que desempenham papel essencial na proteção contra patógenos e estresses ambientais (BIN HAFEEZ et al., 2021; MARÓTI et al., 2011). Desde sua descoberta, os AMPs de origem vegetal têm sido amplamente estudados, sendo conhecidos por sua eficácia antimicrobiana e por apresentarem estruturas e funções conservadas entre diferentes espécies (SRIVASTAVA, 2021). Essas moléculas foram agrupadas em famílias com base principalmente na estrutura primária e na atividade funcional. As principais classes incluem: defensinas de plantas, tioninas, ciclotídeos, knotinas, snakinas, proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs) e peptídeos semelhantes à heveína (Tabela 02) (NAWROT et al., 2014; SALAS et al., 2015). Devido à sua estabilidade, baixa toxicidade e amplo espectro de ação, os AMPs vegetais têm despertado interesse como potenciais agentes terapêuticos no combate a infecções microbianas.

Tabela 02. Principais classes de peptídeos antimicrobianos de origem vegetal e suas características gerais.

Classe de AMP vegetal	Principais características estruturais	Atividade/Alvo antimicrobiano
Defensinas de plantas	Peptídeos pequenos ricos em cisteína, geralmente com estrutura estabilizada por pontes dissulfeto e motivo estrutural αβ estabilizado por cisteínas	Atividade antifúngica predominante; podem interagir com membranas e componentes da parede celular fúngica
Tioninas	Peptídeos básicos ricos em cisteína, contendo múltiplas pontes dissulfeto que conferem alta estabilidade estrutural	Atividade contra fungos e bactérias; frequentemente associados à permeabilização de membranas
Ciclotídeos	Peptídeos cíclicos com estrutura “cystine knot”, altamente	Atividade antifúngica, antibacteriana e inseticida;

	estáveis a variações de pH, temperatura e proteólise	podem interagir com membranas celulares
Knotinas	Peptídeos contendo o motivo estrutural “cystine knot”, formado por três pontes dissulfeto entrelaçadas	Alta estabilidade estrutural e atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias
Snakinas	Peptídeos ricos em cisteína, com múltiplas pontes dissulfeto e estrutura compacta	Atividade contra bactérias e fungos, frequentemente relacionada à interação com a membrana celular
Proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs)	Pequenas proteínas estáveis ricas em cisteína capazes de se ligar e transportar lipídeos	Participam da defesa vegetal, apresentando atividade antimicrobiana e possível interação com membranas
Peptídeos semelhantes à heveína	Peptídeos ricos em cisteína com domínio de ligação à quitina	Forte atividade antifúngica devido à interação com a quitina da parede celular de fungos

1.4 Defensinas de plantas: *Vu*-Def1 como modelo para o design de peptídeos

As defensinas vegetais constituem uma das mais importantes e estudadas famílias de AMPs. São pequenos peptídeos catiônicos, com 45 a 54 resíduos de aminoácidos, cuja estrutura tridimensional é altamente conservada: três folhas β antiparalelas conectadas a uma α-hélice, estabilizadas por quatro pontes dissulfeto entre oito cisteínas (PARISI et al., 2019). Apesar da conservação estrutural, há grande variação nas sequências de aminoácidos entre as cisteínas, o que resulta em diferentes propriedades biológicas. As defensinas apresentam amplo espectro de atividade, incluindo ações contra fungos, bactérias Gram-positivas, vírus envelopados, protozoários e até células tumorais (NAWROT et al., 2014). São amplamente distribuídas em tecidos vegetais como sementes, frutos e raízes, onde desempenham papel essencial na defesa contra patógenos (COOLS et al., 2017).

Um elemento-chave na sua atividade antimicrobiana é o elemento estrutural *γ-core*, localizado entre as folhas β2 e β3, que contém resíduos essenciais, como glicina e cisteína. Alterações nessa região resultam em perda significativa da atividade

biológica, tornando-a um alvo promissor para o desenvolvimento de peptídeos sintéticos com potencial terapêutico (YOUNT e YEAMAN, 2004; RAMESH et al., 2016). Embora sua atividade contra bactérias seja limitada, principalmente a Gram-positivas, as defensinas são especialmente eficazes contra fungos. A potência e o mecanismo de ação variam conforme a defensina e o organismo-alvo (CARVALHO e GOMES, 2011). Dessa forma, as defensinas vegetais representam uma classe versátil e promissora de AMPs, com aplicações potenciais no controle de patógenos agrícolas e no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

Nosso grupo de pesquisa tem investigado AMPs presentes nas sementes de *Vigna unguiculata* L. Walp. (feijão-de-corda), uma leguminosa de relevância agrícola e potencial biotecnológico. A partir da análise das sementes, foram isolados dois AMPs ricos em cisteína: uma defensina e uma LTP, ambos com atividade antifúngica *in vitro* comprovada contra os fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (CARVALHO et al., 2001).

A defensina foi clonada a partir de cDNA obtido por RT-PCR e denominada Vu-Def1 (*Vigna unguiculata defensin one*) (CARVALHO et al., 2006). Sua sequência revelou a presença de oito resíduos de cisteína formando quatro pontes dissulfeto típicas de defensinas vegetais. A proteína recombinante expressa em sistemas heterólogos apresentou atividade antimicrobiana significativa contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, um protozoário de relevância médica (SOUZA et al., 2013).

Com base nas propriedades estruturais da Vu-Def1, foi projetado um peptídeo sintético a partir de sua região do *γ-core*. O *γ-core* é um elemento estrutural conservado em diversos AMPs, reconhecida como centro funcional de atividade antimicrobiana. Segundo Yount e Yeaman (2004), essa região apresenta a fórmula geral NH_2-[X_{1-3}]-[GXC]-[X_{3-9}]-[C]-COOH, sendo X qualquer aminoácido.

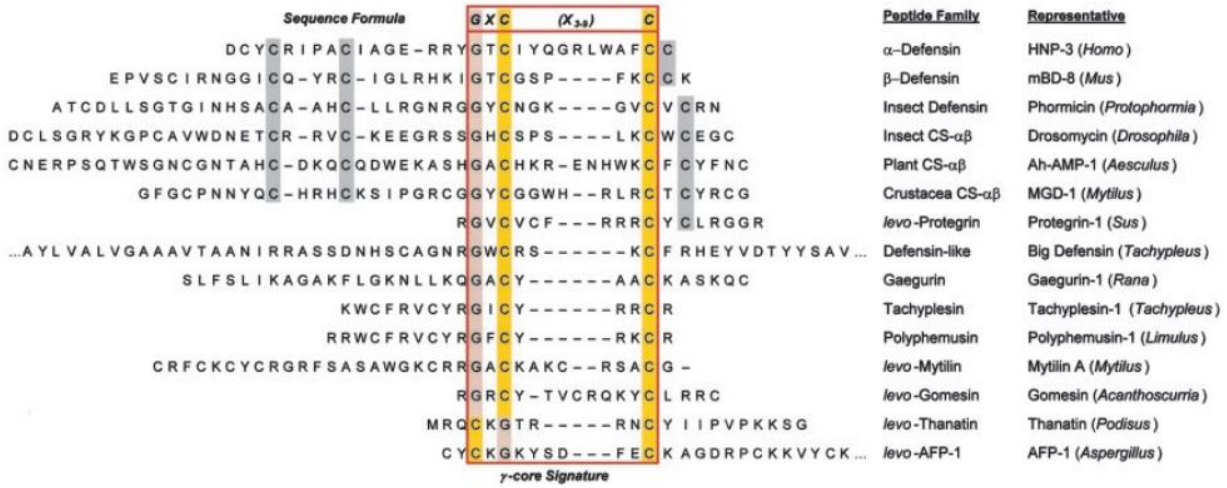
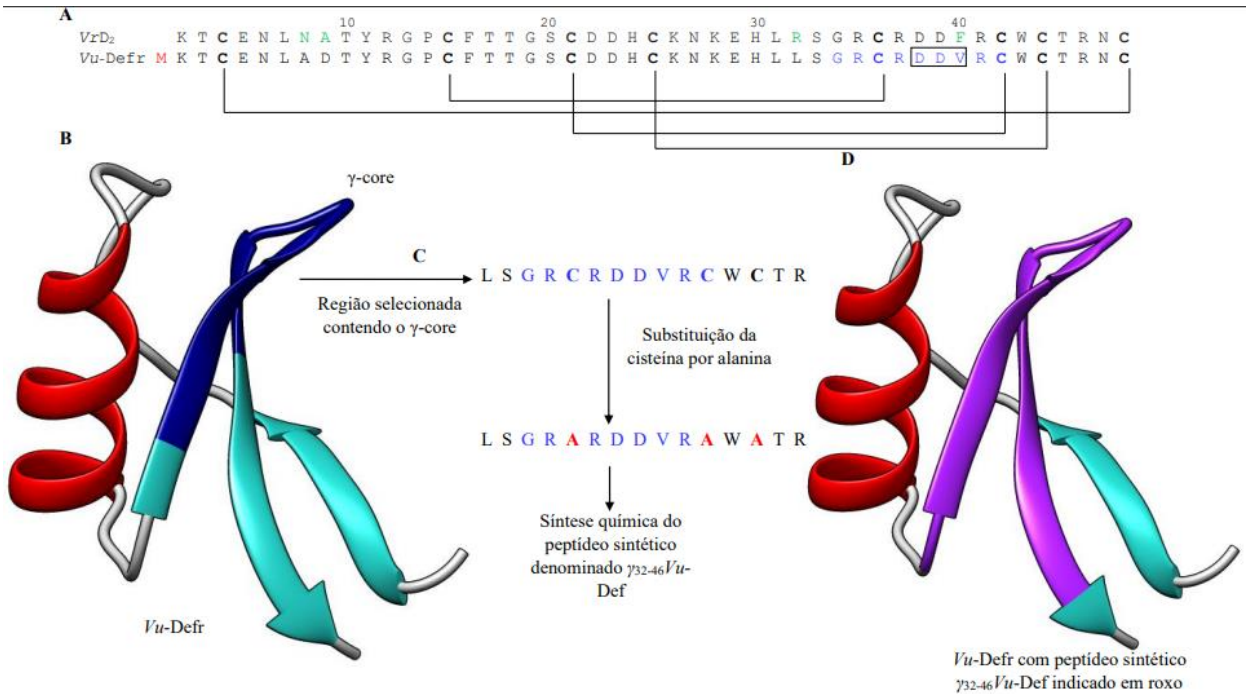


Figura 03. Padrões de sequência enantiomérica em peptídeos antimicrobianos contendo cisteína. Os representantes são (nome do peptídeo, código de acesso GI do GenBank): α-defensinas (HNP-3, 229858); β-defensinas (mBD-8, 15826276); defensinas de insetos (phormicin, 118432); peptídeos CS-α de insetos (drosomicina, 2780893); peptídeos CS-α de plantas (Ah-AMP-1, 6730111); peptídeos CS-α de crustáceos (MGD-1, 12084380); protegrinas (protegrina-1, 3212589); big defensin (2493577); gaegurinas (gaegurina-1, 1169813); taquiplesinas (taquiplesina-1, 84665); polifemusinas (polyphemusin-1, 130777); mitilinas (mytilin A, 6225740); gomesina (20664097); thanatina (6730068); e AFP-1 (1421258). Fonte: Adaptado por Yount e Yeaman (2004).

O peptídeo derivado do *γ-core* da Vu-Def1, denominado $A_{36,42,44}\gamma_{32–46}$VuDef e abreviado como DD, foi projetado com 15 resíduos de aminoácidos (L_{32}SGRARD$_{37}$D$_{38}$VRAWATR$_{46}$). As substituições de cisteínas por alaninas visaram evitar a formação de pontes dissulfeto que não existem na molécula original. A sigla “DD” faz referência aos dois resíduos adjacentes de ácido aspártico presentes na sequência, na posição 37 e 38. O peptídeo DD manteve a atividade antimicrobiana sobre *L. amazonensis* como a molécula inteira Vu-Def1, com modo de ação parcialmente elucidado, sugerindo perturbação da membrana plasmática do protozoário (SOUZA et al., 2019).



E

Nome do peptídeo	Quantidade de aminoácidos	Carga (pH 7.0)	Peso molecular (Da)
$\gamma_{32\text{-}46}$*Vu*-Def	15	+2	1.729,92

Figura 04. A. Alinhamento da estrutura primária da *Vu*-Defr e da defensina *Vigna radiata* 2 (PDB ID: 2GL1). As linhas abaixo dos resíduos de Cys (destacado em negrito) em *Vu*-Defr indica as pontes dissulfeto entre os resíduos. Os quatro resíduos de aminoácidos que diferem entre as duas estruturas primárias estão marcados em verde na sequência da VrD2 e também um resíduo de metionina adicional incluído na estrutura primária de *Vu*-Defr como requisito da clonagem é marcada em vermelho. Os resíduos de aminoácidos marcados em azul correspondem a região do *γ-core* como determinado por Yount and Yeaman (2004). Os resíduos de aminoácidos indicados na caixa correspondem a região de loop. Os números acima da sequência indicam o tamanho do peptideo em aminoácidos. B. Estrutura tridimensional da *Vu*-Defr modelada com Modeller com base na estrutura de VrD2. Em vermelho representada α-hélice, azul claro representam folhas β, e em azul escuro representa a região do *γ-core*. C. Passos do design do peptídeo sintético. D. O mesmo que descrito em B) com o peptídeo sintético γ32-46Vu-Def indicado em roxo. E. Características bioquímicas do peptídeo sintético γ32-46Vu-Def (Adaptado de Souza et al., 2019).

A síntese do peptídeo DD reforça a viabilidade de projetar peptídeos funcionais baseados em regiões conservadas de AMPs, especialmente no *γ-core*, que concentra a bioatividade e permite a geração de versões mais curtas, estáveis e específicas para aplicações farmacológicas. Esse tipo de abordagem é promissora tanto no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos quanto em estratégias agrícolas, como plantas transgênicas resistentes a patógenos.

Os estudos com AMPs de *V. unguiculata* demonstram o potencial das defensinas vegetais e seus derivados como agentes bioativos multifuncionais, com aplicações que vão da saúde humana à agricultura sustentável. O aprofundamento nas características estruturais, como o *γ-core*, tem permitido avanços no entendimento dos mecanismos de ação e no aprimoramento do desenho racional de peptídeos com elevada eficácia antimicrobiana.

Entretanto, ao ser testado contra cinco espécies clínicas de leveduras e *S. cerevisiae*, DD não apresentou atividade antifúngica significativa (TOLEDO et al., 2021). Isso motivou o redesenho de novos peptídeos derivados com foco na otimização de parâmetros bioquímicos como carga líquida, hidrofobicidade e quiralidade — fatores que influenciam diretamente a interação dos AMPs com membranas celulares fúngicas.

A partir disso, três novos peptídeos foram desenvolvidos (TOLEDO et al., 2021):

1. **RR** ($A_{36,42,44}R_{37,38}\gamma_{32-46}$VuDef): substituiu os resíduos de ácido aspártico (negativos) nas posições 37 e 38 por argininas (positivas), aumentando sua carga de +2 para +6. Essa mudança também reduziu sua hidrofobicidade para +18,32 kcal/mol (quanto mais positivo, mais hidrofílico é o peptídeo, pela escala de Wimley-White).
2. **D-RR** (D-$A_{36,42,44}R_{37,38}\gamma_{32-46}$*Vu*Def): versão enantiomérica do RR contendo aminoácidos na configuração D, conhecida por conferir maior estabilidade frente à degradação enzimática e menor toxicidade para células humanas, mantendo a eficácia antimicrobiana (ZHU et al., 2007; MATSUZAKI, 2009).
3. **WR** ($A_{42,44}R_{37,38}W_{36-39}\gamma_{32-46}$*Vu*-Def): projetado para aumentar ainda mais a hidrofobicidade com a inserção de resíduos de triptofano nas posições 36 e 40, alcançando +14,10 kcal/mol, favorecendo interações com membranas fúngicas.

Defensina/ Nome do peptídeo	Estrutura Primária (Código de uma letra) 1 11 21 31 41 51	Carga Líquida (pH 7.0)	Hidrofobicidade (Kcal/mol)
*Vu*Def$_1$	--MKTCENL- ADTYRGPCFT TGSCDDHCKN KEHLL-SGHC R-----DDVR -CNCTRNC	+0,7	+54,73
$A_{36,42,44}Y_{32-46}$*Vu*Def (DD)	L-SGHA R-----DDVR -ANATR	+2	+21,98 (+20,42)
$A_{36,42,44}R_{37,38}Y_{32-46}$*Vu*Def (RR)	L-SGHA R-----RRVR -ANATR	+6	+18,32 (+21,98)
$A_{42,44}R_{37,38}W_{36,39}Y_{32-46}$*Vu*Def (WR)	L-SGHW R-----RRWR -ANATR	+6	+14,10 (+21,98)

Tabela 03. Estrutura primária e propriedades biofísicas dos peptídeos desenhados baseados no *γ-core* da defensina *Vu*Def1. 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 vermelho estão os aminoácidos que foram trocados na sequência dos peptídeos desenhados e a caixa vermelha destaca o *γ-core*. (Adaptado de Toledo et al., 2021).

Os ensaios *in vitro* demonstraram que essas modificações estratégicas foram eficazes: RR, D-RR e WR apresentaram desempenho antimicrobiano superior ao peptídeo original DD. As alterações de carga, quiralidade e hidrofobicidade revelaram-se determinantes na potencialização da atividade antifúngica, abrindo caminho para o desenvolvimento de novos peptídeos bioativos com aplicações terapêuticas e agrícolas (TOLEDO et al., 2021).

1.5 Mitocôndria: Correlação entre os processos de morte celular em fungos

A mitocôndria é uma organela central para a homeostase celular, sendo responsável pela produção de adenosina trifosfato (ATP) por meio da fosforilação oxidativa, pela regulação do metabolismo intermediário e pelo controle do balanço redox. Em fungos, além de seu papel bioenergético, a mitocôndria participa ativamente da adaptação a estresses ambientais, da virulência e da resposta a agentes antifúngicos, configurando-se como um importante alvo intracelular de compostos antimicrobianos. A organização funcional da cadeia transportadora de elétrons (CTE), o controle do potencial de membrana mitocondrial e a regulação do fluxo de íons tornam essa organela um ponto estratégico na determinação da viabilidade celular (RISSO et al., 2002).

Diferentemente do que ocorre em muitos eucariotos, diversos fungos apresentam maior flexibilidade metabólica na respiração mitocondrial, podendo utilizar rotas respiratórias adicionais além da via clássica da cadeia transportadora de elétrons. Entre essas rotas destacam-se a via alternativa NADH desidrogenases e a oxidase alternativa (AOX), que permitem o desvio parcial do fluxo de elétrons quando componentes da cadeia respiratória convencional são inibidos ou quando a célula está submetida a condições ambientais adversas (JOSEPH-HORNE; HOLLOMON; WOOD, 2001).

A via alternativa envolve a enzima oxidase alternativa (AOX) (Fig. 05), que transfere elétrons diretamente da ubiquinona reduzida para o oxigênio molecular, contornando os complexos III e IV da cadeia respiratória. Embora essa via não esteja acoplada ao bombeamento de prótons e, portanto, gere menor produção de ATP, ela permite a manutenção do fluxo eletrônico e a prevenção do acúmulo excessivo de elétrons reduzidos, contribuindo para o controle da produção de ROS (HELMERHORST et al., 2002).

Já a chamada via paralela envolve a participação de desidrogenases alternativas de NADH, localizadas na membrana mitocondrial interna, que podem transferir elétrons diretamente para a ubiquinona sem passar pelo complexo I da cadeia respiratória. Essas enzimas possibilitam maior flexibilidade no metabolismo respiratório e permitem que a célula mantenha a respiração mesmo quando determinadas etapas da cadeia transportadora de elétrons são comprometidas (Fig. 05) (SIEDOW; UMBACH, 2000).

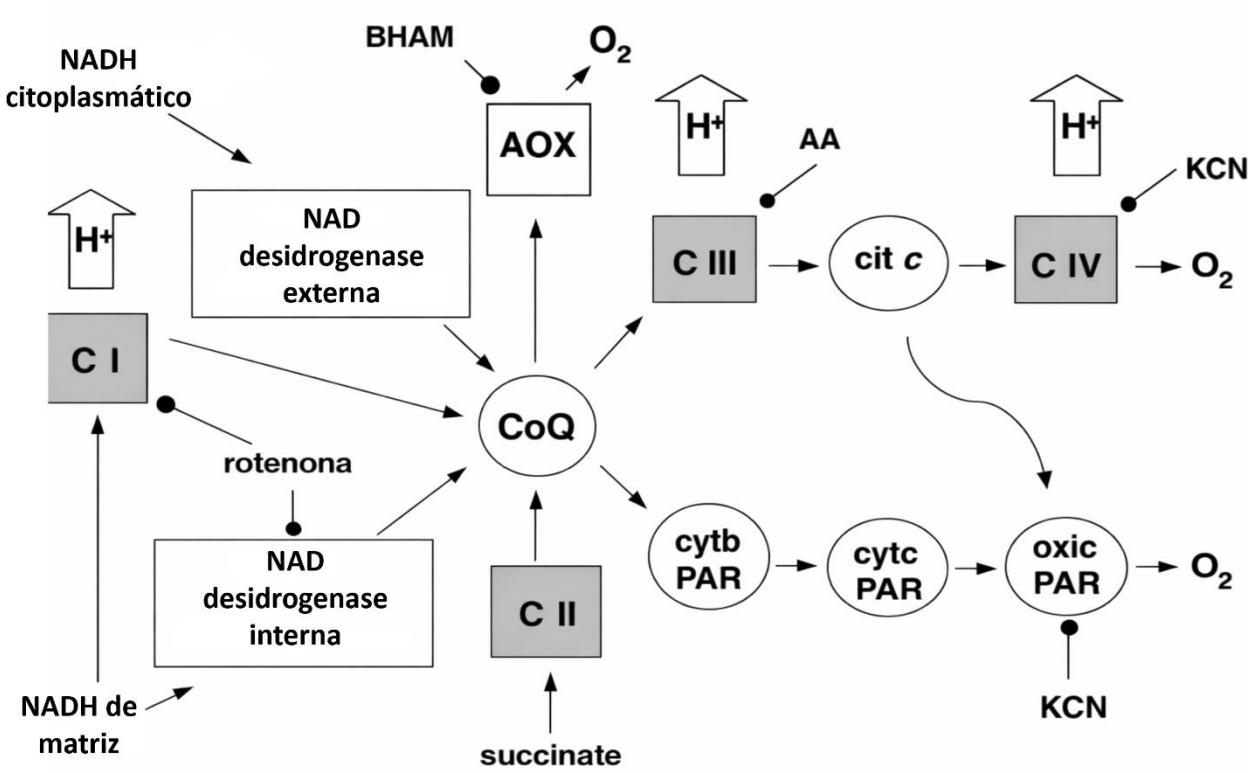


Figura 05. Representação esquemática do transporte de elétrons em *C. albicans*. Os elétrons provenientes do NADH são transferidos para o complexo I bombeador de prótons (C I) ou para as desidrogenases externas e internas de NADH. Em seguida, os elétrons são direcionados para a coenzima Q (CoQ), que também pode ser reduzida por elétrons derivados do succinato, canalizados através do complexo II (C II). Os elétrons coletados pela CoQ podem ser direcionados ao O_2 por meio da AOX, PAR ou da CRC bombeadora de prótons, contendo o complexo III (C III), o citocromo c (cyt c) e o complexo IV (C IV). A rotenona inibe o complexo I e a desidrogenase interna de NADH. O ácido benzidroxamico (BHAM) inibe a AOX, enquanto antimicina A e KCN inibem os complexos III e IV, respectivamente. O KCN também inibe a oxidase terminal PAR. Fonte: Esquema adaptado por Ruy, Vercesi, Kowaltowski (2006).

A presença dessas vias respiratórias adicionais confere aos fungos uma capacidade metabólica mais diversificada, permitindo maior adaptação a diferentes condições ambientais e a situações de estresse celular. Essa plasticidade metabólica também pode contribuir para a tolerância a determinados agentes antifúngicos e para a sobrevivência em ambientes hostis durante o processo infeccioso (HELMERHORST et al., 2002).

Além de suas funções metabólicas, a mitocôndria integra múltiplas vias de morte celular regulada (RCD, do inglês *regulated cell death*). O processo mais bem caracterizado é a apoptose, mediada pela permeabilização da membrana mitocondrial e pela liberação de citocromo *c* para o citoplasma, evento que desencadeia a ativação sequencial de proteases do tipo caspase e culmina no colapso estrutural e funcional da célula. Em fungos, embora não existam caspases clássicas como em células de mamíferos, proteínas funcionalmente análogas participam da execução desse programa de morte celular, evidenciando a conservação evolutiva dos mecanismos mitocondriais envolvidos (JAARA et al., 2024; XU; PANG; FAN, 2025; POZNIAKOVSKY et al., 2005).

Adicionalmente, a disfunção mitocondrial pode iniciar outras modalidades de RCD, como necrose regulada, piroptose e ferroptose, frequentemente associadas ao acúmulo de danos oxidativos em macromoléculas celulares, incluindo DNA, lipídios e proteínas, ou à instalação de um estado persistente de estresse oxidativo. Nesse contexto, a integridade estrutural da mitocôndria e a permeabilidade de suas membranas interna e externa emergem como determinantes críticos da decisão celular entre sobrevivência e morte (JAARA et al., 2024; FU et al., 2023).

Em fungos, processos dependentes da mitocôndria na indução de morte celular já foram amplamente descritos. Em *Saccharomyces cerevisiae*, a liberação de citocromo

c e a alteração do potencial de membrana mitocondrial constituem eventos-chave durante a ativação de vias apoptóticas. De modo semelhante, em espécies do gênero *Aspergillus*, alterações na função mitocondrial estão associadas à ativação de programas de morte celular em resposta a estresses químicos e oxidativos. Esses achados reforçam o papel central da mitocôndria como integradora de sinais de dano e como mediadora dos desfechos celulares em fungos (XU; PANG; FAN, 2025; RISSO et al., 2002).

1.6 Íons inorgânicos: homeostase iônica em fungos

A manutenção da homeostase iônica é um requisito fundamental para a sobrevivência celular, pois os íons inorgânicos atuam diretamente na regulação do potencial de membrana, do volume celular, do metabolismo energético e de atividades enzimáticas. Íons como K^+, Na^+, Ca^{+2} e Mg^{+2} participam de processos essenciais, incluindo transporte transmembrana, sinalização intracelular, controle osmótico e equilíbrio redox. Alterações nesse balanço iônico podem comprometer a integridade das membranas, a função mitocondrial e a estabilidade de macromoléculas, culminando na ativação de vias de estresse e de morte celular (MALINA; LARSSON; NIELSEN, 2018; PEREZ-VAZQUEZ; SAAVEDRA-MOLINA; URIBE, 2003).

Em fungos, a homeostase iônica assume papel ainda mais crítico devido à presença da parede celular e à dependência de sistemas específicos de transporte para adaptação a ambientes hostis. O potássio (K^+) é o principal cátion intracelular e está diretamente envolvido na manutenção do potencial de membrana plasmática, na regulação do pH citosólico e na ativação de diversas enzimas metabólicas. Já o sódio (Na^+), normalmente mantido em baixas concentrações no citoplasma, torna-se tóxico quando acumulado, exigindo sistemas eficientes de extrusão e compartimentalização, como bombas Na^+/H^+ e antiportes vacuolares. O cálcio (Ca^{+2}) atua como importante segundo mensageiro, controlando respostas a estresses ambientais, morfogênese e processos de morte celular regulada. O magnésio (Mg^{+2}), por sua vez, é cofator de inúmeras enzimas, estabiliza ATP e ácidos nucleicos e contribui para a integridade estrutural das membranas e ribossomos (PEREZ-VAZQUEZ; SAAVEDRA-MOLINA; URIBE, 2003).

A mitocôndria e o vacúolo desempenham funções centrais na regulação do equilíbrio iônico em fungos. A mitocôndria integra o metabolismo energético ao controle de Ca^{+2} e do potencial de membrana, enquanto o vacúolo atua como principal reservatório intracelular de íons, modulando sua liberação conforme as demandas

metabólicas e condições de estresse. A desregulação desses compartimentos resulta em perturbações no potencial mitocondrial, aumento da produção de ROS e ativação de vias de morte celular regulada (ZOROVA et al., 2017).

Nesse contexto, a homeostase iônica em fungos está intimamente relacionada à tolerância a estresses químicos e oxidativos, bem como à ação de agentes antifúngicos, que frequentemente interferem no transporte de íons ou na integridade de membranas. Assim, compreender os mecanismos que controlam o balanço de K^+, Na^+, Ca^{+2} e Mg^{+2} é fundamental para elucidar os processos de adaptação, sobrevivência e morte celular em leveduras patogênicas, como espécies do gênero *Candida*, além de contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas baseadas na perturbação da homeostase iônica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Determinar a correlação entre o processo de morte celular regulada com a hiperpolarização mitocondrial em *Candida albicans* e *Candida tropicalis* induzida pelos peptídeos antimicrobianos bioinspirados por meio dos mediadores K^+, Na^+, Mg^{+2} e Ca^{+2} e azida sódica.

2.2. Objetivos específicos

I. Analisar a funcionalidade mitocondrial das células *C. albicans* e *C. tropicalis* por microscopia de fluorescência com sonda JC-1 após exposição com os peptídeos bioinspirados e adição dos íons;

II. Avaliar a atividade de NAD-desidrogenases mitocondriais das células fúngicas quando co-incubadas com os peptídeos e íons;

III. Determinar a indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células incubadas com os peptídeos e pós-incubadas com os íons;

IV. Investigar os efeitos da azida sódica nas células incubadas com os peptídeos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos $A_{36,42,44}R_{37,38}\gamma_{32-46}$*Vu*Def (RR), D-$A_{36,42,44}R_{37,38}\gamma_{32-46}$*Vu*Def (D-RR) e $A_{42,44}R_{37,38}C_{36,39}\gamma_{32-46}$*Vu*Def (WR) foram desenhados de acordo com TOLEDO et al. (2021) e adquiridos comercialmente pela Aminotech (São Paulo). Estes foram dissolvidos em água pura esterilizada a 2 µg/µL (aproximadamente 1.000 µM, dependendo da massa molecular dos peptídeos) e armazenados em alíquotas a – 70 °C. A pureza dos peptídeos foi assegurada em ≥ 95%, conforme determinado por cromatografia líquida de alta performance em coluna de fase reversa e análises por espectrometria de massas, ambas fornecidas pela Aminotech.

3.2. Microrganismos

Os fungos *Candida tropicalis* (CE017) e *Candida albicans* (CE022) foram obtidas em colaboração com a Universidade Federal do Ceará. Para conservação e posteriormente uso, todo o procedimento foi conduzido em capela de fluxo laminar vertical (TROX® TECHNIK). Inicialmente, inóculos de cada fungo a partir de colônias em placas de Petri foram transferidos para uma nova placa contendo meio ágar Sabouraud estéril (dextrose: 40 g/L; peptona de carne 5 g/L; peptona de caseína 5g/L; agar bacteriológico: 15g/L; Kasvi). Para garantir um crescimento homogêneo, foram realizadas estrias no meio de cultura, seguida por incubação a 30 °C por 24 h. Em seguida a placa foi armazenada a 4 °C, no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM), do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), e repicada para meio novo a cada três meses.

3.3. Análise do envolvimento mitocondrial na morte celular induzida pelos peptídeos bioinspirados sobre fungos do gênero *Candida*

3.3.1. Determinação da funcionalidade mitocondrial em células de *C. tropicalis* e *C. albicans* tratadas com os peptídeos bioinspirados

Para a determinação da funcionalidade mitocondrial das células dos fungos tratadas com os peptídeos bioinspirados RR, D-RR e WR foi usada a sonda JC-1 (Thermo Fisher). Esta sonda é permeável à membrana e se acumula seletivamente nas mitocôndrias. Ele pode existir em duas formas: monômeros, que emitem fluorescência verde, e agregados (chamados de J-agregados), que emitem fluorescência vermelha.

Deste modo a sonda em células saudáveis, com alto potencial de membrana mitocondrial, forma os J-agregados que emitem fluorescência vermelha. Já em células com baixo potencial da membrana mitocondrial, a sonda permanece na forma de monômeros no citoplasma, emitindo fluorescência verde. O experimento foi feito a partir de uma cultura fresca dos fungos cultivados por 24 h como descrito no item **3.2**, foi retirada uma alíquota e transferida para 1 mL de caldo Sabouraud (dextrose 40 g/L; peptona de carne 5 g/L; peptona de caseína 5g/L; Kasvi) e as células foram quantificadas por contagem direta em câmara de Neubauer (LaborOptik, UK) usando o microscópio Axio Imager.A2 (Zeiss). O ensaio foi montado em um microtubo de centrifugação de 1,5 mL do seguinte modo: para a amostra controle, foi adicionado ao tubo 40.000 células/mL (esta densidade celular foi previamente padronizada para este ensaio conforme LUCAS et al., 2024) de *C. tropicalis* e *C. albicans*, separadamente, em volume final do ensaio em 100 µL em caldo Sabouraud. Estas células foram lavadas uma vez em caldo Sabouraud estéril por centrifugação (Micro Centrifuge CM-610) a temperatura ambiente a 6.000 rpm por 3 min para sedimentar as células e o sobrenadante foi descartado. O sedimento de células foi ressuspendido em 100 µL de caldo Sabouraud aos quais foram adicionados 20 µM da sonda JC-1. O microtubo foi então incubado a 30 °C por 50 min para *C. tropicalis* e 30 min para *C. albicans*, sendo estas amostras os controles para cada fungo. Para o controle negativo, as células foram pré-incubadas com 2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) a 30 °C por 15 min. Posteriormente, a sonda JC-1 foi adicionada e incubada por 50 min a 30 °C. Para as amostras teste contendo os peptídeos RR e D-RR e para *C. tropicalis*, o ensaio foi montado conforme o controle, sendo que quando atingiram os tempos de 40 e 45 min de incubação com a sonda JC-1, foi adicionado 27,5 µM de RR e 23 µM de D-RR e ambos incubados por 10 e 5 min, respectivamente, para completarem o tempo de incubação da sonda, neste caso de 50 min. Para *C. albicans*, a sonda JC-1 foi adicionada e incubada por 20 e 25 min e então foram adicionados 27,5 µM de WR e incubados por 10 e 5 min, respectivamente, para completarem o tempo de incubação da sonda, neste caso de 30 min. Após o tempo de incubação, os tubos contendo as amostras foram centrifugados novamente e 90 µL do sobrenadante foram removidos. O sedimento de células foi ressuspendido em 10 µL de caldo Sabouraud e transferido para lâminas cobertas com lamínulas para análise por fluorescência no microscópio óptico Axio Imager.A2 (Zeiss), equipado com filtros de excitação/emissão para os comprimentos de onda 465/515 nm (verde), 550/590 nm (vermelho). Imagens foram adquiridas com a câmera AxioCam MR5 (Zeiss) e pelo software Axio Vision LE (versão 4.8.2, Zeiss). As amostras controles foram usadas para determinação de

parâmetros do tempo de exposição e intensidade de fluorescência com os quais as imagens dos demais tratamentos foram adquiridas.

3.3.2. Efeito dos íons K^+, Na^+, Mg^{+2} e Ca^{+2} sobre o potencial de membrana mitocondrial em células de *C. tropicalis* e *C. albicans*

Para os ensaios com íons, foram utilizados os sais de grau analítico da Merck: cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e cloreto de cálcio ($CaCl_2$). As soluções-estoque foram preparadas a 1 M em água ultrapura (Milli-Q) e ajustadas ao pH 5,6 com HCl. Todas as soluções foram filtradas em membrana de 0,22 µm (Millipore) e armazenadas sob refrigeração (4 °C) até o uso nos experimentos. O ensaio da funcionalidade mitocondrial foi realizado como descrito no item **3.3.1**, com a diferença que o controle as células fúngicas foram incubadas com 100 mM dos respectivos íons para *C. tropicalis* e 200 mM para *C. albicans*, e a sonda JC-1 por 50 min para *C. tropicalis* e 30 min para *C. albicans* a 30 °C. Para a condição de co-incubação, as células fúngicas foram incubadas com sonda, os peptídeos, 27,5 µM de RR e 23 µM de D-RR para *C. tropicalis*, e 27,5 µM de WR para *C. albicans* e os respectivos íons concomitantemente. O tempo final de incubação foi de 50 min para *C. tropicalis* e 30 min para *C. albicans*. Na condição de pós-incubação com os íons, as células fúngicas foram incubadas com sonda, os peptídeos RR e D-RR por 40 e 45 min para *C. tropicalis*, e WR por 20 e 25 min para *C. albicans* e então foram adicionados os íons e novamente incubados até o tempo final de incubação da sonda de 10 e 5 min para cada fungo.

3.3.3. Quantificação da NAD desidrogenases com reagente WST-1

Este ensaio foi baseado no reagente WST-1 (Roche) que contém o sal de tetrazólio 4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzeno disulfonato. Este sal de tetrazólio é solúvel, mas não é permeável à membrana das células devido às suas cargas negativas e por isso ele é usado em conjunto com um acoplador de elétrons permeável à membrana para que ocorra a sua redução do lado de fora da célula (BERRIDGE e TAN, 2005). Nós usamos como acoplador de elétrons a 2,3,5,6-tetrametil-1,4-benzoquinona (duroquinona, Sigma-Aldrich) (TSUKATANI et al., 2003). A redução da duroquinona a dihidroduroquinona é mediado por NADH desidrogenases/oxidoredutases cuja principal fonte na célula é mitocondrial. Um ensaio foi separadamente montado para cada conjunto fungo e peptídeo em 100 µL de volume final de caldo Sabouraud (Kasvi) em uma microplaca de 96 poços de poliestireno (Nunc,

Thermo Scientific) consistindo para o controle: 80.000 células/mL dos fungos (esta densidade celular foi previamente padronizada para este ensaio conforme LUCAS et al., 2024), 10 µL do reagente WST-1 (Sigma-Aldrich) e 0,24 mM duroquinona (proveniente de um estoque de 12,24 mM em dimetil sulfóxido). Para o controle positivo, foi utilizado ácido acético a 333 mM (Merck), enquanto no controle negativo foi adicionado Triton X-100 a 2% (Sigma-Aldrich). Nas amostras testes contendo os peptídeos, o ensaio foi montado conforme o controle, sendo que foi adicionado 27,5 µM de RR para *C. tropicalis*, 23 µM de D-RR para *C. tropicalis* e 27,5 µM de WR para *C. albicans*. A absorbância das amostras foi monitorada a 450 nm de 5 a 30 min utilizando leitor de microplaca (Epoch, Biotek) operando com o software Gen5. A porcentagem de redução do WST-1, usado como parâmetro do metabolismo celular por meio da atividade de NAD desidrogenases, foi calculada conforme a fórmula [(ABS_{450nm} de amostras de teste × 100)/ABS_{450nm} do controle] (LUCAS et al., 2024).

3.3.4. Ensaio de determinação da indução de ROS intracelular em células *C. tropicalis* e *C. albicans* tratadas com os peptídeos

Para investigar a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) nas células fúngicas foi usada a sonda 2′,7′-di clorofluoresceinadiacetato (H_2DCFDA, Molecular Probes). Esta sonda não fluorescente, passivamente penetra nas células onde é então clivada na porção diacetato por esterases liberando a 2′,7′-diclorofluoresceina que quando oxidada por ROS intracelular se torna fluorescente. Este ensaio foi feito como descrito no item **3.3.1** com as seguintes diferenças: o volume correspondente do ensaio foi transferido para microtubos de centrifugação de 1,5 mL e incubado sob agitação constante por 30 min com a sonda H_2DCFDA, a uma concentração final de 20 µM. Para o controle positivo utilizou-se 333 mM de ácido acético, onde as células foram pré-incubadas por 40 min antes da incubação com a sonda. Para o controle negativo foi utilizado 2% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), pré-incubado por 15 min sob agitação a 30 °C antes de incubação com a sonda por mais 30 min. Nas amostras testes contendo os peptídeos, estes foram adicionado da suas doses letais de 27,5 µM de RR e 23 µM de D-RR para *C. tropicalis* e 27,5 µM de WR para *C. albicans* aos 20 e 25 min e incubados por 10 e 5 minaté o final de incubação da sonda, que neste caso foi de 30 min tanto para *C. tropicalis* e *C. albicans*. As análises microscópicas foram feitas com excitação 492–495 nm e emissão na faixa de 517–527 nm (LUCAS et al., 2024).

3.3.5. Determinação da indução de ROS intracelular em células *C. tropicalis* e *C. albicans* tratadas com os peptídeos com pós-incubação com os íons

O ensaio foi repetido conforme descrito no item **3.3.4**. Para este ensaio foi feito um controle utilizado 100 mM dos íons para células *C. tropicalis* e 200 mM para *C. albicans*. Para os peptídeos, na primeira análise as células foram co-incubadas com os peptídeos e 100 mM dos íons para *C. tropicalis* e 200 mM para células *C. albicans* após a incubação das células com a sonda por 30 min. Para a segunda análise as células fúngicas foram incubadas com sonda e peptídeos e quando atingiram o tempo de incubação de 20 e 25 min, foram aplicados os íons e novamente incubados até o tempo final com a sonda, ou seja, 10 e 5 min.

3.3.6 Análise de viabilidade celular nos tempos iniciais da incubação com os peptídeos

Para verificar se os peptídeos causavam a perda da viabilidade celular nos primeiros minutos de interação foi avaliada a viabilidade celular. A partir de uma cultura fresca dos fungos cultivados por 24 h como descrito no item **3.2**, foi retirada uma alíquota e transferida para 1 mL de caldo Sabouraud e então uma alíquota de 10 µL da cultura foi retirada e as células foram quantificadas por contagem direta em câmara de Neubauer (LaborOptik, UK) utilizando um microscópio ótico (Axio Imager.A2, Zeiss). O ensaio antimicrobiano foi montado em uma placa de cultura de células de 96 poços contendo 2.000 células/mL de cada fungo, o que corresponde a 200 células/poço, e 100 µL de caldo Sabouraud, para o controle. Para o teste foram adicionados 27,5 µM de RR e 23 µM de D-RR para *C. tropicalis*, e 27,5 µM de WR para *C. albicans*. Os fungos foram incubados com os tempos de 0, 30 e 60 min a 30 °C. Ao final deste período as células foram lavadas uma vez em 1 mL de caldo Sabouraud por centrifugação 6.000 rpm (Micro Centriguge 6000 RPM, CM-610), o sobrenadante foi descartado e o sedimento de células ressuspenso em 100 µL e então as células foram plaqueada em placas de Petri contendo ágar Sabouraud com a ajuda de uma alça de Drigalski. A placa foi incubada a 30 °C por 24 h para a determinação da unidade formadora de colônias (UFC). O tempo de 0 min refere-se ao tempo necessário para montar o experimento, lavar as células e fazer o plaqueamento, que foi de aproximadamente 5 min. A perda da viabilidade foi calculada pela formula: [100 – (CFU do teste x 100/CFU do controle)]. O controle foi considerado sendo 0% de perda de viabilidade.

3.3.7. Analise do bloqueio do potencial de membrana mitocondrial na morte celular induzida pelos peptídeos bioinspirados por azida sódica

Inicialmente foi feito um teste para se determinar a menor concentração de azida sódica que interferisse no crescimento dos fungos sem ser demasiadamente tóxica. Foi feito um ensaio antimicrobiano como descrito no item **3.3.2**, com as seguintes diferenças: As células dos fungos foram ressuspensas em 1 mL de caldo Sabouraud (Kasvi) contendo 1, 2, 3, 5, 10 e 15 mM de azida sódica (Sigma-Aldrich) e incubados por 10 min em estufa (TE-371 BOD, TECNAL) a 30 ºC sob agitação constante em uma placa agitadora (IKA® MS 3 digital). Após a incubação foi montado o ensaio antimicrobiano como descrito no item **3.3.2**. As placas foram fotografadas e a toxicidade da azida sódica foi calculada a partir do UFC com a fórmula [100 - (UFC do teste x 100/UFC do controle)] e a maior concentração de azida sódica que foi menos tóxica para as células foi escolhida. A partir da determinação da concentração da azida sódica, foi montado um ensaio antimicrobiano com a concentração escolhida sendo que o tempo de incubação foi de 1 h. Foi feito um controle apenas com células dos fungos e meio, um controle com a concentração de azida sódica escolhida e um controle com a dose letal dos peptídeos (27,5 µM de RR e 23 µM de D-RR para *C. tropicalis* e 27,5 µM de WR para *C. albicans*). Nos testes a azida sódica foi adicionada 5 e 10 min após a adição dos peptídeos e incubados até completarem 1 h. A porcentagem de proteção da azida sódica sobre a morte induzida pelos peptídeos foi calculada a partir do UFC com a fórmula [(UFC do teste x 100/UFC do controle)].

3.3.8. Determinação da funcionalidade mitocondrial das células de *C. tropicalis* e *C. albicans* pré-incubadas com azida sódica

O ensaio foi realizado como descrito no item **3.3.1** com as seguintes diferenças: o controle foi composto de células e caldo Sabouraud. O controle negativo consistiu das células incubadas com 2% de Triton X-100.O teste foi feito com as células fúngicas pré-incubadas com 1 mM de azida sódica por 10 min antes de completar o tempo de incubação da sonda JC-1 de 50 min para *C. tropicalis* e de 30 min para *C. albicans*.

3.3.9. Quantificação da atividade metabólica mitocondrial com reagente WST-1 na presença de azida sódica

O método colorimétrico utilizando o reagente WST-1 foi repetido conforme descrito no item **3.3.3** com as seguintes modificações: O teste consistiu das células dos fungos incubados na presença de 1 mM de azida sódica.

3.10. Analises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados três vezes em triplicata, com exceção dos ensaios de microscopia óptica, que foi um experimento repetido três vezes. Testes de ANOVA de uma via foram realizados utilizando o *GraphPad Prism* versão 8.0.2 para *Windows*. Um valor de $P < 0,05$ é considerado estatisticamente significativo. O *GraphPad Prism* versão 8.0.2 foi utilizado para ilustrar os dados.

4. RESULTADOS

4.1. Análise do envolvimento mitocondrial na morte celular induzida pelos peptídeos bioinspirados RR, D-RR e WR sobre fungos do gênero *Candida*

Nos estudos anteriores do grupo, foi investigado o modo de ação de peptídeos bioinspirados sobre fungos do gênero *Candida*, quando foram estabelecidos o tempo de morte, a dose letal (DL_{100}) e o tipo de morte celular induzida nos fungos pelos peptídeos. A cepa *Candida tropicalis* mostrou-se mais suscetível aos peptídeos RR e D-RR sendo a DL_{100} de 27,5 μM e 23 μM, respectivamente, enquanto a cepa *Candida albicans* foi mais suscetível ao peptídeo WR com uma DL_{100} de 27,5 μM (TOLEDO et al., 2021; LUCAS et al., 2024). O tempo que os peptídeos levam para induzir a morte dos fungos foi de 6 h para RR e 3 h para D-RR em *C. tropicalis*. WR causou 100% de morte de *C. albicans* em 1 h (LUCAS et al., 2024). Observações microscópicas e o uso de sondas específicas revelaram que RR induz morte celular regulada, enquanto e D-RR induz morte celular regulada independente de metacasapase, ambos em *C. tropicalis*, e WR provoca morte celular regulada em *C. albicans* (LUCAS et al., 2024; DAMICA et al., 2025).

Este estudo baseia-se nos resultados anteriores do grupo, que identificaram a disfunção mitocondrial como uma possível via de indução de morte celular. Os fungos tratados com os peptídeos apresentavam hiperpolarização mitocondrial e também aumento intracelular de ROS. Adicionalmente, foi observado encolhimento celular

causado pelo efluxo do íon K^+ (LUCAS et al., 2024; DAMICA et al., 2025). A adição do íon K^+ ao meio extracelular previne a hiperpolarização mitocondrial, o encolhimento celular e a morte celular induzida pelos peptídeos RR e D-RR em *C. tropicalis*. Porém, não previne a produção de ROS, indicando que este evento possa não estar diretamente relacionado com a morte dos fungos. Esse efeito protetor do K^+ cessa se o íon for adicionado após aproximadamente 10 min da exposição das células de *C. tropicalis* aos peptídeos RR e D-RR. Para WR e *C. albicans*, o K^+ só protege da morte induzida se for adicionado ao meio antes da adição do peptídeo (DAMICA et al., 2025). Neste estudo, investigamos a correlação da hiperpolarização mitocondrial, produção de ROS e proteção da morte mediada pelo íon K^+ e expandimos a investigação para os íons Na^+, Mg^{+2} e Ca^{+2} nos tempos iniciais do processo de morte celular induzida ao fungo *C. tropicalis* pelos peptídeos RR e D-RR e *C. albicans* pelo peptídeo WR. E também investigamos o efeito da azida sódica sobre a hiperpolarização mitocondrial e a morte celular regulada induzida pelos peptídeos.

Neste estudo, a funcionalidade mitocondrial em células de *C. tropicalis* foi avaliada nos primeiros 5 e 10 min após a exposição ao RR. Os resultados mostraram que já a partir de 5 min após a exposição RR foi observado forte acúmulo da sonda JC-1 na mitocôndria, evidenciado pelo aumento na fluorescência vermelha (Fig. 06).

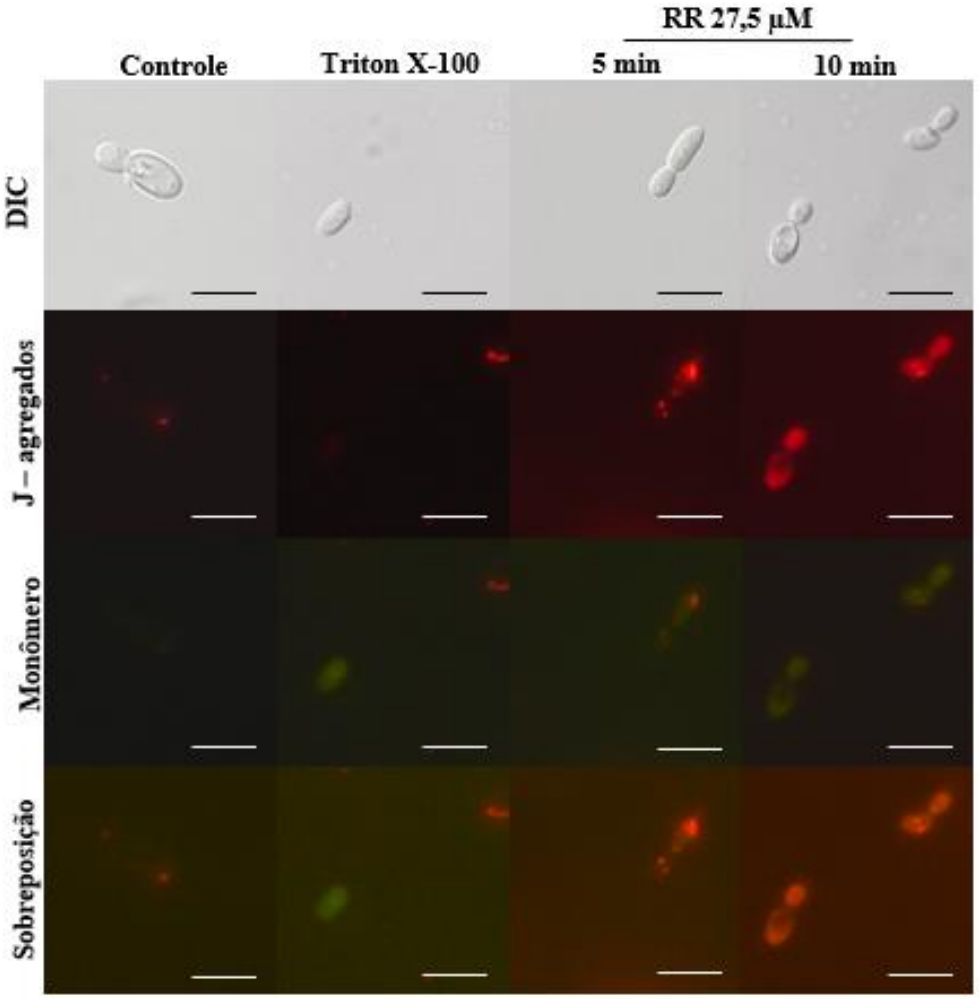


Figura 06. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com RR utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Nos ensaios, células de *C. tropicalis* foram incubadas com JC-1 (20 µM) por 50 min e RR (27,5 µM) por 5 e 10 min. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm.

Após a confirmação de que RR induz hiperpolarização mitocondrial nos minutos iniciais após a interação, *i.e.* 5 min, investigamos o efeito de íons sobre a hiperpolarização mitocondrial induzida pelos peptídeos em *C. tropicalis* e começamos avaliando os efeitos da suplementação com o íon K^+. As células co-incubadas com RR e K^+ não apresentaram hiperpolarização mitocondrial (Fig. 07). Do mesmo modo, nas células incubadas com RR por 40 e 45 min e então com K^+ 10 e 5 min, respectivamente, para completar o tempo de incubação da sonda de 50 min, também não apresentaram hiperpolarização mitocondrial, indicando uma reversão da hiperpolarização mitocondrial (Fig. 07).

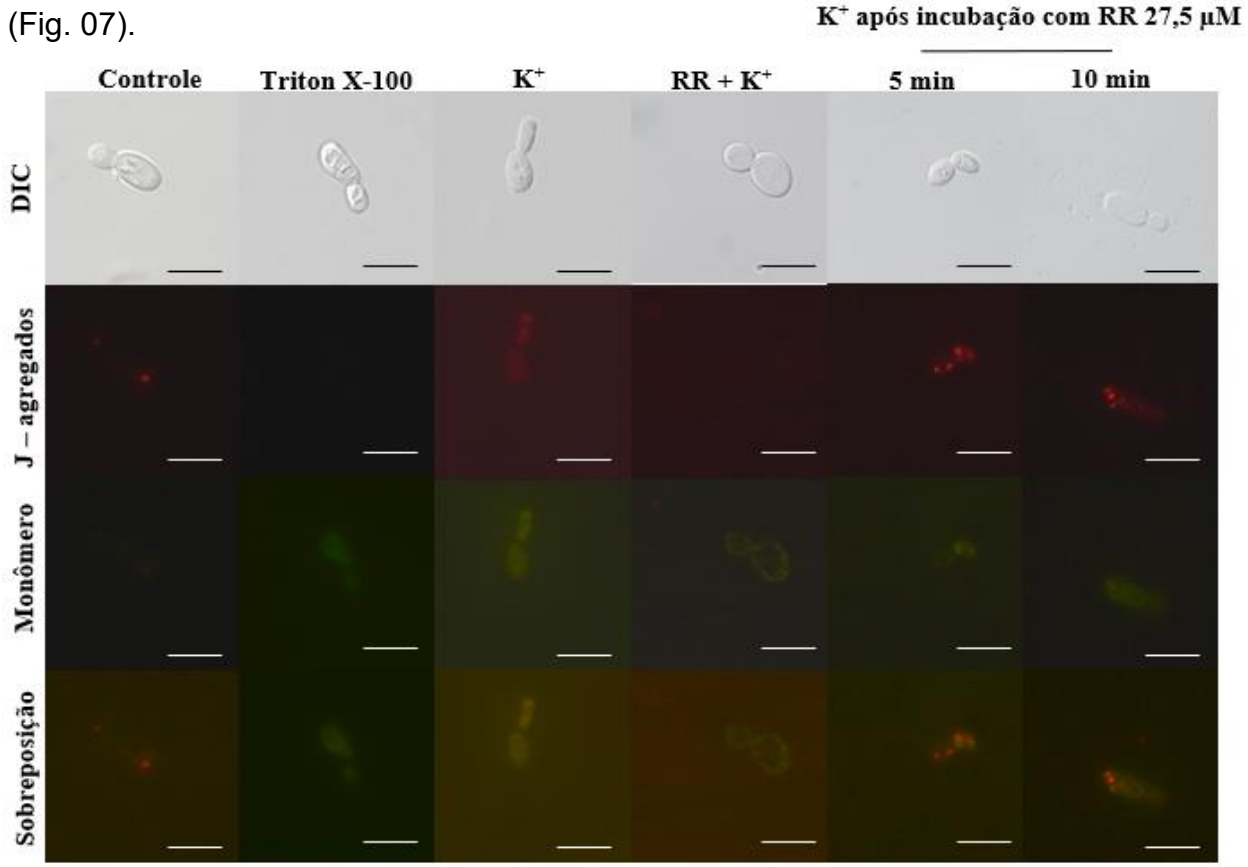


Figura 07. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com RR (27,5 µM) e K^+ (100 mM de KCl), utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. K^+: células incubadas com K^+. RR + K^+: células co-incubadas com K^+ e RR. 5 min e 10 min: células incubadas com K^+ por 10 e 5 min após a adição de RR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm.

Outro cátion monovalente investigado além do K^+ foi o Na^+. Os resultados mostraram que as células de *C. tropicalis* co-incubadas com RR e Na^+, após o período de incubação da sonda JC-1, não apresentaram aumento da intensidade de fluorescência indicando que o Na^+ protege da hiperpolarização mitocondrial induzida por RR. Nas células incubadas com a sonda e RR, por 40 e 45 min, e posteriormente incubadas com Na^+ por 10 e 5 min também não apresentaram hiperpolarização da membrana mitocondrial indicando a proteção causada pela adição do íon (Fig. 08).

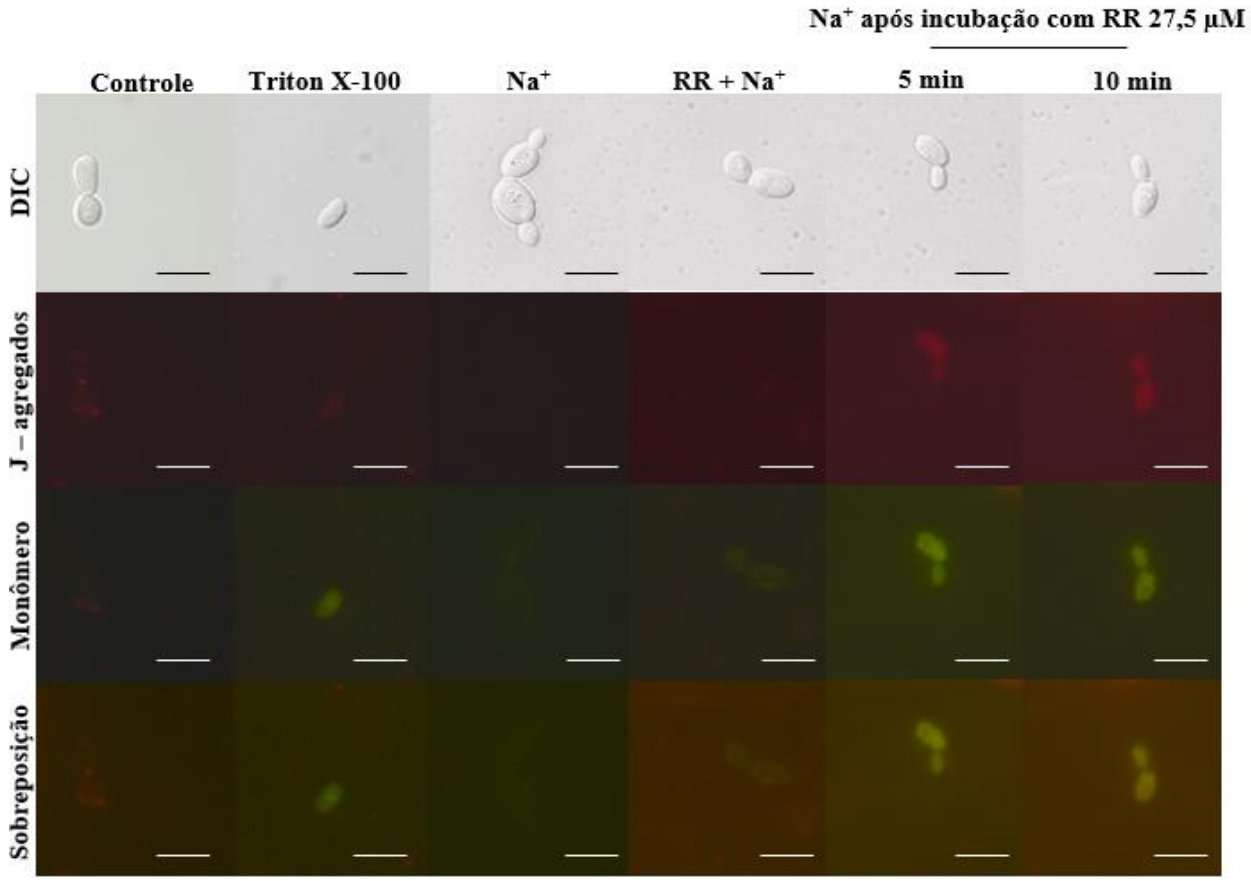


Figura 08. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com RR (27,5 µM) e Na^+ (100 mM de NaCl), utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Na^+: células incubadas com Na^+. RR + Na^+: células co-incubadas com Na^+ e RR. 5 min e 10 min: células incubadas com Na^+ por 10 e 5 min após a adição de RR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm.

Outro íon testado foi o Mg^{+2}. As células de *C. tropicalis* co-incubadas com RR e Mg^{+2}, após o período de incubação da sonda JC-1, não apresentaram aumento da intensidade de fluorescência indicando que o Mg^{+2} protege da hiperpolarização mitocondrial induzida por RR. Nas células incubadas com a sonda e RR por 40 e 45 min, e posteriormente incubadas com Mg^{+2} por mais 10 e 5 min também não apresentaram hiperpolarização da membrana mitocondrial (Fig. 09).

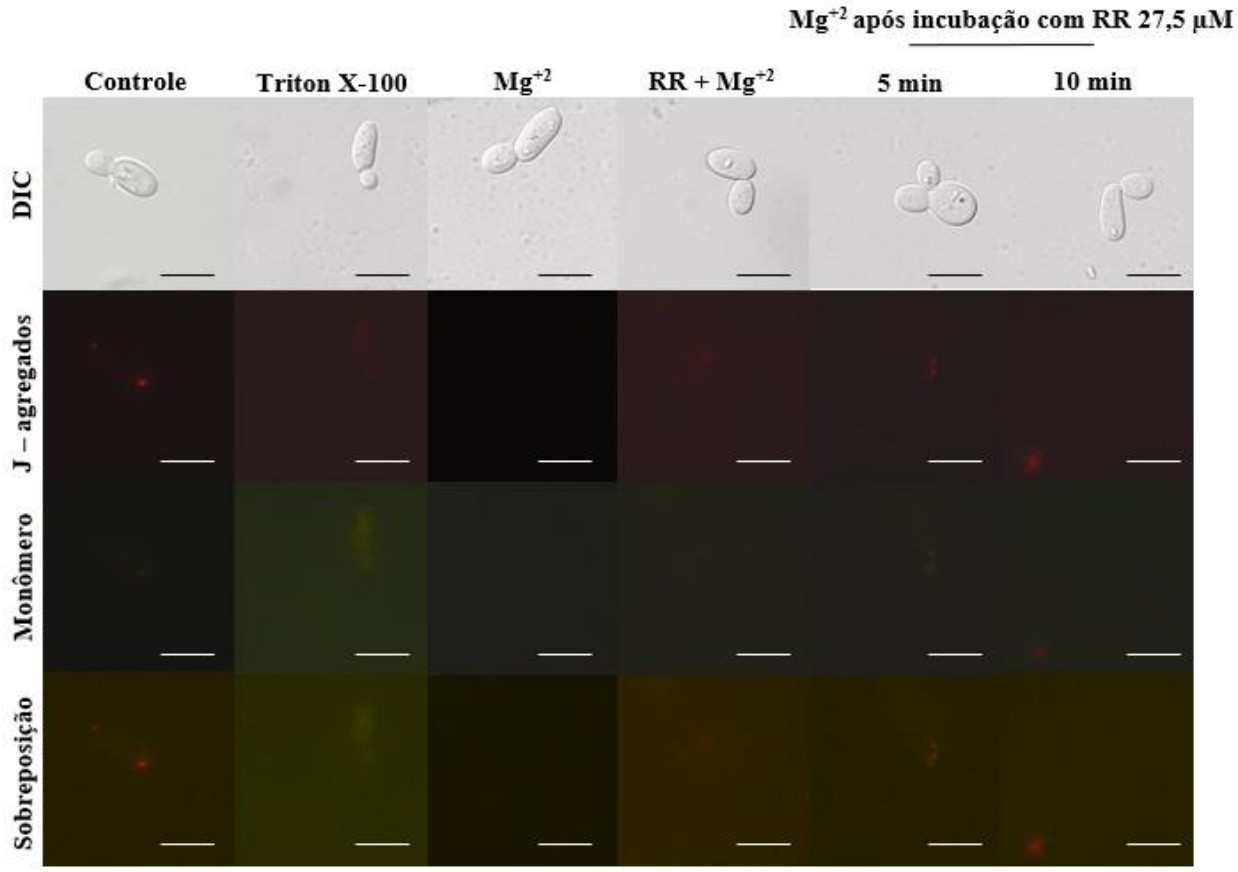


Figura 09. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com RR (27,5 µM) e Mg^{+2} (100 mM de $MgCl_2$), utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Mg^{+2}: células incubadas com Mg^{+2}. RR + Mg^{+2}: células co-incubadas com Mg^{+2} e RR. 5 min e 10 min: células incubadas com Mg^{+2} por 10 e 5 min após a adição de RR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm.

O último íon testado foi o Ca^{+2}. As células de *C. tropicalis* co-incubadas com RR e Ca^{+2}, após o período de incubação da sonda JC-1, não apresentaram aumento da intensidade de fluorescência indicando que o Ca^{+2} protege da hiperpolarização mitocondrial causada por RR. Nas células incubadas com a sonda e RR por 40 e 45 min, e posteriormente incubadas com Ca^{+2} por 10 e 5 min também não apresentaram hiperpolarização da membrana mitocondrial indicando a proteção causada pelo íon (Fig. 10).

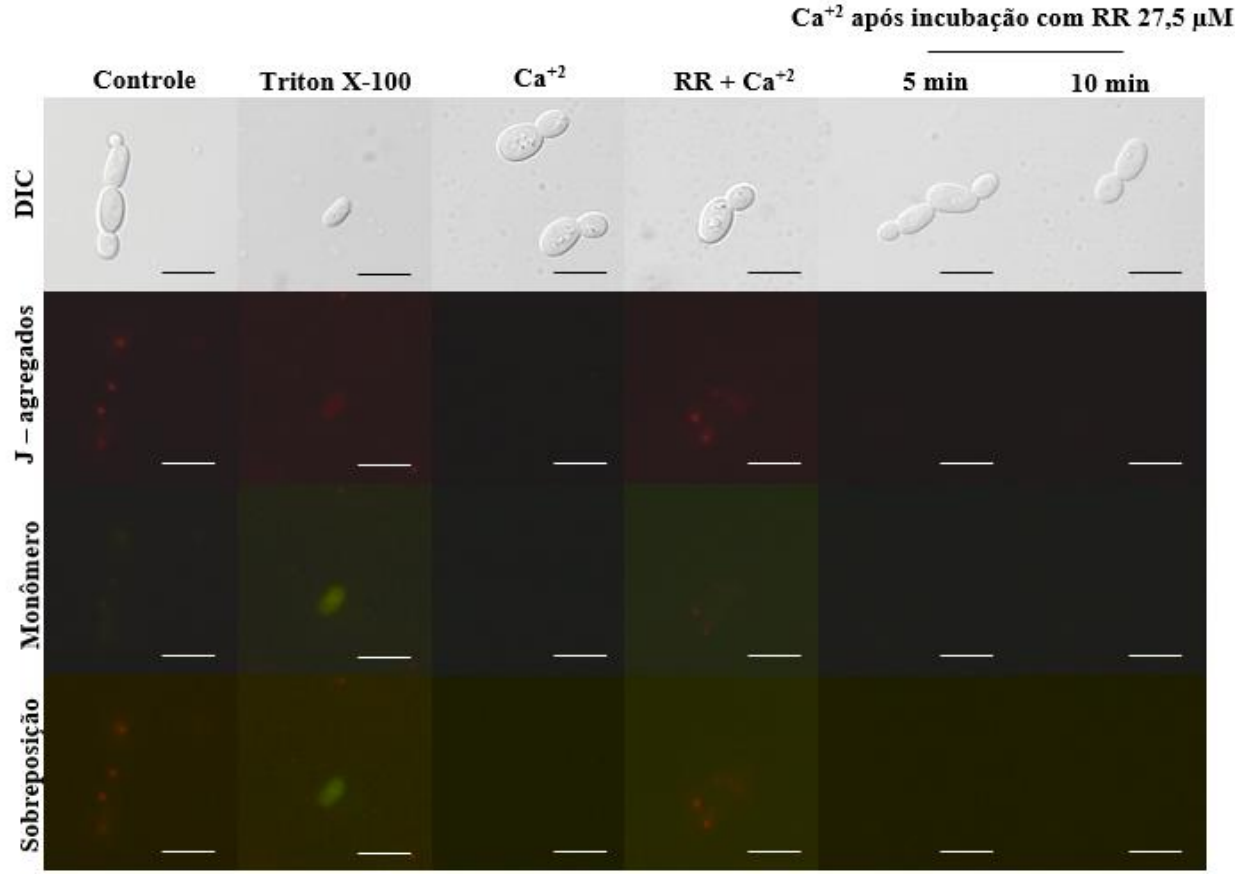


Figura 10. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com RR (27,5 µM) e Ca^{+2} (100 mM de $CaCl_2$), utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Ca^{+2}: células incubadas com Ca^{+2}. RR + Ca^{+2}: células co-incubadas com Ca^{+2} e RR. 5 min e 10 min: células incubadas com Ca^{+2} por 10 e 5 min após a adição de RR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm.

Para dar suporte ao aumento do potencial de membrana mitocondrial indicado pela sonda JC-1, fizemos um ensaio de metabolismo mitocondrial utilizando o sal de tetrazólio WST-1. A atividade mitocondrial avaliada pelo WST-1 mostrou um aumento na redução do WST-1 a formazan nas células tratadas com RR, de +53,13% em 5 min para +78,67% em 30 min em relação ao seu respectivo controle de cada tempo, sugerindo que o tratamento com RR causa um incremento na atividade das NADH desidrogenases (Tabela 01). O mesmo foi observado na presença com K^+ e RR, com o aumento do metabolismo mitocondrial em +185.21 em 5 min a +226,31 % em 30 min. Na presença do Na^+ e RR a atividade de NAD desidrogenases foi reduzida de -62.82% em 5 min e -70,51% em 30 min (Tabela 01). A adição Mg^{+2} e RR, a atividade de NAD desidrogenases apresentou redução de -40,47% em 5 min e de -52,38% em 30 min (Tabela 01). Para as células tratadas com RR e Ca^{+2} foi observada uma redução na atividade mitocondrial de -71,79% a -79,48% em 30 min (Tabela 01).

Tabela 04. Avaliação da atividade mitocondrial por redução de WST-1 a formazan em células de *Candida tropicalis* tratadas com RR isoladamente ou em combinação dos íons K^+, Na^+, Mg^{+2}, Ca^{+2} nos tempos indicados.

AMOSTRAS	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
	%	%	%	%	%
ÁCIDO ACÉTICO	+211,5	+218,4	+206,3	+207,6	+213,3
TRITON-X 100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
RR	+53,1	+63,1	+65,8	+73,0	+78,6
CONTROLE + K^+	+61,3	+88,8	+93,5	+118,3	+132,7
RR + K^+	+184,2	+173,6	+205,2	+221,0	+226,3

CONTROLE + Na^{+}	-41,8	-38,8	-42,3	-44,1	-46,8
RR + Na^{+}	-62,8	-65,3	-64,1	-66,6	-70,5
CONTROLE + Mg^{+2}	-69,0	-64,2	-57,1	-57,1	-59,5
RR + Mg^{+2}	-40,4	-38,0	-45,2	-50	-52,3
CONTROLE + Ca^{+2}	+34,6	+57,6	+74,3	+73,0	+115,3
RR + Ca^{+2}	-71,7	-76,92	-75,6	-75,6	-79,4

Controle: células da levedura cultivadas em meio. Controle positivo: células da levedura tratada com ácido acético (AcA) a 333 mM. Controle negativo: células da levedura tratada com Triton X-100 a 2%. Os valores positivos ou negativos indicam aumento ou diminuição da redução do WST-1 em relação ao valor de redução do WST-1 no controle que foi considerado como 100% **** $P < 0,0001$. O ensaio é representativo de um ensaio independente de três.

Nossos resultados indicam que células de *C. tropicalis* possivelmente estão sofrendo uma disfunção mitocondrial após a interação com RR como indicado pela hiperpolarização da membrana mitocondrial e pelo aumento da atividade de NAD desidrogenases mitocondriais (Figs. 06 e Tabela 04). Neste contexto, foi analisada a produção de ROS que derivam principalmente da atividade mitocondrial. Adicionalmente, resultados anteriores do grupo indicam que ROS são importantes mediadores da atividade antifúngica dos peptídeos (LUCAS et al., 2024). Portanto, foi avaliada a produção de ROS com a sonda H_2DCFDA em células de *C. tropicalis* tratada com RR. O resultado indica uma elevação dos níveis de ROS a partir dos 5 min, com intensificação do sinal aos 10 min. Esses resultados indicam que o peptídeo RR induz um quadro de estresse oxidativo já nos primeiros minutos após a interação com as células de *C. tropicalis* (Fig. 11).

A adição dos íons mostra que para o K^{+} tanto na condição de co-incubação quanto na de pós-incubado não ocorre indução de ROS (Fig. 11). Para o íon Na^{+} co-incubado com RR não há indução de ROS, mas quando os íons são pós-incubados em 5 e 10 min há a produção de ROS (Fig. 11). Para o íon Mg^{+2} não há indução de ROS em nenhuma das condições de incubação (Fig. 11) e para o íon Ca^{+2} há a indução de ROS em todas as condições de incubação (Fig. 11).

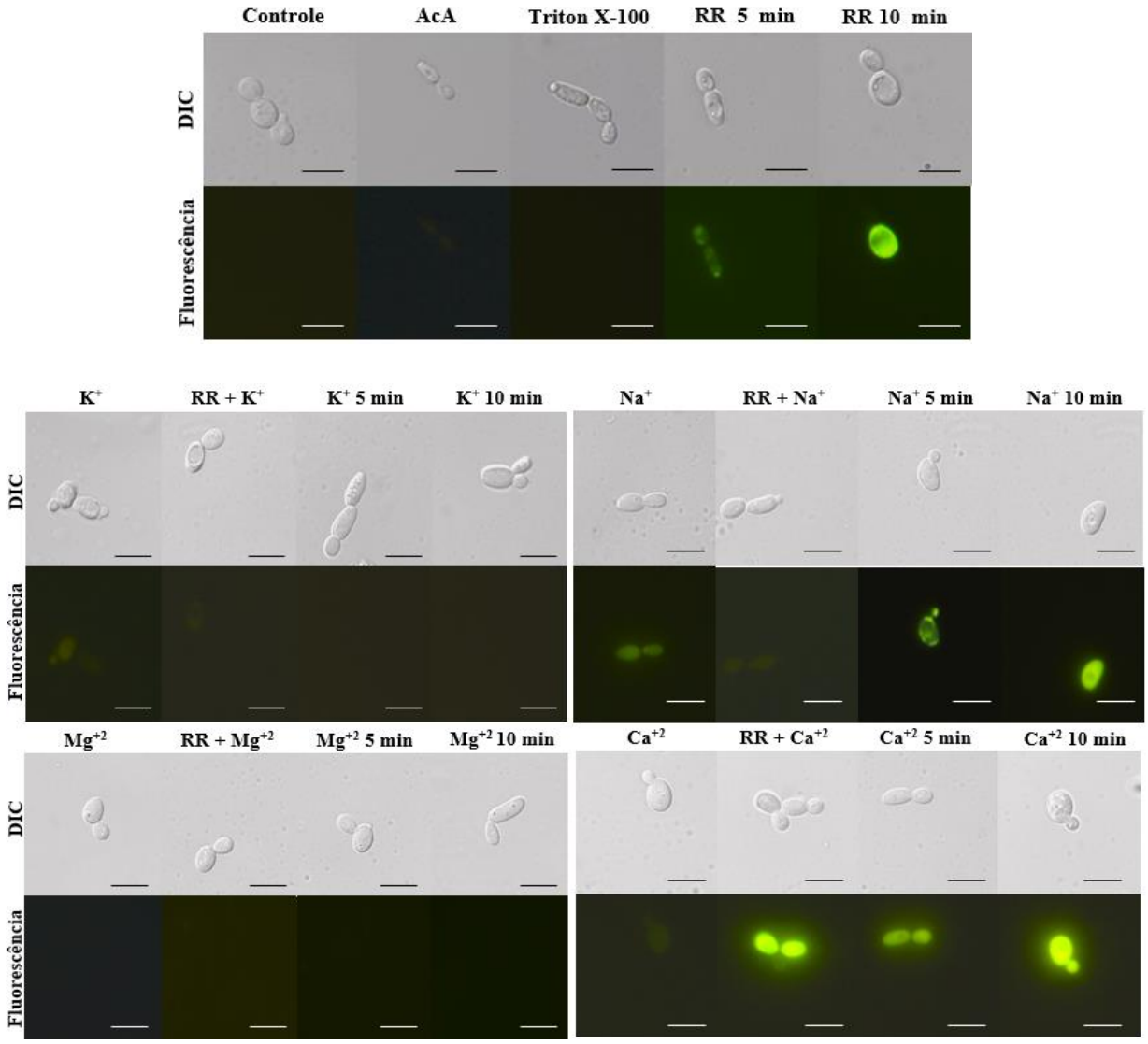


Figura 11. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em células de *Candida tropicalis* tratadas com RR utilizando a sonda 2',7'- diclorofluresceína diacetato por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com 20 µM da sonda por 30 min. Controle negativo: células incubadas com Triton X-100 a 2% e 20 µM da sonda por 30 min. Controle positivo: células incubadas com 333 mM de ácido acético (AcA). Controle com K^+, Na^+, Mg^{+2}, Ca^{+2}: células incubadas com 20 µM da sonda por 30 min e os diferentes íons (100 mM dos sais KCl, ou NaCl, ou $MgCl_2$, ou $CaCl_2$). RR + K^+, RR + Na^+, RR + Mg^{+2} e RR + Ca^{+2}: células de *C. tropicalis* foram co-incubadas com a sonda e 27,5 µM do peptídeo RR os íons indicados. K^+ 5 e 10 min, Na^+ 5 e 10 min, Mg^{+2} 5 e 10 min e Ca^{+2} 5 e 10 min: células de *C. tropicalis* tratadas com 27,5 µM de RR por 20 e 25 min e posteriormente incubadas com os íons indicados por 5 min e 10 min. Barras = 10 µm.

Adicionalmente, os dados de microscopia indicaram que as células de *C. tropicalis* tratadas com RR apresentava encolhimento celular desde 5 min de incubação (Fig. 06). No entanto, as células que foram incubadas com RR e os íons, as imagens indicam que para co-incubação com os íons K^+, Na^+, Mg^{+2} e Ca^{+2}, as células de *C. tropicalis* não apresentaram alterações morfológicas como a granulosidade do citoplasma e o encolhimento celular (Figs. 07, 08, 09, 10). Para a condição de pós-incubação as células de *C. tropicalis* continuaram a apresentaram as alterações para K^+ e Na^+ (Fig. 07, 08), e para os íons Mg^{+2} e Ca^{+2}, as células de *C. tropicalis* não apresentaram as alterações moforlógicas (Fig. 09 e 10).

Em conjunto, os resultados indicam que a disfunção mitocondrial está relacionada com a morte celular induzida por RR. Para reforçar esta participação da hiperpolarização mitocondrial na morte induzida por RR, foi feito um ensaio de viabilidade com o tempo de incubação de RR de 0, 30 e 60 min. Este resultado mostra que neste primeiro tempo onde já é observada a hiperpolarização mitocondrial (Fig. 06), RR induz a morte de 89,52%, e para os demais tempos a porcentagem de morte atingiu 99,18% e 100%, respectivamente, das células de *C. tropicalis* (Fig. 12). Este dado indica que RR induz a morte as células logo após o evento da hiperpolarização mitocondrial (Fig. 06) e indução de ROS (Fig. 11).



Figura 12. Avaliação da viabilidade celular de *Candida tropicalis* tratada com a dose letal (27,5 µM) do peptídeo RR nos tempos de 0 (apenas no tempo necessário para a montagem do experimento) 30 min e 60 min após a exposição. UFC: unidades formadoras de colônias. O controle consistiu em células submetidas ao mesmo procedimento, porém sem adição do peptídeo. O percentual de perda da viabilidade celular foi calculado considerando UFC do controle como 100% de viabilidade. **** P < 0,0001. O ensaio é representativo de um ensaio independente de três.

Para o peptídeo D-RR, uma versão do RR contendo aminoácidos D-enantiômeros, a avaliação do potencial de membrana mitocondrial revelou que o peptídeo também causou acúmulo precoce da sonda JC-1 na mitocôndria, já a partir de 5 min, com aumento da fluorescência vermelha (Fig. 08). Assim como no tratamento com RR, observou-se diminuição no tamanho celular e vacuolização progressiva (Fig. 13), corroborando os dados de morte celular regulada com envolvimento mitocondrial.

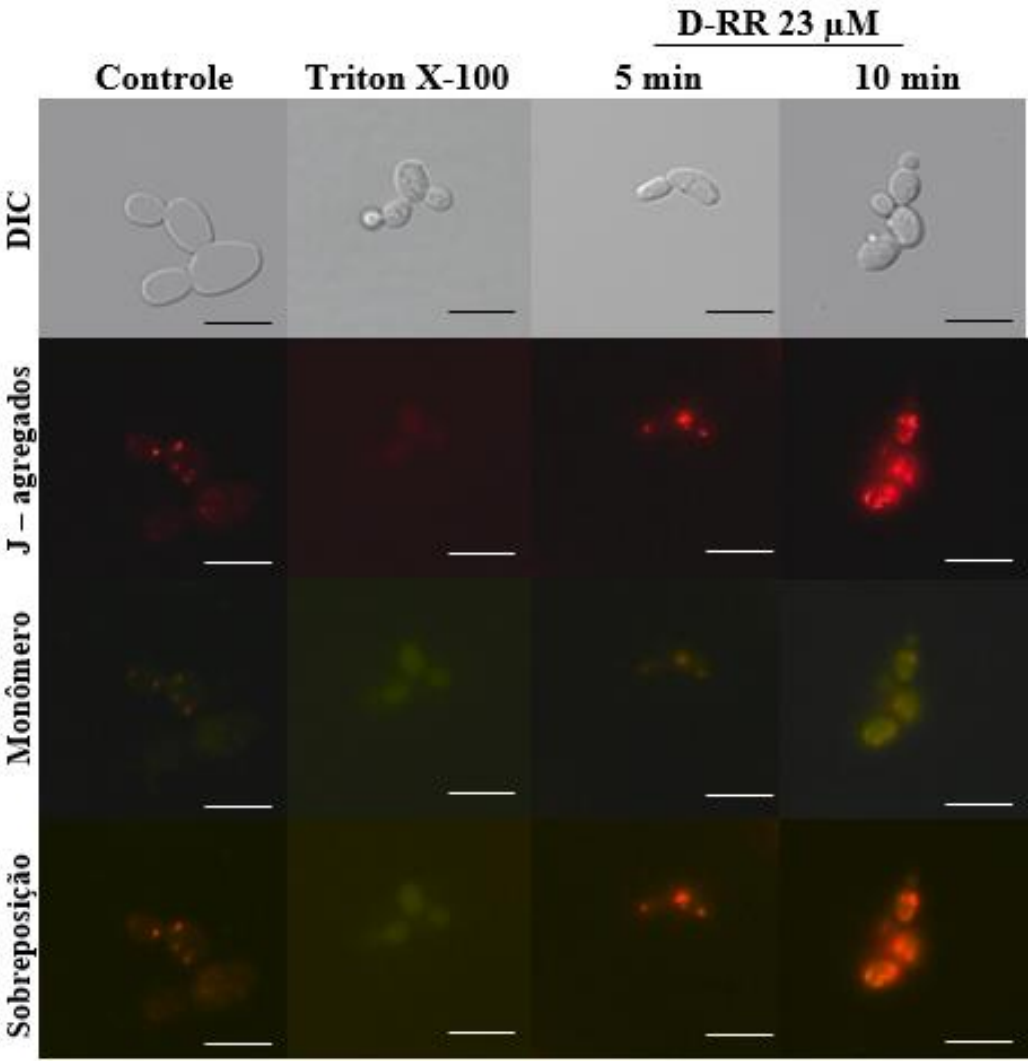


Figura 13. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com D-RR, utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Nos ensaios, células de *C. tropicalis* foram incubadas com JC-1 (20 µM) por 50 min e D-RR (23 µM) por 5 e 10 min. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm

baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm.

Após a confirmação de que o peptídeo D-RR induz hiperpolarização da membrana mitocondrial nos primeiros minutos de interação (*i.e.*, a partir de 5 min), avaliamos o efeito protetor do íon K^+ na morte celular induzida. Para isso, investigamos o impacto da suplementação com K^+ em tempos iniciais da interação. As células de *C. tropicalis* co-incubadas com D-RR (23 µM) e K^+ não apresentaram sinais de hiperpolarização mitocondrial (Fig. 14). De forma semelhante, células tratadas com D-RR por 40 e 45 min e posteriormente incubadas com K^+ por 5 e 10 min também não apresentaram alteração no potencial de membrana mitocondrial (Fig. 14).

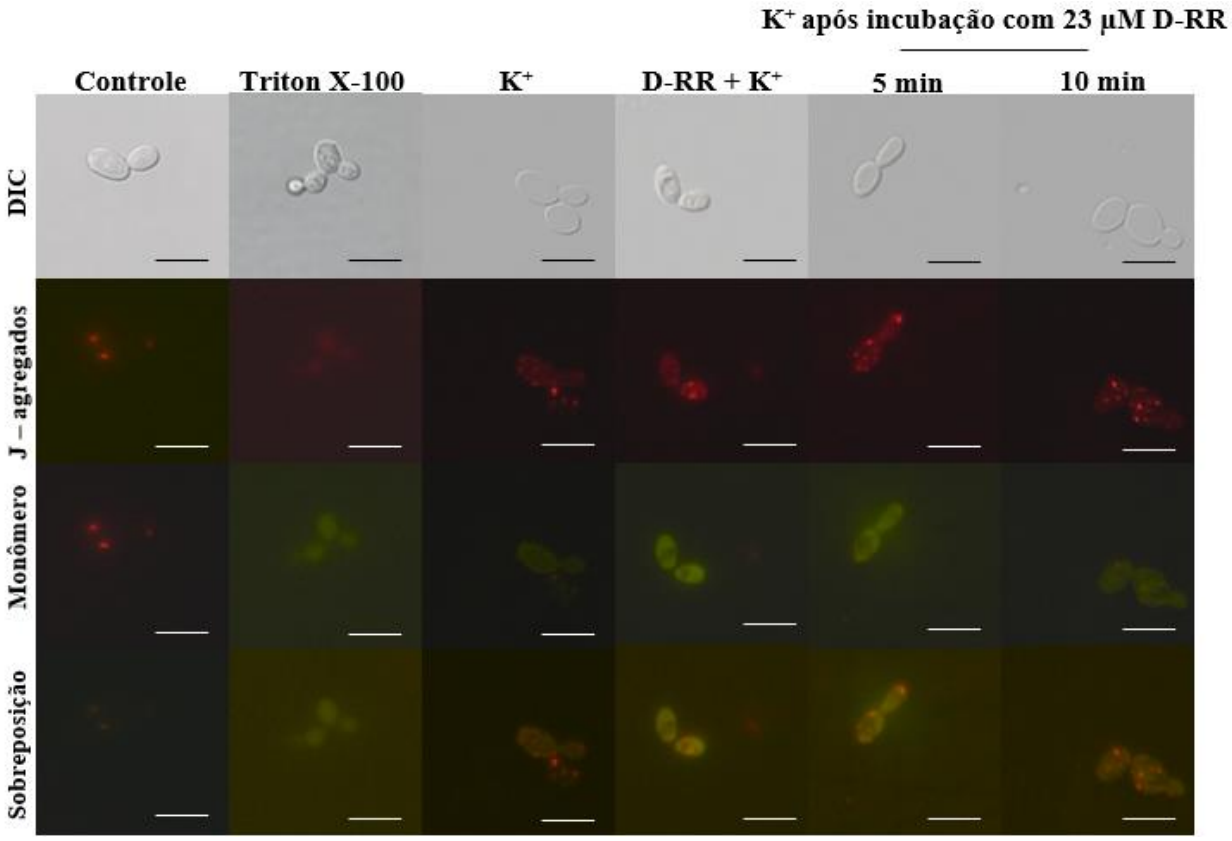


Figura 14. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com D-RR (23 µM) e K^+ (100 mM de KCl), utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. K^+: células incubadas com KCl. D-RR + K^+: células co-incubadas com K^+ e D-RR. 5 e 10 min: células incubadas com K^+ por 5 e 10 min da adição de D-RR. A fluorescência

vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm.

Além do K^+, outro cátion monovalente avaliado foi o Na^+. Os resultados demonstraram que as células de *C. tropicalis* co-incubadas com o peptídeo D-RR (23 µM) e Na^+ não apresentaram aumento na fluorescência da sonda JC-1, sugerindo que o Na^+ também exerce efeito protetor contra a hiperpolarização mitocondrial induzida por D-RR. De modo semelhante, nas células previamente tratadas com D-RR e incubadas com Na^+ por 5 e 10 min, não foi observada hiperpolarização da membrana mitocondrial, indicando que a adição tardia do íon ainda é capaz de conferir proteção ao potencial de membrana mitocondrial (Fig. 15).

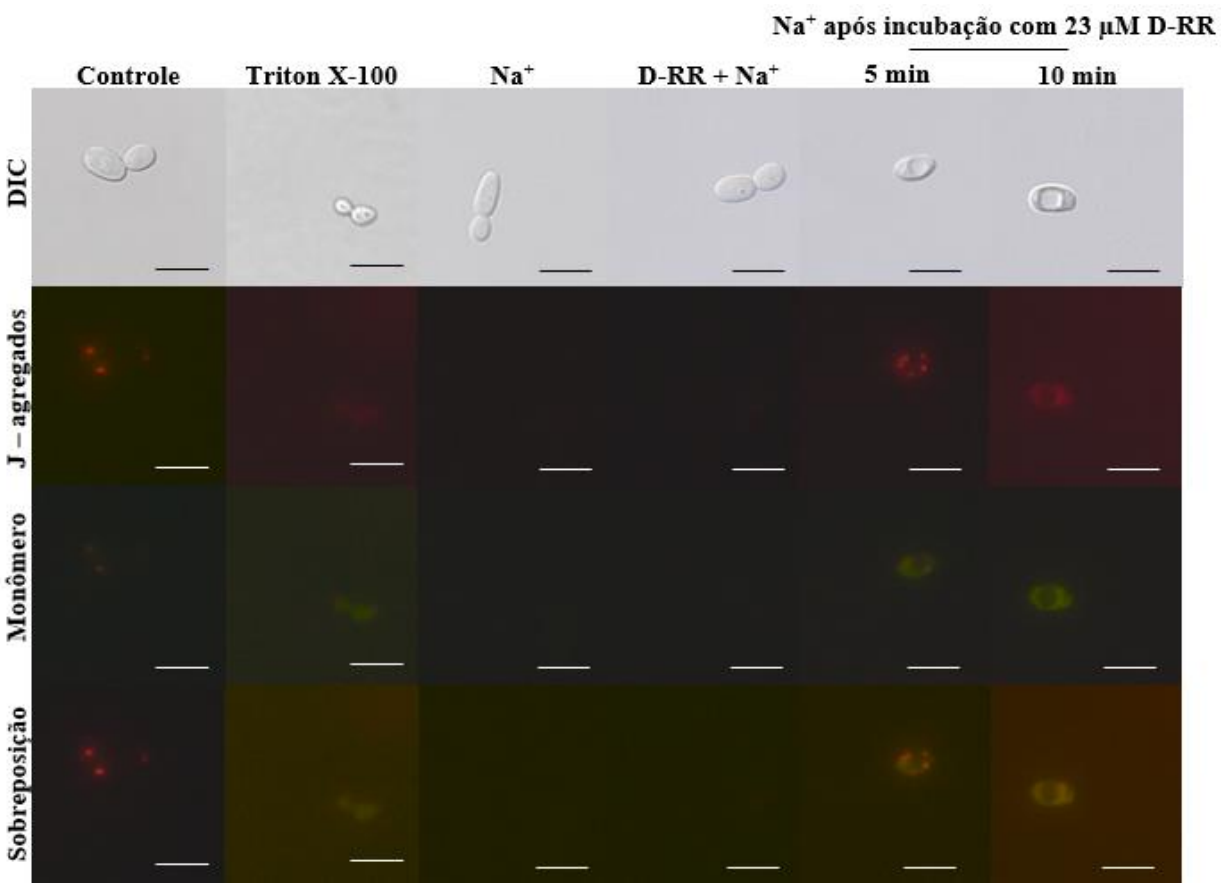


Figura 15. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com D-RR (23 µM) e Na^+ (100 mM de NaCl), utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Na^+: células incubadas com Na^+. D-RR + Na^+: células co-incubadas com Na^+ e D-RR. 5

min e 10 min: células incubadas com Na^{+} após 5 e 10 min da adição de D-RR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm.

Outro íon testado foi o Mg^{+2}. As células de *C. tropicalis* co-incubadas com D-RR e Mg^{+2}, após o período de incubação da sonda JC-1, não apresentaram aumento da intensidade de fluorescência indicando que o Mg^{+2} protege da hiperpolarização mitocondrial induzida por D-RR. Nas células incubadas com a sonda e D-RR por 40 e 45 min, e posteriormente incubadas com Mg^{+2} por 10 e 5 min também não apresentaram hiperpolarização da membrana mitocondrial (Fig. 16).

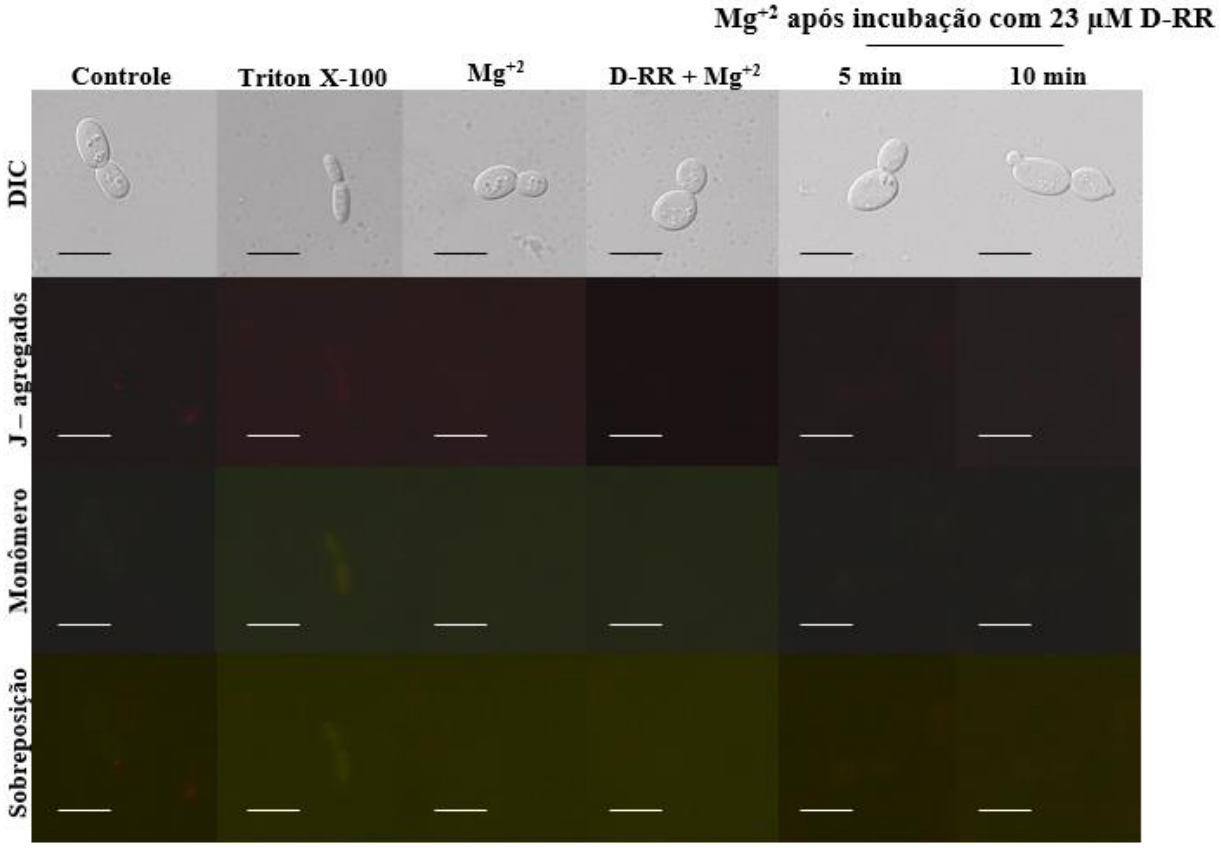


Figura 16. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com D-RR (23 µM) e Mg^{+2} (100 mM de $MgCl_2$), utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Mg^{+2}: células incubadas com $MgCl_2$. D-RR + Mg^{+2}: células co-incubadas com Mg^{+2} e D-RR. 5 min e 10 min: células incubadas com Mg^{+2} por 5 e 10 min da adição de D-RR. A

fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 μm.

O último cátion avaliado foi o íon Ca^{+2}. As células de *C. tropicalis* co-incubadas com o peptídeo D-RR (23 μM) e Ca^{2+} não apresentaram aumento na fluorescência da sonda JC-1, indicando que o íon Ca^{+2} confere proteção contra a hiperpolarização mitocondrial induzida por D-RR. Da mesma forma, nas células previamente tratadas com D-RR e submetidas à adição de Ca^{+2} após 40 e 45 min, não foi observada alteração no potencial de membrana mitocondrial, evidenciando que o Ca^{+2} também é capaz de atenuar os efeitos iniciais do peptídeo sobre a mitocôndria (Fig. 17).

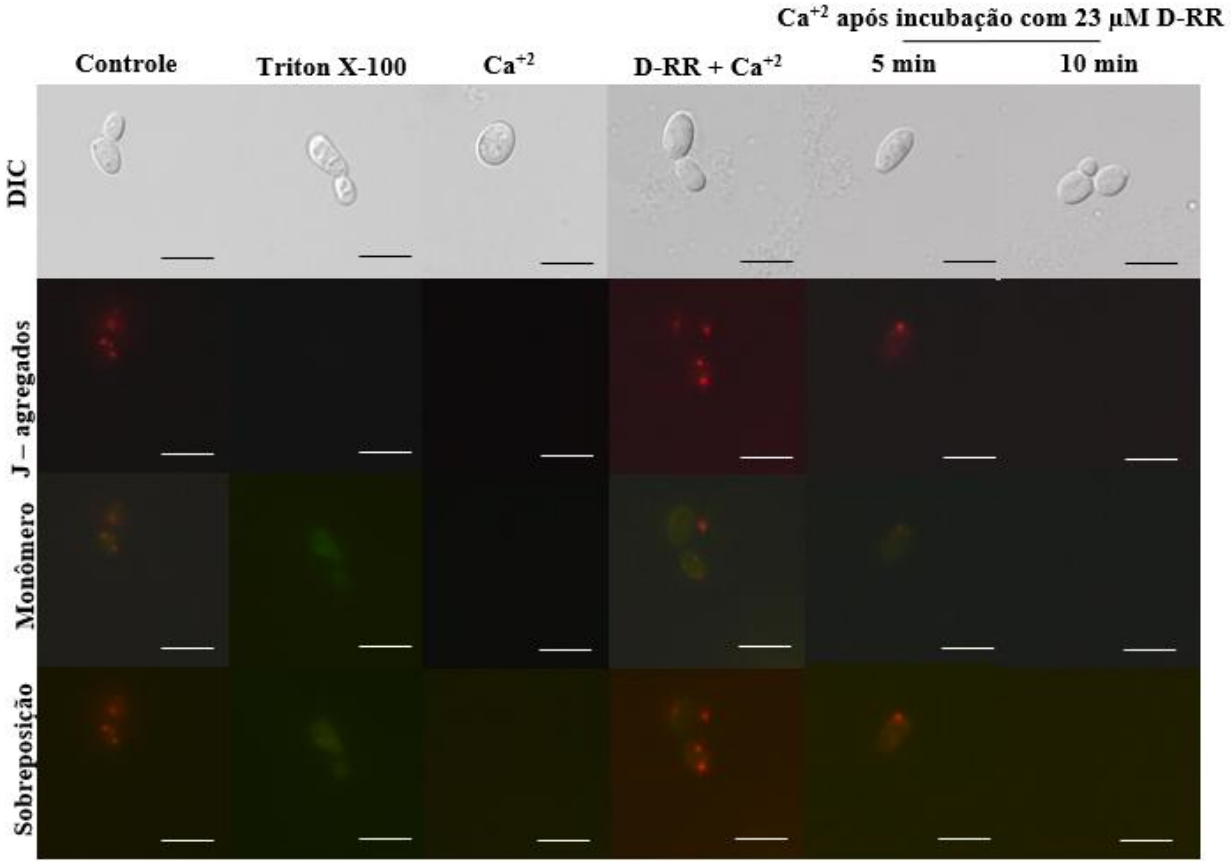


Figura 17. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* tratadas com D-RR (23 μM) e Ca^{+2} (100 mM de $CaCl_2$), utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 μM) por 50 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 μM) por 50 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Ca^{+2}: células incubadas com $CaCl_2$. D-RR + Ca^{+2}: células co-incubadas com Ca^{+2} e D-RR. 5 min e 10 min: células incubadas com $CaCl_2$ após 5 e 10 min da adição de D-RR.

A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 μm.

Para dar suporte ao aumento do potencial de membrana mitocondrial indicado pela sonda JC-1, fizemos um ensaio de metabolismo mitocondrial utilizando o sal de tetrazólio WST-1. A atividade mitocondrial avaliada pelo WST-1 mostrou um aumento na redução do WST-1 a formazan nas células tratadas com D-RR, de +269,57% em 5 min para +317,74% em 30 min em relação ao seu respectivo controle de cada tempo, sugerindo que o tratamento com D-RR causa um incremento na atividade das NADH desidrogenases (Tabela 05). O mesmo foi observado na presença com K^+, com o aumento do metabolismo mitocondrial em +136,36% em 5 min a +493,93% em 30 min. Na presença do Na^+ a atividade de NAD desidrogenases foi reduzida de 43,75% em 5 min e -9,37% em 30 min com D-RR (Tabela 05). A atividade de NAD desidrogenases apresentou redução de -75,47% em 5 min e de 0% em 30 min para D-RR na presença de Mg^{+2} (Tabela 05). Os resultados mostraram uma redução na atividade mitocondrial nas células tratadas com D-RR e Ca^{2+}, de 85,29% a 61,76% para RR (Tabela 05).

Tabela 05. Avaliação da atividade mitocondrial por redução de WST-1 a formazan em células de *Candida tropicalis* tratadas com D-RR isoladamente ou em combinação dos íons K^+, Na^+, Mg^{+2}, Ca^{+2} nos tempos indicados

AMOSTRAS	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
	%	%	%	%	%
ÁCIDO ACÉTICO	+156,5	+157,8	+147,4	+149,1	+141,9
TRITON-X 100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D-RR	+261,7	+423,5	+455,8	+593,7	+634,3
CONTROLE + K^+	+54,5	+93,9	+124,2	+196,9	+284,8
D-RR + K^+	+136,3	+181,8	+290,9	+378,7	+493,9
CONTROLE + Na^+	-37,5	-40,6	-43,7	-40,6	-43,7
D-RR + Na^+	+43,7	+46,8	+9,3	+3,1	+9,3
CONTROLE + Mg^{+2}	-58,4	-54,7	-52,8	-54,6	-62,2
D-RR + Mg^{+2}	-75,4	-71,6	-77,3	-84,9	- 0,0
CONTROLE + Ca^{+2}	+67,6	+135,2	+135,2	+76,4	+100
D-RR + Ca^{+2}	+85,2	+26,4	+29,4	+20,5	+61,7

Controle: células da levedura cultivadas em meio está para 100%. Controle positivo: células da levedura tratada com ácido acético (AcA) a 333 mM. Controle negativo:

células da levedura tratada com Triton X-100 a 2%. Os valores positivos ou negativos indicam aumento ou diminuição da redução do WST-1 em relação ao valor de redução do WST-1 do controle que foi considerado como 100%. **** P < 0,0001. O ensaio é representativo de um ensaio independente de três.

Conforme mostrado para as células de *C. tropicalis* tratadas com o peptídeo RR, também para o peptídeo D-RR, as células de *C. tropicalis* apresentam disfunção mitocondrial, evidenciado tanto pela hiperpolarização da membrana mitocondrial quanto pelo aumento da atividade das NADH desidrogenases mitocondriais (Tabela 05). Considerando que ROS são principalmente subprodutos da atividade mitocondrial, e que estudos anteriores do grupo apontaram seu papel como mediadores da atividade antifúngica dos peptídeos bioinspirados (LUCAS et al., 2024), avaliou-se a produção de ROS nas células tratadas com D-RR utilizando a sonda H_2DCFDA. Os resultados revelaram um aumento dos níveis intracelulares de ROS a partir de 5 min de incubação com intensificação do sinal aos 10 min, indicando que o peptídeo D-RR induz estresse oxidativo já nos primeiros momentos de interação com as células fúngicas (Fig. 18).

A suplementação com íons revelou diferentes efeitos sobre a produção de ROS. A adição de K^+, tanto co-incubado quanto pós-incubado, induziu a produção endógena de ROS (Fig. 18). Para o Na^+, a co-incubação com D-RR preveniu a produção de ROS, assim como quando o íon foi adicionado após 10 e 5 min (Fig. 18). O Mg^{+2} não induziu produção de ROS em nenhuma das condições testadas (Fig. 18). Por outro lado, a suplementação com Ca^{+2} levou à indução de ROS em todas as condições experimentais (Fig. 18), sugerindo que esse íon não apresenta efeito protetor contra o estresse oxidativo promovido pelo D-RR.

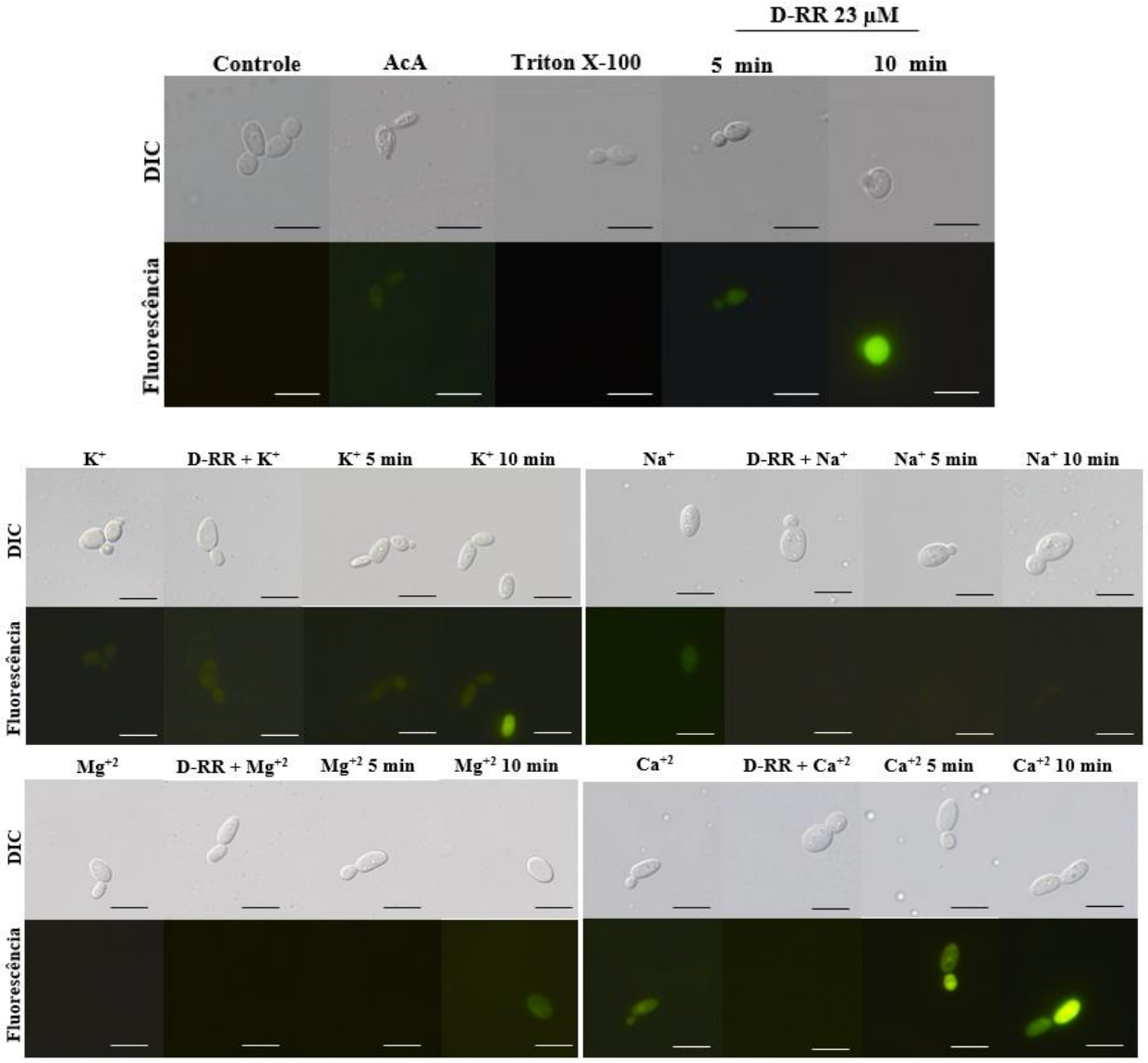


Figura 18. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em células de *Candida tropicalis* tratadas com D-RR utilizando a sonda 2',7'- diclorofluresceína diacetato por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com 20 µM da sonda por 30 min. Controle negativo: células incubadas com Triton X-100 a 2% e 20 µM da sonda por 30 min. Controle positivo: células incubadas com 333 mM de ácido acético (AcA). Controle com K^+, Na^+, Mg^{+2}, Ca^{+2}: células incubadas com 20 µM da sonda por 30 min e os diferentes íons (100 mM dos sais KCl, ou NaCl, ou $MgCl_2$, ou $CaCl_2$). D-RR + K^+, D-RR + Na^+, D-RR + Mg^{+2} e D-RR + Ca^{+2}: células de *C. tropicalis* foram co-incubadas com a sonda e 23 µM do peptídeo RR os íons indicados. K^+ 5 e 10 min, Na^+ 5 e 10 min, Mg^{+2} 5 e 10 min e Ca^{+2} 5 e 10 min: células de *C. tropicalis* tratadas com 23 µM de D-RR por 20 e 25 min e posteriormente incubadas com os íons indicados por 5 min e 10 min. Barras em 10 µm.

Também como mostrado para *C. tropicalis* tratadas com RR, os dados de microscopia indicaram que as células tratadas com D-RR apresentavam encolhimento celular desde 5 min de incubação (Fig. 13). Já para as células de *C. tropicalis* que foram incubadas com D-RR e os íons, as imagens indicam que para co-incubação com os íons K^+, Na^+, Mg^{+2} e Ca^{+2}, as células de não apresentaram alterações morfológicas como a granulosidade do citoplasma e o encolhimento celular (Figs. 14, 15, 16 e 17). Para a condição de pós-incubação as células de *C. tropicalis* continuaram a apresentaram as alterações para K^+ e Na^+ (Fig. 14 e 15), e para os íons Mg^{+2} e Ca^{+2}, as células de *C. tropicalis* não apresentaram as alterações moforlógicas (Figs. 16 e 17).

Assim como mostrado para RR e *C. tropicalis*, para D-RR a disfunção mitocondrial parece estar relacionada com a morte celular induzida pelo peptídeo. Para dar suporte a participação da hiperpolarização mitocondrial na morte induzida em *C. tropicalis* por D-RR, foi feita a viabilidade com o tempo de incubação de 0, 30 e 60 min após a adição de D-RR. Este resultado mostra que D-RR mata neste primeiro tempo 88,72% das ceálulas, e para os demais tempos a porccentagem de morte atingiu 99,68 e 100%, respectivamente, das células de *C. tropicalis* (Fig. 19). Este resultado sugere que D-RR induz a morte das células logo após a indução da hiperpolarização mitocondrial (Fig. 13) e indução de ROS (Fig. 18).



Figura 19. Avaliação da viabilidade celular de *Candida tropicalis* tratada com a dose letal (23 µM) do peptídeo D-RR nos tempos de 0 (apenas no tempo necessário para a montagem do experimento) 30 min e 60 min após a exposição. UFC: unidades formadoras de colônias. O controle consistiu em células submetidas ao mesmo procedimento, porém sem adição do peptídeo. O percentual de perda da viabilidade celular foi calculado considerando UFC do controle como 100% de viabilidade. **** P < 0,0001. O ensaio é representativo de um ensaio independente de três.

4.1.2 Atividade do Peptídeo WR em *Candida albicans*

Neste trabalho, avaliamos o efeito precoce do WR na funcionalidade mitocondrial. A partir de 5 min de tratamento, observou-se acúmulo significativo da sonda JC-1 na mitocôndria de *C. albicans*, com aumento da fluorescência vermelha (Fig. 20), sinalizando hiperpolarização da membrana mitocondrial. Alterações morfológicas semelhantes às observadas nos tratamentos com RR e D-RR também foram detectadas: células menores e vacuolizadas desde os primeiros minutos de exposição (Fig. 20).

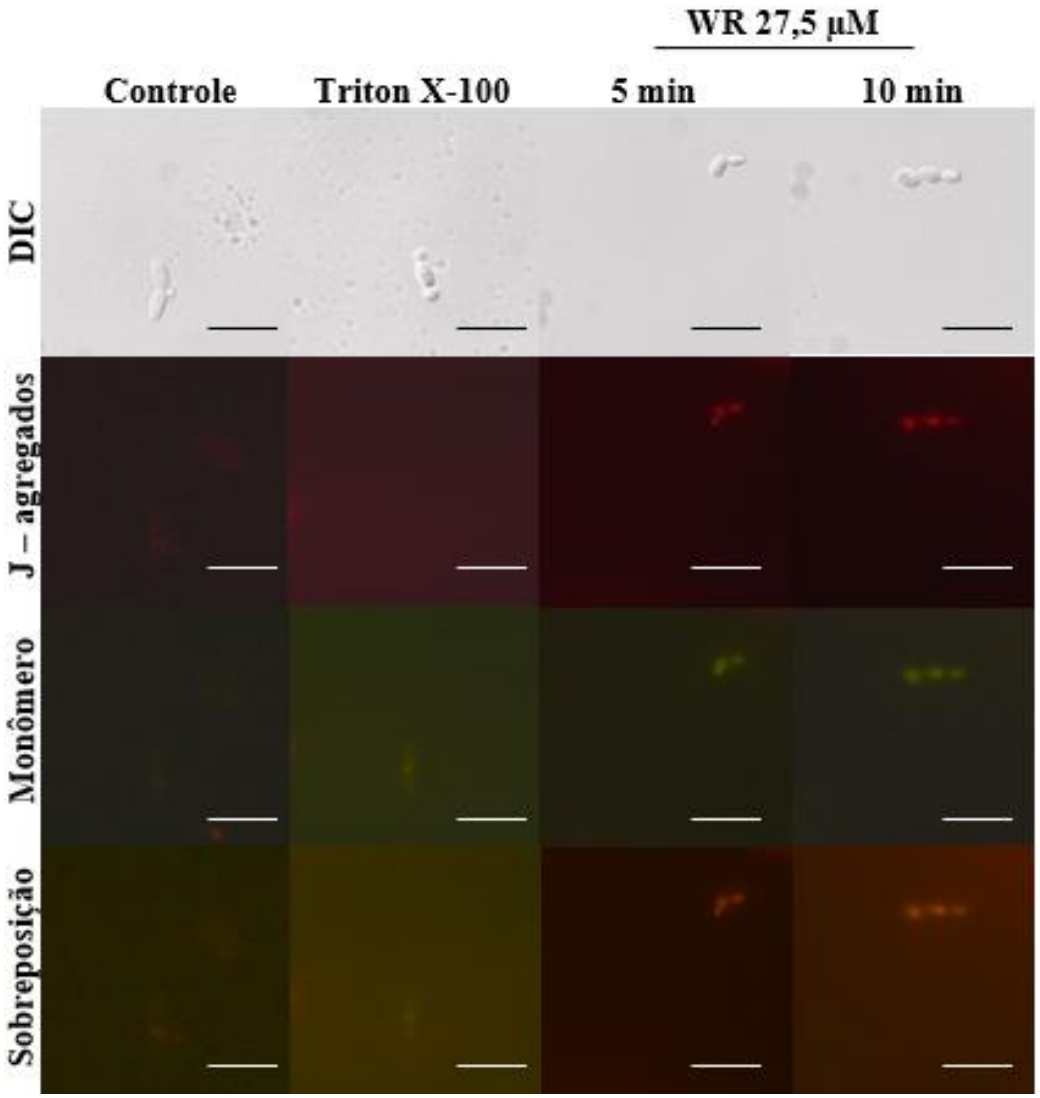


Figura 20. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida albicans* tratadas com WR, utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 30 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 30 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Nos ensaios, células de *C. albicans* foram incubadas com JC-1 (20 µM) por 30 min e WR (27,5 µM) por 5 e 10 min. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto),

enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm.

Com a confirmação que o peptídeo WR induz hiperpolarização da membrana mitocondrial nos primeiros minutos de interação (*i.e*., a partir de 5 min), avaliamos o efeito protetor do K^+ na morte celular induzida. Para isso, investigamos o impacto da suplementação com K^+ em tempos iniciais da interação. As células de *C. albicans* co-incubadas com WR (27,5 µM) e 200 mM de KCl não apresentaram sinais de hiperpolarização mitocondrial (Fig. 21). De forma semelhante, células tratadas com WR por 20 e 25 min e posteriormente incubadas com K^+ por 10 e 5 min também não apresentaram alteração no potencial de membrana mitocondrial (Fig. 21).

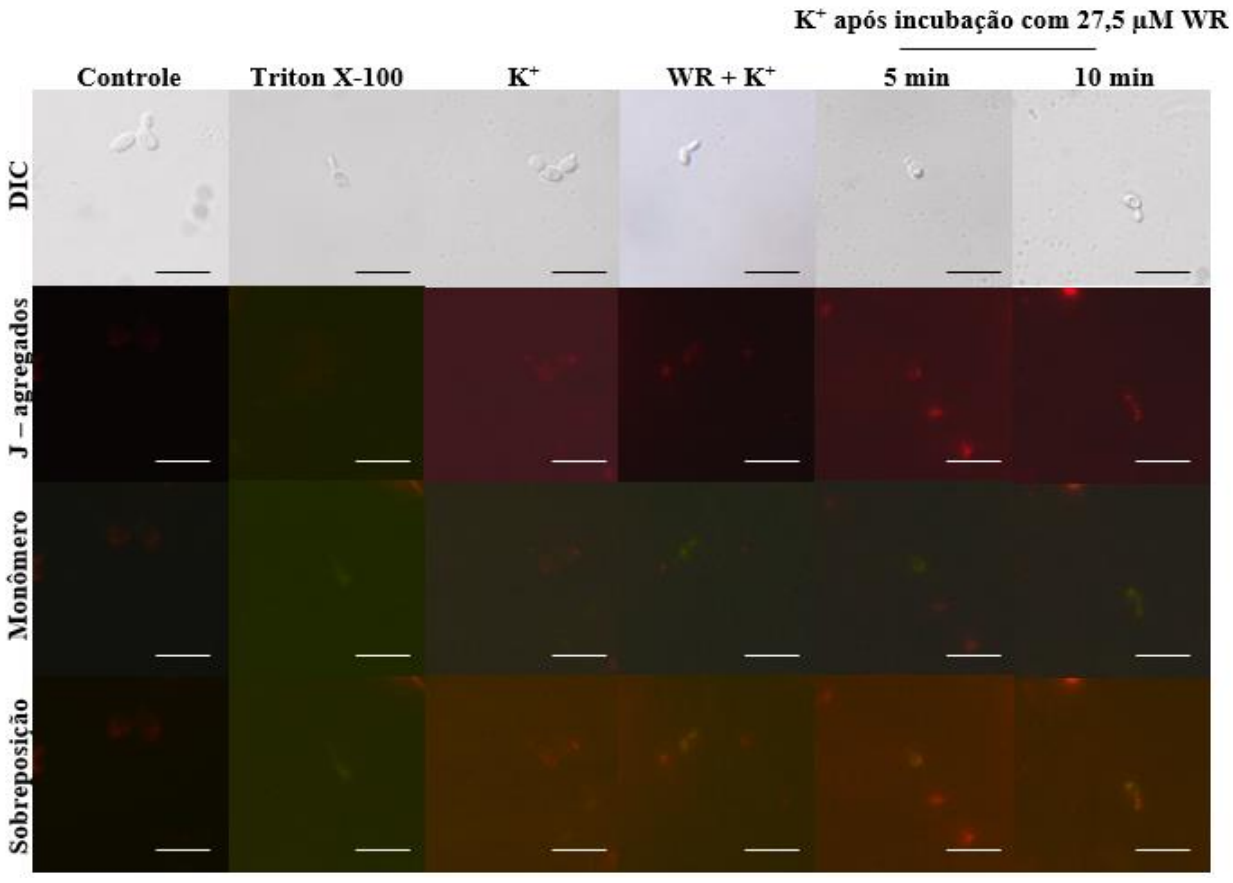


Figura 21. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida albicans* tratadas com WR, utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 30 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 30 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. K^+: células incubadas com K^+. WR + K^+: células co-incubadas com K^+ e WR.. 5 min e 10 min: células incubadas com K^+

por 5 e 10 min após a adição de WR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde Barras de escala = 10 μm.

Para as células de *C. albicans* quando co-incubadas com peptídeo e Na^+ apresentou hiperpolarização mitocondrial, mas a pós-incubação com o íon bloqueou a hiperpolarização mitocondrial causada com a incubação com WR, assim como as alterações morfológicas (Fig. 22).

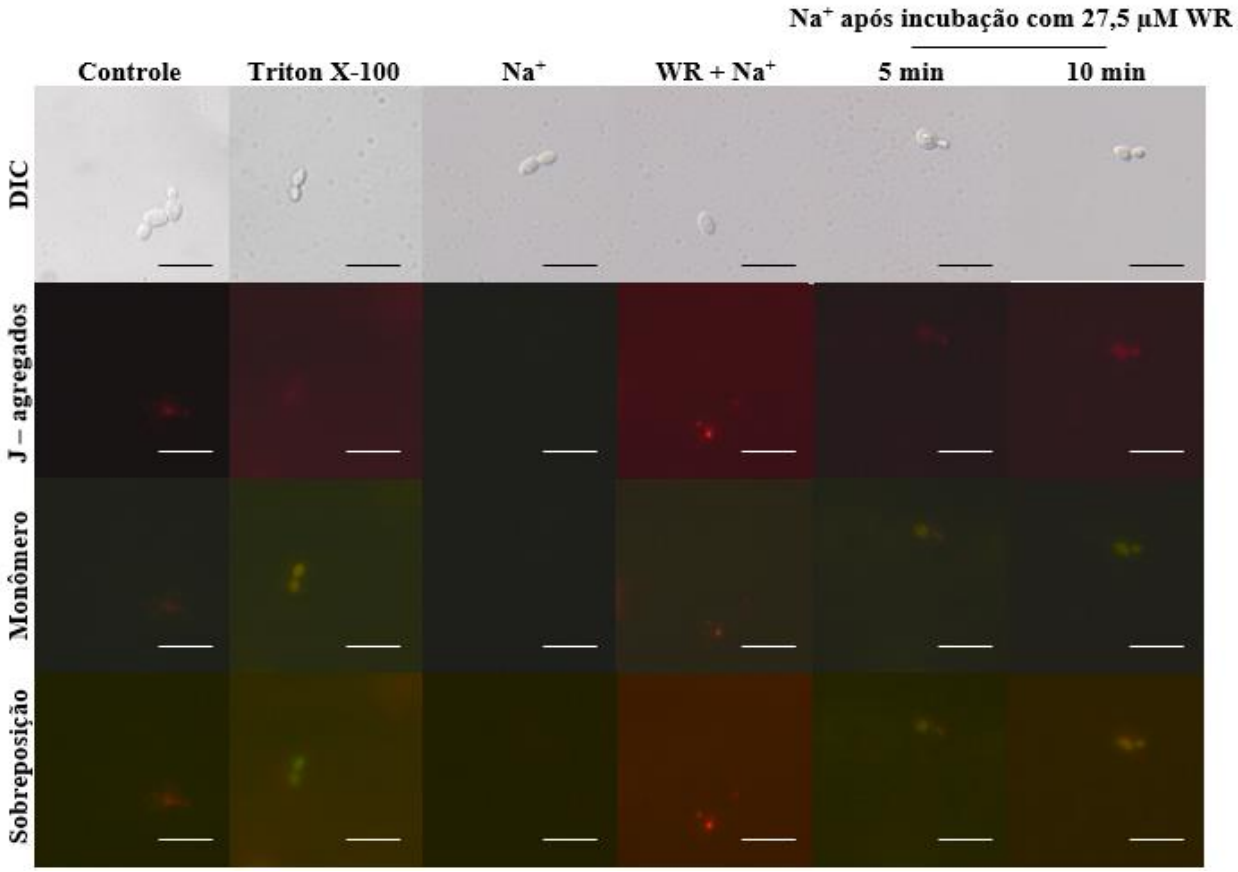


Figura 22. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida albicans* tratadas com WR, utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 μM) por 30 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 μM) por 30 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Na^+: células incubadas com Na^+. WR + Na^+: células co-incubadas com Na^+ e WR. 5 min e 10 min: células incubadas com Na^+ por 5 e 10 min após a adição de WR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação

dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm.

As células de *C. albicans* quando co-incubadas com Mg^{+2} e WR não apresentaram hiperpolarização mitocondrial após o período de incubação da sonda JC-1, não apresentaram aumento da intensidade de fluorescência indicando que o Mg^{+2} protege da hiperpolarização mitocondrial induzida por WR. Nas células incubadas com a sonda e WR por 20 e 25 min, e posteriormente incubadas com Mg^{+2} por 5e 10 min também não apresentaram hiperpolarização da membrana mitocondrial (Fig. 23).

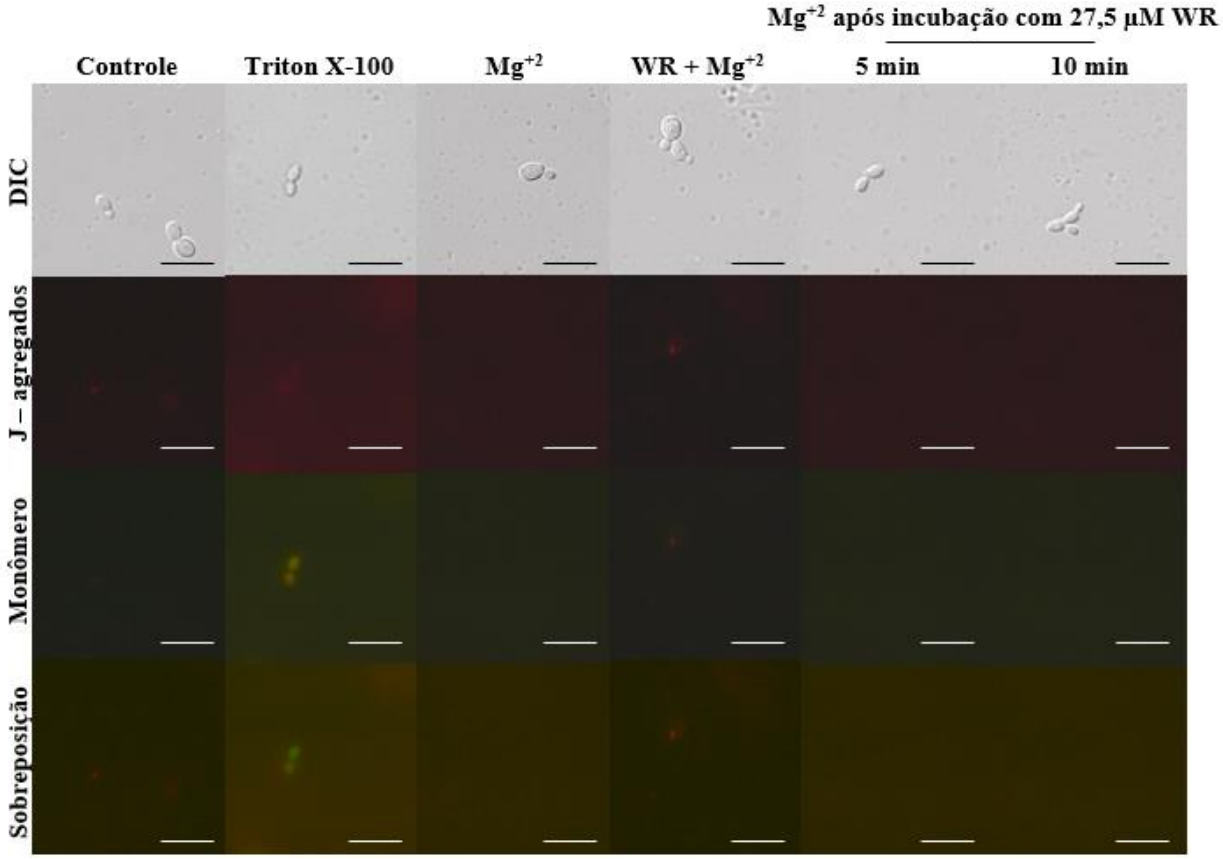


Figura 23. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida albicans* tratadas com WR, utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 30 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 30 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Mg^{+2}: células incubadas com Mg^{+2}. WR + Mg^{+2}: células co-incubadas com Mg^{+2} e WR. 5 min e 10 min: células incubadas com Mg^{+2} por 5 e 10 min após a adição de WR. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm.

Por fim, avaliou-se o efeito do Ca^{+2} em células de *C. albicans* tratadas com o peptídeo WR. As células co-incubadas com Ca^{+2} não apresentaram aumento na fluorescência da sonda JC-1, indicando que o íon confere proteção contra a hiperpolarização mitocondrial induzida por WR. De forma semelhante, nas células previamente tratadas com o peptídeo por 20 e 25 min e submetidas à adição de Ca^{+2} após 10 e 5 min, não foram observadas alterações no potencial de membrana mitocondrial, sugerindo que o Ca^{+2} também é capaz de atenuar os efeitos iniciais do WR sobre a função mitocondrial (Fig. 24).

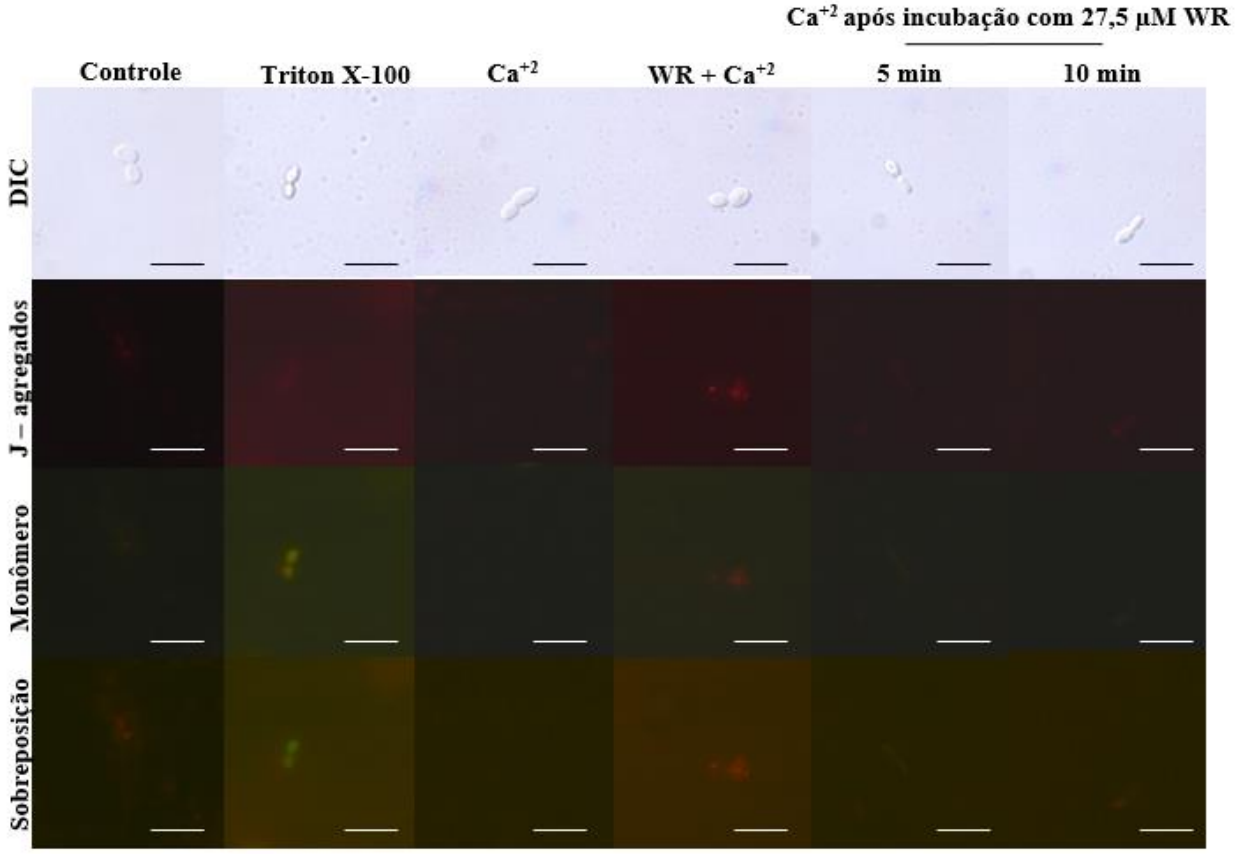


Figura 24. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida albicans* tratadas com WR, utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com JC-1 (20 µM) por 30 min. Controle negativo: células tratadas com Triton X-100 a 2% e JC-1 (20 µM) por 30 min, resultando em completa despolarização mitocondrial. Ca^{+2}: células incubadas com Ca^{+2}. WR + Ca^{+2}: células co-incubadas com Ca^{+2} e WR. 5 min e 10 min: células incubadas com Ca^{+2} por 5 e 10 min após a adição de WR.A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. As imagens foram adquiridas com excitação/emissão em 514/529 nm (verde) e 514/590 nm (vermelho). Barras de escala

= 10 µm.

Para dar suporte ao aumento do potencial de membrana mitocondrial indicado pela sonda JC-1, fizemos um ensaio de metabolismo mitocondrial utilizando o sal de tetrazólio WST-1. A atividade mitocondrial avaliada pelo WST-1 mostrou um aumento na redução do WST-1 a formazan nas células tratadas com WR, de +261.76% em 5 min para +634.38% em 30 min em relação ao seu respectivo controle de cada tempo, sugerindo que o tratamento com WR causa um incremento na atividade das NADH desidrogenases (Tabela 06). O mesmo foi observado na presença com K^+, com o aumento do metabolismo mitocondrial em +500% em 5 min a +700% em 30 min. Na presença do Na^+ a atividade de NAD desidrogenases foi aumentada de +185.29% em 5 min e +226.47% em 30 min com WR (Tabela 06). A atividade de NAD desidrogenases apresentou redução de 26.41% em 5 min e de -11.76% em 30 min para WR na presença de 200 mM de $MgCl_2$ (Tabela 06). Os resultados mostraram um aumento na atividade mitocondrial nas células tratadas com WR e Ca^{2+}, de +158.82% a +220.58% para WR (Tabela. 06).

Tabela 06. Avaliação da atividade mitocondrial por redução de WST-1 a formazan em células de *Candida albicans* tratadas com WR isoladamente ou em combinação dos íons K^+, Na^+, Mg^{+2}, Ca^{+2} nos tempos indicados

AMOSTRAS	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
	%	%	%	%	%
ÁCIDO ACÉTICO	+23,53	+29,41	+29,41	+31,25	+31,25
TRITON-X 100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
WR	+261,7	+423,5	+455,8	+593,7	+634,3
CONTROLE + K^+	+2,9	+5,8	+8,8	+20,5	+35,2
WR + K^+	+500,0	+585,2	+641,1	+673,52	+700
CONTROLE + Na^+	-11,7	-11,7	-23,5	-23,5	-8,8
WR + Na^+	+185,2	+208,8	+205,8	+205,8	+226,4
CONTROLE + Mg^{+2}	-67,6	-67,6	-47,0	-44,1	-52,9
WR + Mg^{+2}	+26,4	0,0	-11,7	-5,8	-11,7
CONTROLE + Ca^{+2}	-26,4	-8,8	-17,6	-26,4	-2,9
WR + Ca^{+2}	+158,8	+220,5	+211,7	+211,7	+220,5

Controle: células da levedura cultivadas em meio está para 100%. Controle positivo: células da levedura tratada com ácido acético (AcA) a 333 mM. Controle negativo: células da levedura tratada com Triton X-100 a 2%. Os valores positivos ou negativos

indicam aumento ou diminuição da redução do WST-1 em relação ao valor de redução do controle que foi considerado como 100%. **** P < 0,0001. O ensaio é representativo de um ensaio independente de três.

Considerando que ROS são subprodutos da atividade mitocondrial, e que estudos anteriores do grupo apontaram seu papel como mediadores da atividade antifúngica dos peptídeos bioinspirados (LUCAS et al., 2024), avaliou-se a produção de ROS nas células tratadas com WR utilizando a sonda H_2DCFDA.

Os resultados revelaram um aumento dos níveis intracelulares de ROS a partir de 5 min de incubação, indicando que o peptídeo WR induz estresse oxidativo já nos primeiros momentos de interação com as células fúngicas (Fig. 25).

A suplementação com íons revelou diferentes efeitos sobre a produção de ROS. A adição de K^+, tanto em co-incubação quanto em pós-incubação, induziu a produção endógena de ROS (Fig. 25). Para o Na^+, a co-incubação com WR preveniu a produção de ROS, porém quando adicionado o cátion após 5 e 10 min induziu a produção endógena de espécies reativas (Fig. 25). O Mg^{+2} não induziu produção de ROS em nenhuma das condições testadas (Fig. 25). Por outro lado, a suplementação com Ca^{+2} levou à indução de ROS somente quando o cátion foi adicionado após incubação com o peptídeo (Fig. 25), sugerindo que esse íon não apresenta efeito protetor contra o estresse oxidativo promovido pelo WR.

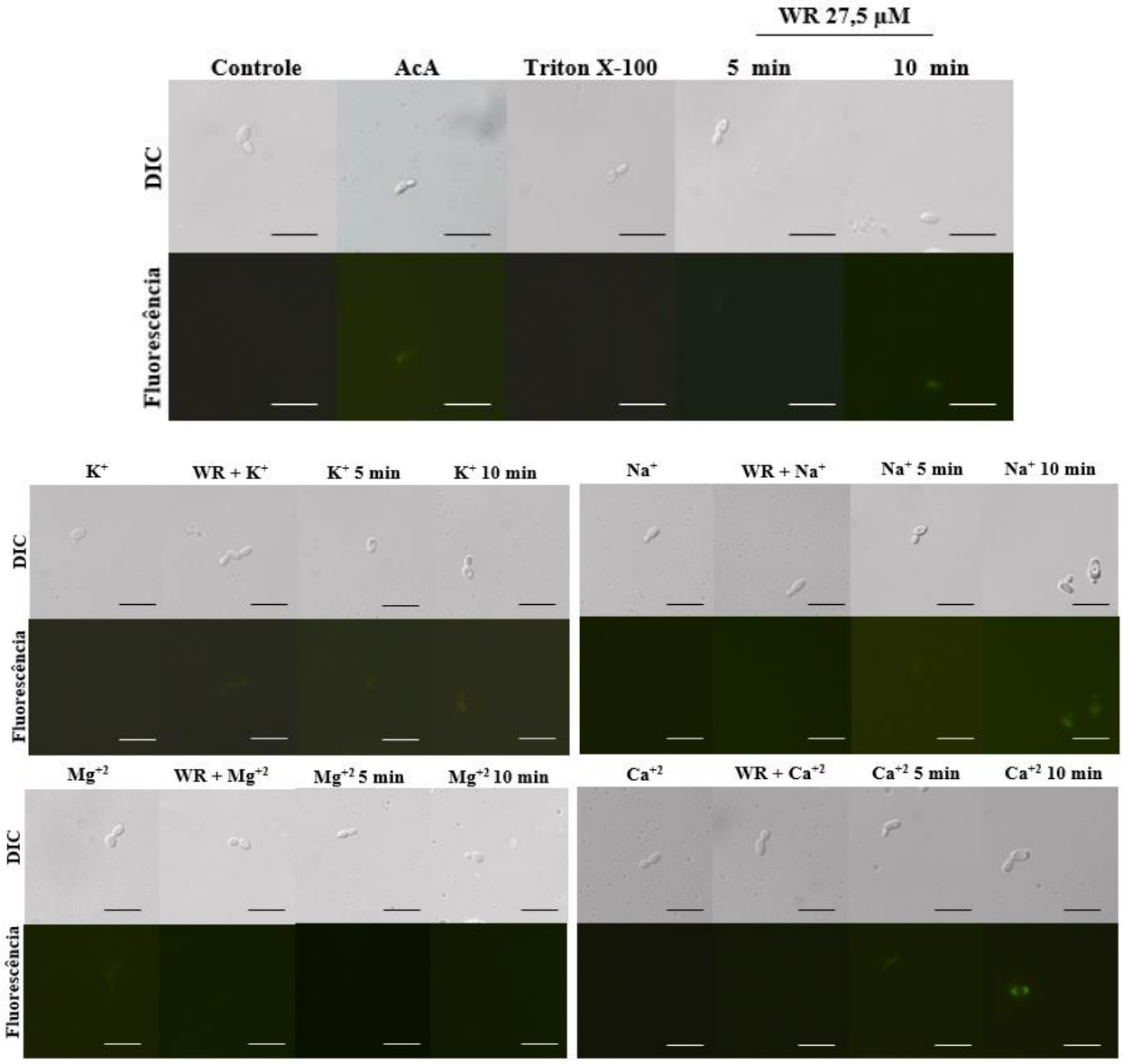


Figura 25. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em células de *Candida albicans* tratadas com WR utilizando a sonda 2',7'- diclorofluresceína diacetato por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas apenas com 20 µM da sonda por 30 min. Controle negativo: células incubadas com Triton X-100 a 2% e 20 µM da sonda por 30 min. Controle positivo: células incubadas com 333 mM de ácido acético (AcA). Controle com K^+, Na^+, Mg^{+2}, Ca^{+2}: células incubadas com 20 µM da sonda por 30 min e os diferentes íons (200 mM dos sais KCl, ou NaCl, ou $MgCl_2$, ou $CaCl_2$). WR + K^+, WR + Na^+, WR + Mg^{+2} e WR + Ca^{+2}: células de *C. albicans* foram co-incubadas com a sonda e 27,5 µM do peptídeo WR os íons indicados. K^+ 5 e 10 min, Na^+ 5 e 10 min, Mg^{+2} 5 e 10 min e Ca^{+2} 5 e 10 min: células de *C. albicans* tratadas com 27,5 µM de WR por 20 e 25 min e posteriormente incubadas com os íons indicados por 5 min e 10 min. Barras = 10 µm.

Para dar suporte a participação da hiperpolarização mitocondrial na morte induzida em *C. albicans* por WR, foi feita a viabilidade com o tempo de incubação de 0 e 30 min após a adição de WR. Este resultado mostra que WR mata 100% das células de *C. albicans* nos tempos iniciais de interação com o peptídeo (Fig. 26). Este resultado sugere que WR induz a morte das células logo após a indução da hiperpolarização mitocondrial (Fig. 20) e indução de ROS (Fig. 25).

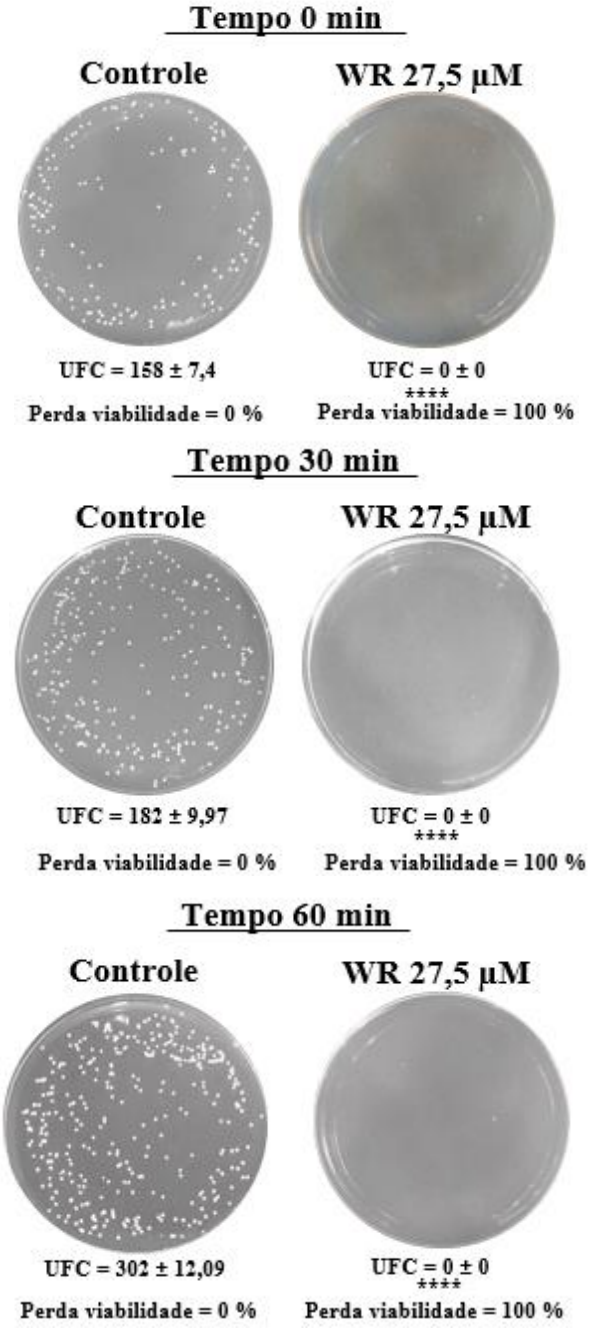


Figura 26. Avaliação da viabilidade celular de *Candida albicans* tratada com a dose letal (27,5 µM) do peptídeo WR nos tempos de 0 (apenas no tempo necessário para a montagem do experimento) e 30 min após a exposição. UFC: unidades formadoras de colônias. O controle consistiu em células submetidas ao mesmo procedimento, porém

sem adição do peptídeo. O percentual de perda de viabilidade celular foi calculado considerando UFC do controle como 100% de viabilidade. **** P < 0,0001. O ensaio é representativo de um ensaio independente de três.

4.2 Análise do envolvimento mitocondrial na morte celular induzida pelos peptídeos bioinspirados sobre fungos do gênero *Candida* por azida sódica

Para confirmar que a hiperpolarização mitocondrial, detectada em 5 min após a exposição dos peptídeos, está associada com a morte das células dos fungos, foi feito um teste com azida sódica, inibidor do complexo do citocromo c oxidase. Inicialmente para avaliar sua toxicidade em células fúngicas foram testadas diferentes concentrações de azida sódica, variando de 1 a 15 mM, a fim de determinar a maior concentração capaz de apresentar toxicidade mínima em *C. tropicalis* e *C. albicans*. Entre as concentrações avaliadas, 1 mM demonstrou a menor toxicidade, enquanto concentrações superiores resultaram em uma redução progressiva da viabilidade das células das leveduras testadas (Fig. 27). Sendo que a concentração de 1 mM preserva aproximadamente 60% da densidade celular inicial em *C. tropicalis* e 57,38 % em *C. albicans* (Fig. 29).

Dentro da janela temporal previamente determinada de 5 e 10 min do início da hiperpolarização mitocondrial após a exposição dos peptídeos bioinspirados RR, D-RR e WR, investigamos se a azida sódica tinha efeito protetor sendo então capaz de atenuar a morte celular induzida pelos peptídeos. Os ensaios demonstraram que a capacidade protetora da azida sódica é fortemente dependente do tempo de adição. Em *C. tropicalis*, quando a azida foi adicionada 5 min após a exposição ao peptídeo RR, observou-se uma preservação de 86,18% da viabilidade (Fig. 27), a proteção cai para 72,27% com a adição da azida sódica ocorre após 10 min da adição do RR (Fig. 27), comparado com as células tradadas com RR apenas, que causa 100% de perda de viabilidade. De modo semelhante, para o peptídeo D-RR, a proteção da morte foi de 58,8e 57% para os mesmos intervalos de tempo (Fig. 28).

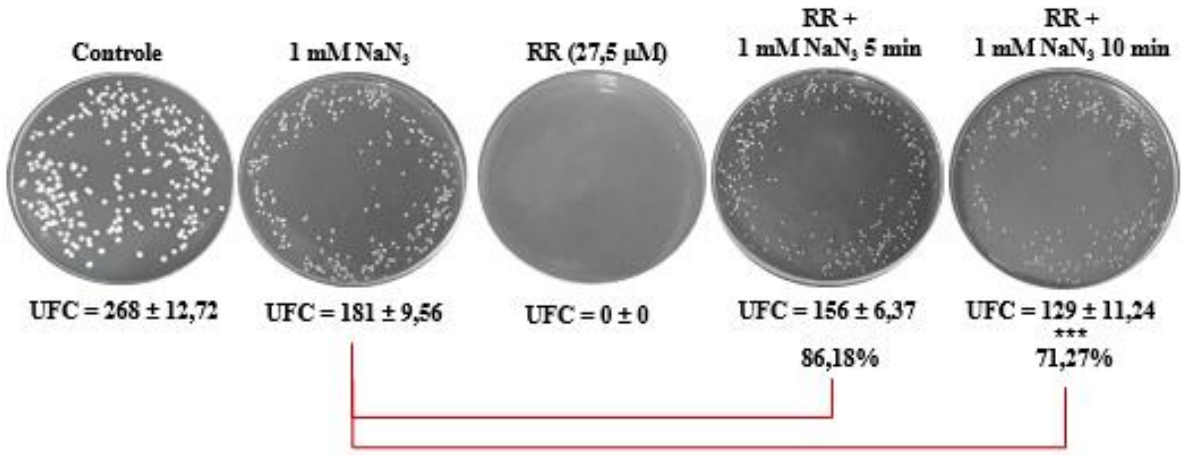


Figura 27. Ensaio de viabilidade celular com células de *Candida tropicalis* na presença de azida sódica em diferentes tempos após o tratamento com RR. No controle, as células foram incubadas com meio. Para controle positivo, células foram incubadas com 1 mM azida sódica. Para o teste, as células foram incubadas com 27,5 µM RR e a azida sódica foi pós-incubada com 5 e 10 min após a adição do RR. UFC: unidades formadoras de colônias. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos considerando que o controle representa 100% de viabilidade celular. **** P < 0,0001. O ensaio é representativo de um ensaio independente de três.

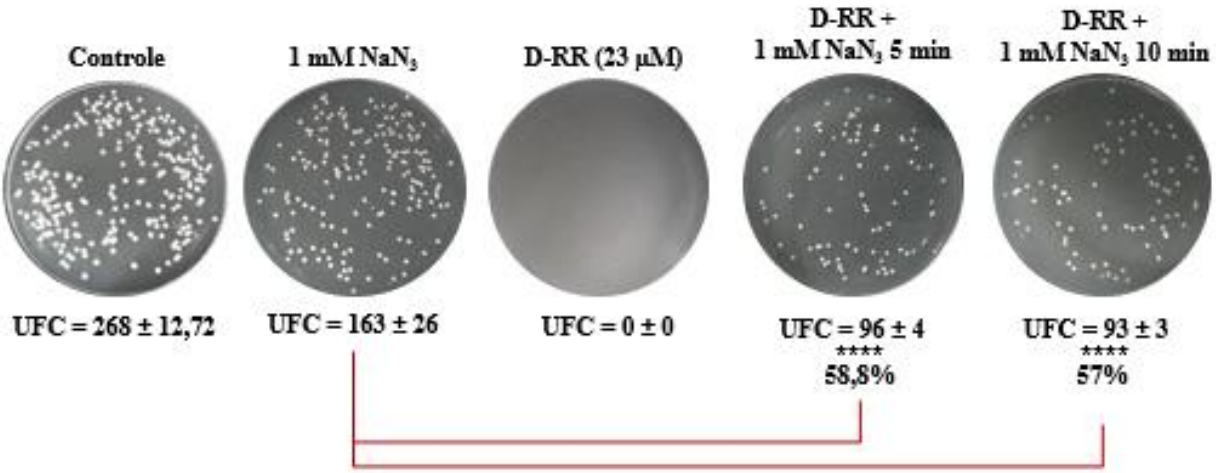


Figura 28. Ensaio de viabilidade celular com células de *Candida tropicalis* na presença de azida sódica em diferentes tempos após o tratamento com D-RR. No controle, as células foram incubadas com meio. Para controle positivo, células foram incubadas com 1 mM azida sódica. Para o teste, as células foram incubadas com 23 µM D-RR e a azida sódica foi pós-incubada com 5 e 10 min após a adição do D-RR. UFC: unidades formadoras de colônias. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos considerando que o controle representa 100% de viabilidade celular. **** P < 0,0001. O ensaio é representativo de um ensaio independente de três.

Em *C. albicans*, a análise do peptídeo WR revelou um padrão semelhante de perda progressiva do efeito protetor da morte induzida pela azida sódica. Quando o inibidor foi adicionado 5 min após a exposição ao peptídeo, observou-se uma preservação parcial da viabilidade celular, com preservação de 39,56% de células viáveis em relação ao as células tratadas com o peptídeo que causa 100% de perda de viabilidade. No entanto, quando a adição da azida sódica foi postergada para 10 min, essa proteção desapareceu completamente, resultando em 0% de preservação da viabilidade (Fig. 29).

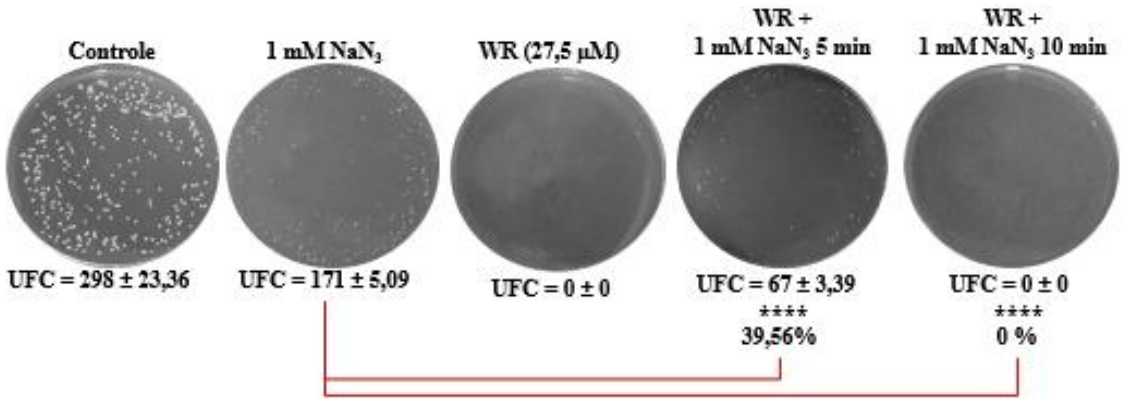


Figura 29. Ensaio de viabilidade celular com células de *Candida albicans* na presença de azida sódica em diferentes tempos após o tratamento com WR. No controle, as células foram incubadas com meio. Para controle positivo, células foram incubadas com 1 mM azida sódica. Para o teste, as células foram incubadas com 27,5 µM WR e a azida sódica foi pós-incubada com 5 e 10 min após a adição do WR. UFC: unidades formadoras de colônias. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos considerando que o controle representa 100% de viabilidade celular. **** $P < 0,0001$. O ensaio é representativo de um ensaio independente de três.

Para confirmarmos que o tratamento com 1 mM de azida sódica inibe a função mitocondrial foi feita a avaliação do potencial de membrana mitocondrial com a sonda fluorescente JC-1. Demonstrou-se que o tratamento com 1 mM azida sódica em ambas as espécies analisadas, *C. tropicalis* e *C. albicans*, perdem a marcação das mitocôndrias quando comparado com o controle, evidenciando que a concentração de 1 mM de NaN_3 bloqueia de maneira eficaz o acúmulo de potencial elétrico na membrana interna mitocondrial (Fig. 30)

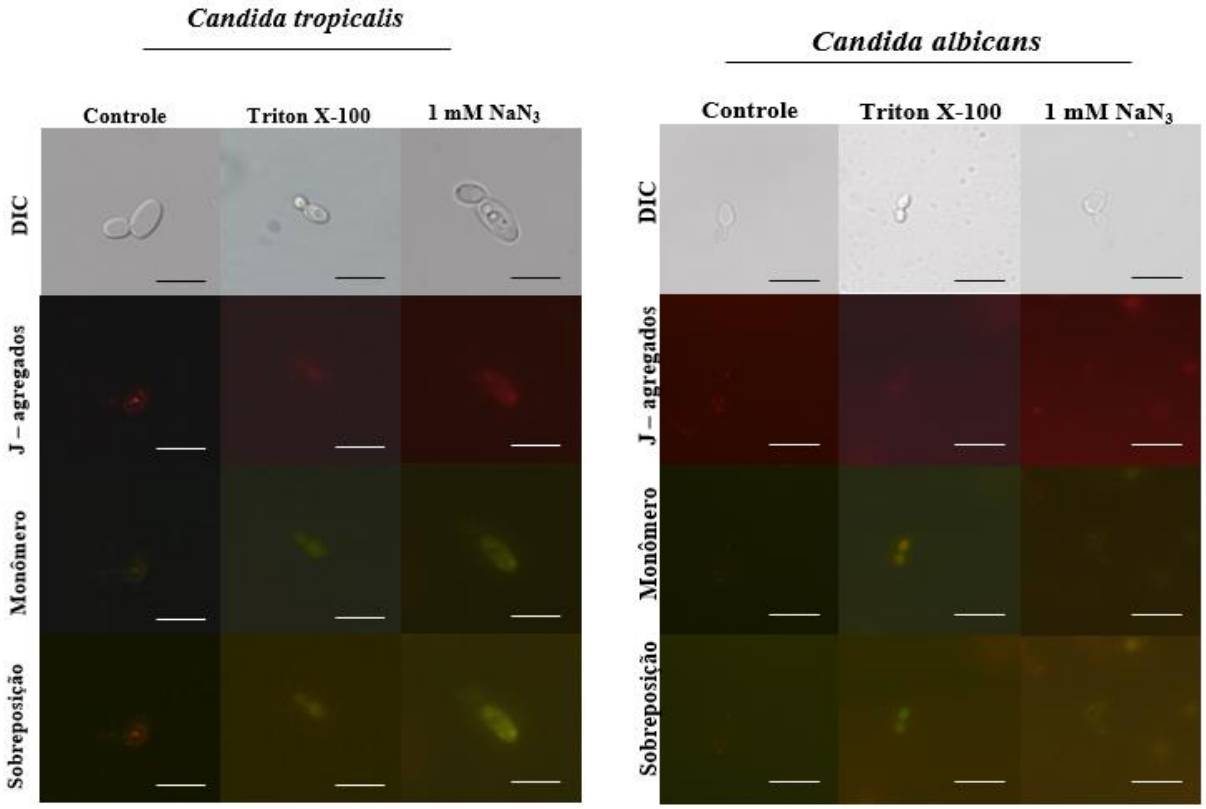


Figura 30. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Δψm) em células de *Candida tropicalis* e *Candida albicans* utilizando a sonda JC-1 por microscopia de fluorescência. Controle: células incubadas com 20 µM da sonda por 50 min. Controle negativo: células incubadas com Triton X-100 a 2% e 20 µM da sonda JC-1 por 50 min. No teste, células tratadas com 1 mM de azida sódica por 10 min adicionado após 40 min da adição da sonda JC-1. A fluorescência vermelha (J-agregados) indica mitocôndrias polarizadas (Δψm alto), enquanto a fluorescência verde (monômeros) indica mitocôndrias despolarizadas (Δψm baixo). A sobreposição mostra a combinação dos sinais vermelho e verde. Barras de escala = 10 µm.

De forma interessante, a análise da atividade metabólica mitocondrial revelou que células tratadas com 1 mM de azida sódica apresentaram um aumento significativo na atividade das NADH desidrogenases durante o período de incubação com a sonda. Em *C. tropicalis*, a atividade enzimática elevou-se entre aproximadamente +150% e +217,2%, no intervalo de 5 a 30 min (Fig. 31).

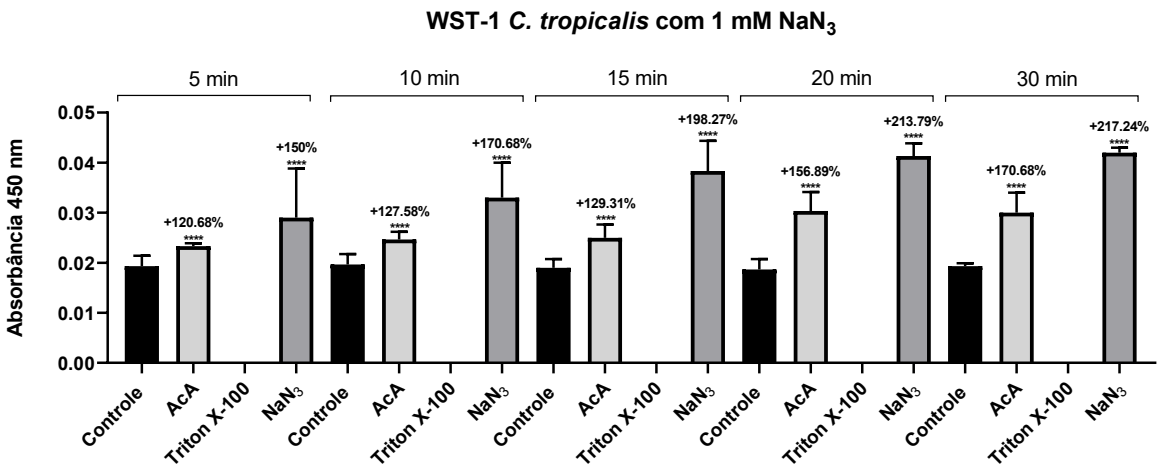


Figura 31. Determinação da atividade metabólica mitocondrial utilizando WST-1 na presença de azida sódica (NaN_3). Os valores acima das barras de teste indicam a atividade mitocondrial em comparação com o controle para cada tempo estudado. Os controles correspondem a células de levedura cultivadas em meio, enquanto o controle positivo corresponde ao tratamento Triton X-100. **** P < 0,0001; O ensaio é representativo de um ensaio independente de três.

Enquanto em *C. albicans* o incremento variou de +269,4% a +313,9% no intervalo de 5 a 30 min (Fig. 32).

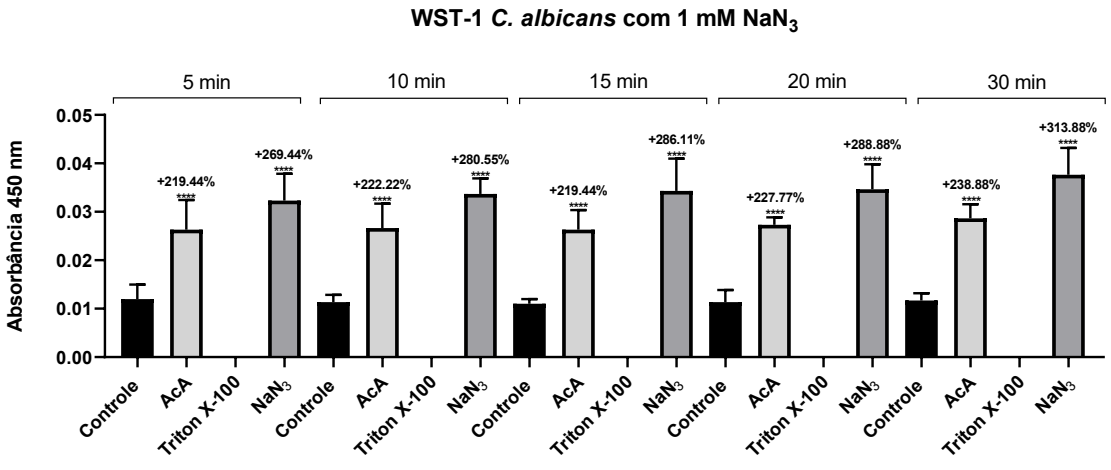


Figura 32. Determinação da atividade metabólica mitocondrial utilizando WST-1 na presença de azida sódica (NaN_3). Os valores acima das barras de teste indicam a atividade mitocondrial em comparação com o controle para cada tempo estudado. Os controles correspondem a células de levedura cultivadas em meio, enquanto o controle positivo corresponde ao tratamento Triton X-100. **** P < 0,0001; O ensaio é representativo de um ensaio independente de três.

5. DISCUSSÃO

5.1 Análise do envolvimento mitocondrial na morte celular induzida pelos peptídeos bioinspirados RR, D-RR e WR sobre fungos do gênero *Candida*

As mitocôndrias têm papel preponderante na manutenção da viabilidade celular integrando múltiplas vias de morte celular (JAARA et al., 2024; XU; PANG; FAN, 2025; RISSO et al., 2002). No presente estudo, o foco principal foi aprofundar a compreensão sobre o envolvimento mitocondrial no processo de RCD induzida pelos peptídeos, bem como investigar o papel modulador dos íons K^+, Na^+, Mg^{+2} e Ca^{+2}, além da azida sódica o sobre este processo desencadeado pelos peptídeos. Nos estudos anteriores do grupo, a pesquisa concentrou-se na elucidação do mecanismo de ação dos peptídeos bioinspirados em fungos patogênicos. Naqueles trabalhos demonstraram que RR, D-RR e WR induzem redução do volume celular, aumento de ROS, vacuolização citoplasmática e hiperpolarização da membrana mitocondrial, indicando que os fungos tratados com os peptídeos sofrem RCD. Estes efeitos, incluindo a morte, podem ser revertidos incubando os fungos com o antioxidante ácido ascórbico e pela suplementação do meio com o íon K^+ (DAMICA et al., 2025). Adicionalmente, Lucas et al. (2024) avaliaram a funcionalidade mitocondrial em células tratadas com os peptídeos utilizando a sonda Mitotracker Red FM, a qual revelou que, o Δψm permanece ativo com um padrão de fluorescência mais intenso e difuso quando comparado ao controle. Além disso, o tratamento concomitante com ácido ascórbico, restaurou parcialmente a funcionalidade mitocondrial, sugerindo o envolvimento de estresse oxidativo na disfunção observada. Os dados obtidos com a sonda JC-1, no presente estudo, corroboram os resultados anteriores do grupo, uma vez que, já a partir de 5 min de incubação com os peptídeos, observou-se deslocamento da razão de fluorescência da sonda para o vermelho, que se intensificou aos 10 min, confirmando a ocorrência de hiperpolarização do Δψm já nos tempos iniciais após a interação dos peptídeos com os fungos (Figs. 06, 13 e 20).

Complementarmente, Lucas et al. (2024) deram suporte ao aumento do Δψm por meio do ensaio com o sal de tetrazólio WST-1, o qual indicou aumento expressivo na atividade das NADH desidrogenases mitocondriais, alcançando incrementos de 305,2% e 565,1% em *C. tropicalis* tratadas com RR e D-RR, respectivamente, dentro de 1 h de incubação. Essa elevação da atividade metabólica foi mantida até o tempo de morte determinado para cada peptídeo. No caso de *C. albicans* tratada com WR, observou-se um aumento inicial de 835,38% em 20 min, seguido de aumento de 18% no tempo de

morte. De maneira consistente, os experimentos realizados no presente trabalho confirmaram esse comportamento, demonstrando um aumento progressivo e sustentado da atividade mitocondrial ao longo de intervalos de 5 a 30 min no ensaio com WST-1. Os incrementos observados foram de +78,67% e +317,74% para RR e D-RR, respectivamente, em *C. tropicalis* (Tabelas 04 e 05), e de +634,38% para *C. albicans* tratadas com WR até 30 min de exposição (Tabela 06). Esses resultados reforçam a hipótese de que os peptídeos bioinspirados interferem diretamente no metabolismo mitocondrial, induzindo disfunção funcional e energética nas células fúngicas.

O Δψm em células de mamíferos é determinado pelo gradiente eletroquímico de prótons gerado ao longo da CTE e é indispensável para a fosforilação oxidativa e a síntese de ATP. Alterações nesse potencial — tanto a despolarização quanto a hiperpolarização — comprometem a eficiência bioenergética, afetam a dinâmica mitocondrial e podem atuar como sinais iniciais de estresse celular, modulando vias pró-apoptóticas ou pró-necróticas. A despolarização reduz diretamente a capacidade de geração de ATP, enquanto a hiperpolarização prolongada favorece o aumento da produção de ROS, podendo levar à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e, consequentemente, à morte celular. Assim, oscilações no Δψm constituem um marcador sensível da homeostase mitocondrial e um ponto de convergência entre estresse metabólico e mecanismos de morte celular (ZOROVA et al., 2017; MURPHY, 2009; TURRENS, 2003). A hiperpolarização mitocondrial, observada após a exposição aos peptídeos bioinspirados, apresenta ser um marcador precoce de disfunção mitocondrial. O aumento anormal do ΔΨm promove o acúmulo de elétrons nos complexos I e III da CTE, favorecendo o vazamento de elétrons para o oxigênio molecular e a consequente formação de ROS, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (TURRENS, 2003; ADAM-VIZI; CHINOPOULOS, 2006). O excesso dessas espécies oxidantes causa danos a lipídios, proteínas e DNA mitocondrial, comprometendo a homeostase celular e ativando cascatas apoptóticas dependentes de mitocôndria (ZOROV et al., 2013; BOR-CHYUAN et al., 2021).

Em células de mamíferos a hiperpolarização mitocondrial está diretamente associada à indução de RCD, representando um evento inicial que sinaliza disfunções metabólicas e estruturais irreversíveis. Esse aumento anormal do Δψm decorre do acúmulo excessivo de prótons (H^+) no espaço intermembranar, o que sobrecarrega a CTE e compromete o equilíbrio bioenergético. Quando persistente, a hiperpolarização provoca o desacoplamento da fosforilação oxidativa, reduzindo a síntese de ATP e levando à falha energética celular (XU; PANG; FAN, 2025). Concomitantemente, o

acúmulo de elétrons na CTE intensifica a geração de ROS, resultando em estresse oxidativo e danos a proteínas, lipídios e ao DNA mitocondrial de mamíferos. A sobrecarga oxidativa e a deficiência de energia promovem a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP, do Inglês *mitochondria outer membrane permeabilization*), permitindo o extravasamento de proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo c, para o citoplasma (MORI et al., 2025). A liberação do citocromo c desencadeia a formação do complexo apoptossoma e ativa a cascata de caspases, culminando na degradação controlada de componentes celulares e na fragmentação do DNA, etapas características da apoptose. Assim, a hiperpolarização mitocondrial não é apenas um marcador de estresse, mas um evento determinante na ativação da via intrínseca de morte celular dependente da mitocôndria (XU; PANG; FAN, 2025).

Zorova et al. (2017) também destacam que em mitocôndrias de mamíferos foi visto que variações prolongadas no Δψm, sejam de hiperpolarização ou despolarização, podem desencadear disfunção mitocondrial irreversível, queda acentuada dos níveis de ATP e acidose intracelular, devido à desregulação entre a oferta e a demanda energética e à depleção dos sistemas tampão intracelulares, comprometendo assim a homeostase e a sobrevivência celular.

No presente estudo, observamos que as células fúngicas tratadas com os peptídeos bioinspirados apresentaram sinais de fluorescência positivos para a sonda H_2DCFDA, para detecção de ROS, já nos primeiros 5 min de exposição, com intensificação significativa após 10 min, indicando um rápido aumento na produção intracelular de ROS (Figs. 11, 19 e 26). Esse resultado sugere que a disfunção mitocondrial induzida pelos peptídeos está diretamente associada à geração exacerbada de espécies oxidantes.

A produção de ROS mitocondrial pode desencadear uma série de eventos deletérios, incluindo danos oxidativos a proteínas, lipídios de membrana e DNA mitocondrial. Tais danos comprometem a síntese de ATP e outras funções metabólicas essenciais, levando à instabilidade estrutural da mitocôndria e favorecendo a MOMP. Esse processo resulta na liberação de proteínas do espaço intermembranar, como o citocromo c, para o citosol, ativando a cascata apoptótica (MURPHY, 2009). Fedoseeva et al. (2017), ao investigarem os efeitos do choque térmico na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, demonstraram que a produção ROS e a hiperpolarização mitocondrial são fenômenos interdependentes e diretamente associados à atividade respiratória mitocondrial sob condições de choque térmico. A utilização do antioxidante ácido ascórbico reduziu significativamente tanto o acúmulo de ROS quanto o aumento do

Δψm, evidenciando que o acúmulo oxidativo e a desregulação bioenergética compartilham uma base mitocôndria-dependente. De forma complementar, Choi et al. (2009) em um estudo com modelo murino em células neurais, correlacionaram o aumento excessivo de ROS intracelular com o dano estrutural e funcional das mitocôndrias, sugerindo que o estresse oxidativo persistente é um evento característico de mitocôndrias comprometidas. Esse padrão também foi observado no presente estudo, em que os peptídeos bioinspirados induziram hiperpolarização da membrana mitocondrial acompanhada de produção aumentada de ROS, configurando um ciclo de retroalimentação entre o acúmulo de elétrons na cadeia respiratória e a formação de espécies oxidantes.

Esses achados são consistentes com os resultados obtidos por Bor-Chyuan et al. (2021) no estudo com piscidina 4 (TP4), um peptídeo antimicrobiano isolado do *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) nesse modelo, o TP4 induziu hiperpolarização mitocondrial e produção excessiva de ROS em células de sarcoma sinovial humano, além de reduzir os níveis da proteína desacopladora UCP-2, envolvida na regulação da produção de ATP e na atenuação da formação de ROS. Essa redução da UCP-2 levou à perda do mecanismo de “desacoplamento protetor”, amplificando a toxicidade oxidativa mitocondrial, os fenômenos da hiperpolarização da membrana mitocondrial e geração de ROS guardam paralelos com os efeitos observados neste trabalho para os peptídeos RR, D-RR e WR (Figs. 06, 13 e 20).

Em mitocôndrias isoladas de mamíferos, dois modos principais de operação estão associados à produção significativa de superóxido, predominantemente pelo complexo I da CTE: (i) quando as mitocôndrias não estão sintetizando ATP, apresentando alta força próton-motriz (ΔpH) e *pool* reduzido de coenzima Q (CoQ); (ii) quando há uma alta razão $NADH/NAD^+$ na matriz mitocondrial (SINO et al., 2007).

Por outro lado, em condições nas quais as mitocôndrias estão ativamente produzindo ATP, observa-se redução nas razões ΔpH e $NADH/NAD^+$, o que resulta em menor produção de superóxido. Assim, a geração de $O_2\bullet^-$ é fortemente dependente da intensidade do ΔpH, das razões $NADH/NAD^+$ e $CoQH_2/CoQ$, bem como da disponibilidade de O_2, todos fatores altamente variáveis e sensíveis a condições de estresse celular (SMITH E ROBINSON, 2016; SINO et al., 2007).

Esses mecanismos ajudam a explicar os resultados observados no presente trabalho, em que a exposição aos peptídeos bioinspirados promoveu hiperpolarização mitocondrial, e consequente elevação dos níveis de ROS já nos primeiros minutos de interação com as células fúngicas.

Damica et al. (2025) demonstraram que o encolhimento celular observado em fungos tratados com peptídeos bioinspirados está diretamente associado ao extravasamento de íons intracelulares, especialmente K^+. Esse cátion, o mais abundante no meio intracelular, é fundamental para a manutenção do volume, da morfologia e da integridade celular. A perda de K^+ é um evento clássico da apoptose em células eucarióticas, incluindo fungos, e ocorre tanto por danos à membrana plasmática quanto pela ativação de vias de morte celular programada (BORTNER; CIDLOWSKI, 2014). Damica et al. (2025) mostraram ainda que a suplementação exógena de K^+ foi capaz de restaurar o equilíbrio iônico intracelular e bloquear a ativação dos sinais moleculares associados à morte celular, evidenciando um papel protetor desse íon frente aos danos induzidos pelos peptídeos bioinspirados.

Com base nesses achados, o presente estudo investigou o papel modulador de diferentes íons inorgânicos (K^+, Na^+, Mg^{+2} e Ca^{+2}) na prevenção da morte celular regulada induzida pelos peptídeos bioinspirados RR, D-RR e WR, bem como seus efeitos sobre parâmetros mitocondriais, incluindo potencial de membrana mitocondrial, produção de ROS e atividade de NADH desidrogenases.

Nas células tratadas com o peptídeo RR, o K^+ bloqueou completamente a hiperpolarização mitocondrial e impediu o aumento da produção de ROS, embora tenha promovido um incremento gradual na atividade metabólica mitocondrial, sugerindo um ajuste bioenergético compensatório (Figs. 07, 11 e Tabela 04). O Na^+ também preveniu a hiperpolarização, mas promoveu indução endógena de ROS e redução na atividade das NADH desidrogenases (Fig. 08, 11 e Tabela 04), efeito semelhante ao observado com o Ca^{+2} (Fig. 10, 11 e Tabela 04). Por outro lado, o Mg^{+2} preveniu a hiperpolarização mitocondrial e a indução de ROS, mas reduziu significativamente o metabolismo mitocondrial, indicando uma possível inibição funcional da cadeia respiratória (Fig. 09, 11 e Tabela 04).

No caso do peptídeo D-RR (forma D-enantiômera de RR), os resultados foram distintos. Tanto o K^+ quanto o Na^+ protegeram as células contra a hiperpolarização mitocondrial e a produção de ROS, acompanhados por redução da atividade das NADH desidrogenases (Figs. 14, 15, 18 e Tabela 05). O Mg^{+2} apresentou comportamento semelhante, exceto pela indução de ROS após 10 min de interação com o peptídeo (Fig. 16 e 18). Já o Ca^{+2} promoveu proteção contra a hiperpolarização, mas foi associado a um aumento expressivo de ROS e à diminuição do metabolismo mitocondrial (Fig. 17, 18 e Tabela 05), evidenciando que esse íon pode exercer um papel ambíguo, atuando tanto como protetor estrutural quanto como indutor de estresse oxidativo.

Nas células de *C. albicans* tratadas com o peptídeo WR, os íons K^+ e Na^+ apresentaram efeitos similares, bloqueando a hiperpolarização mitocondrial, mas com indução de ROS após 10 min de interação (Figs. 21, 22, 25 e Tabela 06). Ambos, contudo, promoveram um expressivo aumento da atividade mitocondrial, possivelmente como resposta adaptativa ao estresse oxidativo. O Mg^{+2} manteve o mesmo padrão observado para RR e D-RR, prevenindo tanto a hiperpolarização quanto a produção de ROS, embora reduzisse o metabolismo mitocondrial (Figs. 23, 25 e Tabela 06). Já o Ca^{+2}, apesar de bloquear a hiperpolarização mitocondrial, foi associado a indução significativa de ROS e aumento acentuado da atividade das NADH desidrogenases (Figs. 24, 25 e Tabela 06), sugerindo uma ativação metabólica compensatória associada ao aumento do acoplamento energético.

No estudo de Iwai et al. (2002) observaram que a incubação de mitocôndrias de células de mamíferos, com diferentes concentrações de cloreto de sódio ou lactato de sódio *in vitro* resultou em despolarização do potencial de membrana mitocondrial e redução da capacidade de geração de ATP, indicando uma interferência direta do Na^+ na bioenergética mitocondrial. Estudos recentes demonstram em células de mamíferos, especialmente cardiomiócitos, que o íon Na^+ desempenha papel relevante na manutenção do potencial de membrana mitocondrial, sendo responsável por aproximadamente 30% a 50% do gradiente eletroquímico sob determinadas condições fisiológicas. Essa regulação é mediada principalmente pela troca sódio-próton (Na^+/H^+) associada ao complexo I, mecanismo essencial para preservar a estabilidade do gradiente de carga necessário à síntese de ATP. No entanto, o acúmulo excessivo de Na^+ intracelular exerce efeito deletério sobre a função mitocondrial em fagócitos mononucleares, promovendo a despolarização da membrana, a redução na produção de ATP e o aumento do estresse oxidativo. Esses eventos refletem um desequilíbrio iônico que compromete a integridade mitocondrial e pode contribuir para a ativação de vias de morte celular dependentes de disfunção bioenergética (GEISBERGER et al., 2021).

Liu et al. (2019) demonstraram, em nível celular, que o Mg^{+2} exerce um papel fundamental na restauração da função mitocondrial, promovendo o aumento da produção de ATP, a redução de ROS mitocondriais, a diminuição da sobrecarga de Ca^{+2} e a repolarização do potencial de membrana mitocondrial em células de mamíferos com disfunção diastólica cardíaca. Esses resultados indicam que o Mg^{+2} atua como um modulador essencial da homeostase mitocondrial, favorecendo o equilíbrio bioenergético e reduzindo o estresse oxidativo. De acordo com Cazzola et al. (2024),

essa ação protetora está relacionada principalmente à capacidade do Mg^{+2} de preservar a integridade funcional da mitocôndria, reforçar os sistemas antioxidantes celulares e atuar como antagonista fisiológico do Ca^{+2}, prevenindo assim a disfunção mitocondrial induzida por sobrecarga iônica.

Esses resultados dialogam com o estudo de Yun e Lee (2016), que demonstrou que a cecropina A, um peptídeo antimicrobiano isolado da mariposa *Hyalophora cecropia*, promove movimentos iônicos desregulados, incluindo acúmulo intracelular de Ca^{+2} e efluxo de K^{+}, levando ao desequilíbrio iônico e à indução de apoptose em *C. albicans*.

De forma complementar, Perez-Vazquez, Saavedra-Molina e Uribe (2003) mostraram que a adição exógena de Ca^{+2} a mitocôndrias de leveduras estimula de duas a três vezes a oxidação de NADH externo, indicando aumento do acoplamento energético. Esse efeito foi atribuído à regulação diferencial do poro de permeabilidade mitocondrial (PTP), uma vez que, em leveduras, o poro não específico da membrana mitocondrial interna é inibido pelo Ca^{+2} extramitocondrial, diferentemente do observado em mitocôndrias de mamíferos.

Outra diferença importante entre os dois modelos é que, enquanto as mitocôndrias de células de mamíferos mantêm-se constantemente ativas na produção de energia, as leveduras glicolíticas apresentam baixa respiração mitocondrial durante o crescimento em condições de alta disponibilidade de glicose. Nessas circunstâncias, a glicólise é a principal via de obtenção de energia, e a respiração oxidativa é utilizada principalmente em funções não energéticas, como a remoção de subprodutos metabólicos e o controle do pH intracelular (ADAM-VIZI E CHINOPOULOS, 2006).

Contudo, quando um programa de morte celular regulada é ativado, as mitocôndrias de levedura tornam-se rigidamente acopladas, e sua capacidade máxima de transporte de elétrons é intensificada, resultando em uma alta taxa de produção de ROS na região intermediária da cadeia respiratória (ciclo Q). Esse comportamento reforça a hipótese de que, em leveduras, a ativação mitocondrial durante a morte celular está intimamente associada à geração de ROS e à modulação iônica, eventos também observados no presente trabalho (SINO et al., 2007).

De modo geral, os resultados obtidos neste estudo reforçam a hipótese de que a mitocôndria atua como um alvo funcional e regulador do processo de morte celular induzido pelos peptídeos bioinspirados, sendo sua resposta modulada de forma significativa pelo microambiente iônico. A presença de cátions monovalentes e divalentes mostrou-se determinante na manutenção ou desestabilização do $\Delta\psi m$,

influenciando diretamente a produção de ROS e a atividade metabólica dependente de NADH. Em particular, o K^+ demonstrou um papel citoprotetor consistente, associado ao bloqueio da hiperpolarização mitocondrial e à preservação da homeostase redox (Figs. 07, 14 e 21), enquanto o Ca^{+2} e o Na^+ apresentaram efeitos bifásicos, atuando ora como protetores, ora como potencializadores do estresse oxidativo, dependendo do peptídeo e do tempo de exposição (Figs. 08, 10, 11, 15, 17, 18, 22 e 24,). O Mg^{+2}, por sua vez, emergiu como um modulador negativo do metabolismo mitocondrial, atenuando tanto a atividade enzimática quanto a geração de ROS, sugerindo uma função regulatória na contenção de respostas mitocondriais exacerbadas (Fig. 09, 11, 16, 18, 23, 25 e Tabelas 04, 05 e 06).

Esses achados indicam que a modulação da morte celular por peptídeos bioinspirados não é um evento unidimensional, mas sim um processo multifatorial, no qual os fluxos iônicos e o estado bioenergético da mitocôndria determinam o limiar entre sobrevivência e morte. Assim, a interação entre peptídeos catiônicos e íons intracelulares pode ser interpretada como um mecanismo dinâmico de ajuste fisiológico, no qual a mitocôndria integra sinais eletroquímicos, metabólicos e redox para decidir o destino celular. Em conjunto, os resultados contribuem para uma compreensão mais aprofundada da morte celular regulada em leveduras, oferecendo novas perspectivas sobre os papéis bioenergéticos e estruturais dos íons na sinalização mitocondrial e na ação seletiva de peptídeos antimicrobianos bioinspirados.

5.2 Inibição do complexo IV pela azida sódica e sua influência sobre os efeitos mitocondriais induzidos pelos peptídeos bioinspirados

A mitocôndria desempenha um papel central tanto na geração de energia quanto na regulação dos processos de morte celular, além de ser a principal fonte intracelular de ROS. Sua função bioenergética depende da CTE, formada pelos complexos I (NADH-ubiquinona oxidorredutase), III (ubiquinona–citocromo c oxidorredutase) e IV (citocromo c oxidase), que realizam a transferência sequencial de elétrons e o bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna, estabelecendo o potencial de membrana necessário para a síntese de ATP. O Complexo II (succinato-desidrogenase), embora não bombeie prótons, contribui para a CTE ao transferir elétrons para a ubiquinona, integrando o metabolismo energético mitocondrial (BLASCO; CHAPUIS; GIORDANI, 1981; HARVEY; HARDY; ASHFORD, 1999).

No presente estudo, foi utilizada a azida sódica, um inibidor clássico da citocromo c oxidase (Complexo IV) da CTE mitocondrial. A ação da azida sódica bloqueia a

transferência final de elétrons ao oxigênio molecular, interrompendo a fosforilação oxidativa e, consequentemente, a produção de ATP, levando à supressão imediata da respiração mitocondrial (TSUBAKI e YOSHIKAWA, 1993). O objetivo foi avaliar tanto a toxicidade intrínseca do composto sobre células fúngicas quanto seu potencial efeito protetor frente à morte celular induzida pelos peptídeos bioinspirados.

Os resultados demonstraram que a concentração de 1 mM de azida sódica diminuiu a intensidade do vermelho da sonda JC-1 assim como o tratamento com Triton-X 100 em *C. albicans* e *C. Tropicalis* (Fig. 30), mas promoveu um incremento gradual e significativo na atividade metabólica mitocondrial, conforme evidenciado pelos ensaios de desidrogenases dependentes de NADH (Figs. 31 e 32). Nos ensaios de viabilidade celular, em que a azida sódica foi incubada após a exposição aos peptídeos, e observou-se que, em *C. tropicalis*, a proteção conferida pelo inibidor decaiu progressivamente com o aumento do tempo de incubação com RR e D-RR (Figs. 27 e 28). Em contraste, em *C. albicans*, a proteção foi observada apenas quando a azida sódica foi adicionada 5 min após a exposição ao peptídeo WR (Fig. 29), em tempos posteriores, a proteção decai. Esses achados indicam que a inibição do complexo IV é mais eficaz quando ocorre nos estágios iniciais da interação peptídeo-célula, sugerindo que eventos mitocondriais críticos são rapidamente estabelecidos após o contato com os peptídeos bioinspirados.

Embora reconhecida principalmente como um inibidor clássico do citocromo c oxidase (Complexo IV), a azida sódica também inibe de forma eficiente a catalase, enzima essencial para a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. A inibição da catalase compromete a detoxificação do H_2O_2, favorecendo seu acúmulo intracelular e, consequentemente, o aumento de ROS. Esse H_2O_2 acumulado pode alimentar reações em cadeia que geram radicais altamente reativos, amplificando o dano oxidativo a lipídios, proteínas e DNA (GARG; POORNIMA; RAJYAGURU, 2020).

A produção de ROS em fungos está intimamente associada ao metabolismo mitocondrial, especialmente à atividade das NADH-desidrogenases da cadeia respiratória. Em *Saccharomyces cerevisiae* e outros fungos, o acúmulo de NADH e a hiper-redução dos complexos I e III favorecem o escape de elétrons para o oxigênio, gerando superóxido e desencadeando respostas de estresse oxidativo (JEŽEK; HLAVATA, 2009). As NADH-desidrogenases alternativas (NDH2), amplamente distribuídas em fungos, modulam esse processo ao permitir a oxidação de NADH sem bombeamento de prótons, reduzindo a pressão redutora sobre a cadeia respiratória, embora também possam contribuir para ROS sob condições de sobrecarga metabólica

(O'DONNELL; HARVEY; MCNEIL, 2011). O excesso de ROS resultante da disfunção respiratória desempenha papel central na ativação de vias de morte celular programada em fungos, incluindo perda do potencial de membrana mitocondrial, liberação de citocromo c e ativação de mecanismos análogos à apoptose (PERRONE; TAN; DAWES, 2008; POZNIAKOVSKY et al., 2005).

O efeito protetor transitório observado para a azida sódica reforça que a janela temporal de exposição é determinante para a prevenção da morte celular. Isso indica que eventos mitocondriais muito precoces — como a modulação do potencial de membrana e o acúmulo inicial de ROS — constituem etapas críticas no desencadeamento da morte celular regulada induzida pelos peptídeos RR, D-RR em *C. tropicalis* e WR em *C. albicans*.

Quanto ao metabolismo mitocondrial elevado, quanto maior a atividade das NAD-desidrogenases intensifica o fluxo de elétrons para a cadeia respiratória, promovendo hiper-redução dos complexos I e III. Esse estado favorece o vazamento eletrônico e, portanto, a produção de ROS. Assim, a intensificação da oxidação de NADH está diretamente associada ao aumento do estresse oxidativo mitocondrial, sobretudo sob condições de hiperpolarização do potencial de membrana e saturação funcional da cadeia transportadora de elétrons. Esse conjunto de evidências reforça que a disfunção mitocondrial inicial e o desequilíbrio redox constituem pontos de inflexão decisivos na progressão para morte celular regulada nos fungos expostos aos peptídeos bioinspirados.

6. CONCLUSÃO

Compreender o envolvimento mitocondrial na morte celular induzida pelos peptídeos bioinspirados é essencial para elucidar seus mecanismos de ação e fortalecer seu potencial como novos agentes antifúngicos. A presente pesquisa buscou aprofundar essa compreensão, explorando o papel do potencial de membrana, de ROS e do balanço iônico na modulação da morte celular em fungos do gênero *Candida*, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre terapias antimicrobianas baseadas em AMPs. Os resultados demonstram que os peptídeos RR, D-RR e WR desencadeiam uma disfunção mitocondrial rápida em *C. tropicalis* e *C. albicans*, evidenciada pela hiperpolarização do Δψm e pelo aumento da atividade das NAD-desidrogenases, ambos indicadores de estresse bioenergético precoce. A modulação desses efeitos por íons revela que o desequilíbrio iônico inicial é um determinante para a progressão da morte celular regulada: enquanto Na^{+}, Mg^{+2} e Ca^{+2} reverteram a hiperpolarização e o encolhimento celular, o K^{+} — embora eficaz na restauração morfológica — manteve o

metabolismo mitocondrial elevado, reforçando seu papel singular na fisiologia dessas leveduras. As análises de ROS indicam que as espécies produzidas não são predominantemente de origem mitocondrial, sugerindo vias oxidativas alternativas na citotoxicidade dos peptídeos.

Além disso, os experimentos com azida sódica revelam que a inibição do complexo IV é mais eficaz quando ocorre nos estágios iniciais da interação peptídeo–célula, indicando que eventos mitocondriais críticos são estabelecidos rapidamente após a exposição. O efeito protetor transitório da azida sódica destaca o tempo de exposição como um fator decisivo para impedir a morte celular, sugerindo que alterações precoces — como a modulação do potencial de membrana e o acúmulo inicial de ROS — constituem pontos de não retorno na ativação da morte celular regulada.

REFERÊNCIAS

ADAM-VIZI, V.; CHINOPULOS, C. **Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species.** *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 27, p. 639–645, 2006.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.10.005

ASHRAF, N. *et al*. Re-drawing the maps for endemic mycoses. *Mycopathologia*, v. 185, n. 5, p. 843–865, 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/s11046-020-00431-2.

BANERJEE, S.; DENNING, D.; CHAKRABARTI, A. **One health aspects and priority roadmap for fungal diseases: a mini-review.** *Indian Journal of Medical Research*, v. 153, p. 311, 2021. DOI: https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_768_21

BLASCO, F.; CHAPUIS, J.-P.; GIORDANI, R. *Characterization of the plasma membrane ATPase of Candida tropicalis. Biochimie*, v. 63, n. 6, p. 507–514, 1981. DOI: https://doi.org/10.1016/S0300-9084(81)80083-1.

BIN HAFEEZ, A.; JIANG, X.; BERGEN, P. J.; ZHU, Y. Antimicrobial peptides: An update on classifications and databases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 21, p. 11691, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms222111691.

BENKO-ISEPPON, A. M. *et al*. Overview on plant antimicrobial peptides. *Current Protein & Peptide Science*, v. 11, n. 3, p. 181–188, 2010. DOI: https://doi.org/10.2174/138920310791112075.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, v. 11, p. 127–152, 2005. DOI: https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7.

BORTNER, C. D.; CIDLOWSKI, J. A. **Ion channels and apoptosis in cancer.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 369, n. 1638, 2014. DOI: https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0134

BOTO, A.; PÉREZ DE LA LASTRA, J.; GONZÁLEZ, C. The road from host-defense peptides to a new generation of antimicrobial drugs. *Molecules*, v. 23, n. 2, p. 311, 2018. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules23020311.

BROEKAERT, W. F. *et al*. Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 16, n. 3, p. 297–323, 1997. DOI: https://doi.org/10.1080/07352689709701952.

BROEKAERT, W. F. *et al*. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology*, v. 108, n. 4, p. 1353–1358, 1995. DOI: https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1353.

BOR-CHYUAN, S. et al. *Marine antimicrobial peptide TP4 exerts anticancer effects on human synovial sarcoma cells via calcium overload, reactive oxygen species production and mitochondrial hyperpolarization. Marine Drugs*, v. 19, n. 2, p. 93, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/md19020093.

CARVALHO, A. O.; GOMES, V. M. Plant defensins and defensin-like peptides – biological activities and biotechnological applications. *Current Pharmaceutical Design*, v. 17, n. 38, p. 4270–4293, 2011. DOI: https://doi.org/10.2174/138161211798999447.

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

COOLS, T. L. *et al*. The antifungal plant defensin HsAFP1 is a phosphatidic acid-interacting peptide inducing membrane permeabilization. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, 2017. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02295.

CARVALHO, A. O. et al. Cloning and characterization of a cDNA encoding a cowpea seed defensin and analysis of its expression. *Protein and Peptide Letters*, v. 13, n. 10, p. 1029–1036, 2006. DOI: https://doi.org/10.2174/092986606778777515.

CAZZOLA, R.; DELLA PORTA, M.; PIURI, G.; MAIER, J. A. *Magnesium: A defense line to mitigate inflammation and oxidative stress in adipose tissue. Antioxidants (Basel)*, v. 13, n. 8, p. 893, 2024. DOI: https://doi.org/10.3390/antiox13080893.

CHOI, K. et al. **Oxidative stress–induced necrotic cell death via mitochondria-dependent reactive oxygen species burst.** *Current Neurovascular Research*, v. 6, p. 213–222, 2009. **DOI:** https://doi.org/10.2174/156720209788970216

DAMICA, F. Z. et al. *A role in intracellular K+ in protecting pathogenic dimorphic fungi against induced cell death by bioinspired antimicrobial peptides. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1869, n. 6, maio 2025. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2025.130795.

DENNING, D. W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 2024. DOI: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00692-8.

FISHER, M. C. *et al*. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. *Nature Reviews. Microbiology*, v. 20, n. 9, p. 557–571, 2022. DOI: https://doi.org/10.1038/s41579-022-00720-1.

FAO. *The State of Food and Agriculture 2017: Leveraging food systems for inclusive rural transformation*. Rome: FAO, 2017. ISBN 978-92-5-109873-8. Disponível em: https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/i7658en.

FEDOSEEVA, I. V. et al. Generation of reactive oxygen species by mitochondria and their role in signal transduction. *Biochemistry (Moscow)*, v. 82, n. 8, p. 954–971, 2017. DOI: https://doi.org/10.1134/S0006297917080057.

FU, C. et al. *Role of mitochondria in the regulation of ferroptosis and disease. Frontiers in Medicine*, 2023. DOI: https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1301822.

GEBARA, S. R. et al. Identification and characterization of two defensins from *Capsicum annuum* fruits that exhibit antimicrobial activity. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 12, n. 3, p. 1253–1265, 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/s12602-020-09646-3

GIULIANI, A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, S. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sciences*, v. 2, n. 1, p. 1–33, 2007. DOI: https://doi.org/10.2478/s11535-007-0010-5.

GARG, M.; POORNIMA, G.; RAJYAGURU, P. I. **Elucidation of the RNA-granule inducing sodium azide stress response through transcriptome analysis.** *Genomics*, v. 112, n. 5, p. 2978–2989, 2020. **DOI:** https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.05.001

GEISBERGER, S. et al. *Salt transiently inhibits mitochondrial energetics in mononuclear phagocytes. Circulation*, v. 144, n. 2, p. 144–158, 2021. DOI: https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052788.

GACHOMO, E. W.; SEUFFERHELD, M. J.; KOTCHONI, S. O. Melanization of appressoria is critical for the pathogenicity of *Diplocarpon rosae*. *Molecular Biology Reports*, v. 37, n. 7, p. 3583–3591, 2010. DOI: https://doi.org/10.1007/s11033-010-0007-4.

HEGEDÜS, N.; MARX, F. Antifungal proteins: more than antimicrobials? *Fungal Biology Reviews*, v. 26, n. 4, p. 132–145, 2013. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.002.

HARVEY, J.; HARDY, S. C.; ASHFORD, M. L. **Dual actions of the metabolic inhibitor, sodium azide on K(ATP) channel currents in the rat CRI-G1 insulinoma cell line.** *British Journal of Pharmacology*, v. 126, n. 1, p. 51–60, 1999. **DOI:** https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702267

HELMERHORST, E. J.; REED, J.; HELMERHORST, J. A.; SQUIRES, S.; OPPENHEIM, F. G. Characterization of the mitochondrial respiratory pathways in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, v. 1556, n. 1, p. 73–80, 2002. DOI: 10.1016/s0005-2728(02)00308-0

HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, v. 1778, n. 2, p. 357–375, 2008. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.11.008.

IWAI, T. et al. Sodium accumulation during ischemia induces mitochondrial damage. *Cardiovascular Research*, v. 55, n. 1, p. 141–150, 2002. DOI: https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00337-4.

ISHAAQ, N.; BILAL, M.; IQBAL, H. Medicinal potentialities of plant defensins: a review with applied perspectives. *Medicines*, v. 6, n. 1, p. 29, 2019. DOI: https://doi.org/10.3390/medicines6010029.

IZADPANAH, A.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 52, n. 3, p. 381–390, 2005. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.08.026.

JAARA, H. S. et al. *Mitochondrial ROS, a trigger for mitochondrial dysfunction and inflammasome activation. Exploration of Digestive Diseases*, v. 3, p. 474–503, 2024. DOI: https://doi.org/10.37349/edd.2024.00062.

JEŽEK, P.; HLAVATÁ, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 41, n. 10, p. 1790–1804, 2009. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.01.018.

JOSEPH-HORNE, T.; HOLLOMON, D. W.; WOOD, P. M. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, v. 1504, p. 179–195, 2001. DOI: https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00251-6.

LIU, M. et al. **Magnesium supplementation improves mitochondrial and cardiac diastolic function in diabetes.** *JCI Insight*, v. 4, e123182, 2019. **DOI:** https://doi.org/10.1172/jci.insight.123182

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

MALINA, C.; LARSSON, C.; NIELSEN, J. **Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology.** *FEMS Yeast Research*, v. 18, efoy040, 2018.**DOI:** https://doi.org/10.1093/femsyr/foy040

MORI, M. P. et al. *Mitochondrial membrane hyperpolarization modulates reactive oxygen species production and cell fate. Nature Communications*, 2025. DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-025-59427-5.

MURPHY, M. P. **How mitochondria produce reactive oxygen species.** *Biochemical Journal*, v. 417, p. 1–13, 2009. DOI: https://doi.org/10.1042/BJ20081386

MARÓTI, G. *et al*. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Research in Microbiology*, v. 162, n. 4, p. 363–374, 2011. DOI: https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.02.005.

MATSUZAKI, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1788, n. 8, p. 1687–1692, 2009. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.09.013.

MOOKHERJEE, N. et al. **Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential.** *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 19, n. 5, p. 311–332, 2020. DOI: https://doi.org/10.1038/s41573-020-0055-0

MORETTA, A. *et al*. Antimicrobial peptides: a new hope in biomedical and

pharmaceutical fields. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, 2021. DOI: https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.668632.

NAWROT, R. *et al*. Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiologica*, v. 59, n. 3, p. 181–196, 2014. DOI: https://doi.org/10.1007/s12223-013-0280-4.

O'DONNELL, A.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. Alternative NADH dehydrogenases during oxidative stress in *Aspergillus niger*. *Fungal Biology*, v. 115, p. 359–369, 2011. DOI: https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.01.007.

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

PEREZ-VAZQUEZ, V.; SAAVEDRA-MOLINA, A.; URIBE, S. *In Saccharomyces cerevisiae, cations control the fate of the energy derived from oxidative metabolism through the opening and closing of the yeast mitochondrial unselective channel.* Journal of Bioenergetics and Biomembranes, v. 35, p. 231–241, 2003. DOI: **10.1023/A:1025106601670**.

PERRONE, G. G.; TAN, S.-X.; DAWES, I. W. Reactive oxygen species and ageing in yeast. *FEMS Yeast Research*, v. 8, n. 3, p. 393–405, 2008. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00351.x.

PUSHPANATHAN, M.; GUNASEKARAN, P.; RAJENDHRAN, J. Antimicrobial peptides: versatile biological properties. *International Journal of Peptides*, v. 2013, p. 1–15, 2013. DOI: https://doi.org/10.1155/2013/675391.

POZNIAKOVSKY, A. I. et al. **Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast.** *The Journal of Cell Biology*, v. 168, n. 2, p. 257–269, 2005. DOI: https://doi.org/10.1083/jcb.200408145

RAMESH, S. *et al*. Short antimicrobial peptides (SAMPs) as a class of extraordinary promising therapeutic agents. *Journal of Peptide Science*, v. 22, n. 7, p. 438–451, 2016. DOI: https://doi.org/10.1002/psc.2894.

RUY, Fernando; VERCESI, Anibal E.; KOWALTOWSKI, Alicia J. **Inhibition of specific electron transport pathways leads to oxidative stress and decreased *Candida albicans* proliferation**. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 38, n. 2, p. 129–135, 2006. DOI: 10.1007/s10863-006-9012-7.

RISSO, A. et al. BMAP-28 induces cell death via mitochondrial permeability transition. *Molecular and Cellular Biology*, v. 22, n. 6, p. 1926–1935, 2002. DOI: https://doi.org/10.1128/MCB.22.6.1926-1935.2002.

ROSCIA, G. *et al*. The development of antimicrobial peptides as new antibacterial drugs. *Current Protein & Peptide Science*, v. 14, n. 8, p. 641–649, 2013. DOI: https://doi.org/10.2174/1389203714081312271553 08.

SALAS, C. E.; BADILLO-CORONA, J. A.; RAMÍREZ-SOTELO, G.; OLIVER-SALVADOR, C. Biologically active and antimicrobial peptides from plants. *BioMed Research International*, v. 2015, p. 1–11, 2015. DOI: https://doi.org/10.1155/2015/102129.

SILVA, O. N. et al. Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology*, v. 2, p. 232, 2011. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00232.

SRIVASTAVA, S. et al. Cysteine-rich antimicrobial peptides from plants: the future of antimicrobial therapy. *Phytotherapy Research*, v. 35, n. 1, p. 256–277, 2021. DOI: https://doi.org/10.1002/ptr.6823.

SHABIR, U. *et al*. Fish antimicrobial peptides (AMPs) as essential and promising molecular therapeutic agents: a review. *Microbial Pathogenesis*, v. 114, p. 50–56, 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.039.

SILVA, F. P.; MACHADO, M. C. C. **Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications.** *Peptides*, v. 36, p. 308–314, 2012. DOI: https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.05.014

SIEDOW, J. N.; UMBACH, A. L. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, v. 1459, p. 432–439, 2000. DOI: https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00161-4

SMITH, A. C.; ROBINSON, A. J. **MitoMiner V3.1: an update on the mitochondrial proteomics database.** *Nucleic Acids Research*, v. 44, p. D1258–D1261, 2016. **DOI:** https://doi.org/10.1093/nar/gkv1008

SINO, E. L. et al. **The Qo site of mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling through the production of reactive oxygen species.** *Journal of Cell Biology*, v. 177, p. 1029–1036, 2007. **DOI:** https://doi.org/10.1083/jcb.200702091

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

TOLEDO, E. B. *et al*. Design of improved synthetic antifungal peptides with targeted variations in charge, hydrophobicity and chirality. *Amino Acids*, v. 53, n. 2, p. 219–237, 2021. DOI: https://doi.org/10.1007/s00726-020-02929-x.

TAKESHI, I. et al. *Sodium accumulation during ischemia induces mitochondrial damage in perfused rat hearts.* **Cardiovascular Research**, v. 55, n. 1, p. 141–149, 2002. DOI: https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00282-1

TSUBAKI, M.; YOSHIKAWA, S. *Fourier-transform infra-red study of azide binding to the Fe3–CuB binuclear site of bovine cytochrome oxidase.* **Biochemistry**, v. 32, p. 174–182, 1993.
DOI: https://doi.org/10.1021/bi00052a023

TAVARES, P. M. et al. In vitro activity of the antifungal plant defensin RsAFP2 against *Candida* isolates and its in vivo efficacy in prophylactic murine models of candidiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 12, p. 4522–4525, 2008. DOI: https://doi.org/10.1128/AAC.00448-08.

TURRENS, J. F. *Mitochondrial formation of reactive oxygen species.* **Journal of**

Physiology, v. 552, p. 335–344, 2003. DOI: https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478

TSUKATANI, T. *et al*. Spectrophotometric assay of yeast vitality using 2,3,5,6-tetramethylpyrazine derivatives. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 67, n. 8, p. 1798–1804, 2003. DOI: https://doi.org/10.1271/bbb.67.1798.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action*. Geneva: WHO, 2022. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241.

XU, X.; PANG, Y.; FAN, X. M. *Mitochondria in oxidative stress, inflammation and aging: From mechanisms to therapeutic advances. Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 10, art. 190, 2025. DOI: https://doi.org/10.1038/s41392-025-02253-4.

YUN, J.; LEE, D. G. *Cecropin A-induced apoptosis is regulated by ion balance and glutathione antioxidant system in Candida albicans.* **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 68, n. 8, p. 652–662, 2016. DOI: https://doi.org/10.1002/iub.1527

ZOROVA, L. D. et al. *Mitochondrial membrane potential.* **Analytical Biochemistry**, v. 552, p. 50–59, 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009

ZOROV, D. B. et al. *Perspectives of mitochondrial medicine.* **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, p. 979–990, 2013. DOI: https://doi.org/10.1134/S0006297913090034

YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 19, p. 7363–7368, 2004. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.0401567101.

ZHU, W. L.; NAN, Y. H.; HAHM, K.-S.; SHIN, S.-Y. Cell selectivity of an antimicrobial peptide melittin diastereomer with D-amino acid in the leucine zipper sequence. *BMB Reports*, v. 40, n. 6, p. 1090–1094, 2007. DOI: https://doi.org/10.5483/bmbrep.2007.40.6.1090