

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta TESE será disponibilizado somente a partir de 26/09/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À
FARMÁCIA



Mariana Cristina Galeane Vicentin

**Estudo de peptídeos antimicrobianos contra *Candida albicans* e avaliação
da segurança em modelo Zebrafish (*Danio rerio*)**

Araraquara

2019

Mariana Cristina Galeane Vicentin

Estudo de peptídeos antimicrobianos contra *Candida albicans* e avaliação da segurança em modelo Zebrafish (*Danio rerio*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor.

Candidata: Mariana Cristina Galeane Vicentin

Orientador: Prof(a). Dr(a). Ana Marisa Fusco Almeida

Coorientador: Dr. Paulo Cesar Gomes

Araraquara

2019

V633e Vicentin, Mariana Cristina Galeane.
Estudo de peptídeos antimicrobianos contra *Candida albicans* e
avaliação da segurança em modelo Zebrafish (*Danio rerio*) / Mariana
Cristina Galeane Vicentin. – Araraquara: s.n., 2019.
122 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de
Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.
Coorientador: Paulo Cesar Gomes.

1. Peptídeos antimicrobianos. 2. Candidíase. 3. Córion. 4.
Espectrometria de massas. 5. Toxicidade. 6. Zebrafish. I. Almeida, Ana
Marisa Fusco, orient. II. Gomes, Paulo Cesar, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, primeiramente, aos meus pais Shirley e Jair, que sem eles, este sonho não seria possível! Gratidão por todo amor imenso e incondicional, toda a força e dedicação, trabalho, apoio, companheirismo, incentivo, pelos ensinamentos da vida, que sem dúvida, foram indispensáveis para meu crescimento pessoal e profissional, responsáveis por toda minha índole e dignidade. Agradeço por me ensinarem o que é uma família estruturada, companheira, unida e feliz!! Vocês são minha vida!

A minha companheira de vida, minha irmã Michele, que nossa ligação vai muito além de irmandade, é uma parceria de amizade, companheirismo e confiança. Obrigada por sempre me estimular e apoiar em todas as decisões, pela força para continuar a enfrentar os desafios deste trabalho, pelas palavras de conforto e de incentivo, pelo amor e dedicação! Um obrigada mais que especial ao Leandro, que junto a você, minha irmã, me deram de presente dois sobrinhos maravilhosos, Nicole e Arthur!

Ao meu companheiro, meu eterno namorado, meu marido André Vicentin, que sempre me ouviu nas horas de desespero e sempre esteve ao meu lado, com conselhos que jamais esquecerei. Gratidão por ter escolhido você para sempre estar em minha vida, em todos os momentos, e estarmos formando nossa família. Sem sua companhia não teria alcançado meus objetivos! Amor incondicional pela nossa filha Helena, que neste momento, ainda se desenvolve dentro de mim, mas que já enche nossa casa e nossa vida do amor mais puro e da benção mais grandiosa!!

Aos meus avós, que mesmo não estando mais presentes, sei que de algum lugar, olham e zelam por mim!!

À Deus, pela sua presença constante em minha vida e no meu caminho, agradeço pelo dom da vida e pela saúde, e pelas pessoas maravilhosas que me deu como família!!!

“A única coisa boa que a velhice nos dá é a sabedoria. Por isso, quem ouve o conselho dos pais nunca se dá mal na vida” (Chico Anysio).

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros e amorosos agradecimentos a todas as pessoas que auxiliaram de alguma forma para a realização deste trabalho, pela paciência, ajuda, amizade e apoio contribuídos.

A minha orientadora Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade que me cedeu no laboratório, pela experiência, auxílio e ensinamento para a realização deste trabalho. Obrigada por me permitir todo este aprendizado, por me ajudar a amadurecer na vida, por todo meu crescimento profissional e pessoal e por confiar em meu trabalho!! Só tenho agradecimentos e boas lembranças!!

A minha eterna gratidão ao meu coorientador Dr. Paulo César Gomes, que por muitos momentos diários e difíceis, me ensinou muito e sempre com muita paciência e determinação. Aprendi muitas coisas com você, obrigada!!! Gratidão pela equipe que formamos no laboratório de Zebrafish, que juntos conseguimos ir além! Obrigada por toda parceria, amizade, disponibilidade e dedicação nestes anos e por permitir que mais esta etapa em minha vida tenha sido cumprida.

A Profa. Dra. Maria José Soares Mendes-Giannini, obrigada por me ceder a oportunidade de trabalhar no laboratório e pela confiança. Obrigada por transmitir sua sabedoria e experiência, por auxiliar sempre na realização deste trabalho e pelo apoio.

A Rosângela, técnica do laboratório de micologia, por sempre ser tão paciente e sempre estar disposta a ajudar em todos os momentos! Muito obrigada por tudo!

Aos meus amigos de laboratório, que de alguma forma, cada um de vocês me ajudaram e compartilharam muitas lembranças diárias, por todo apoio, ânimo, experiências, carinho, amizade, dedicação, paciência, companheirismo, enfim, todos os momentos bons e ruins que passamos juntos, obrigada por me fazerem amadurecer e aprender com cada um de vocês! Momentos inesquecíveis!

Um agradecimento mais que especial a Junya de Lacorte Singulani, que dividiu muitos momentos comigo e também pela parceria na equipe Zebrafish! Sempre soube que podia contar com você em todas as situações! Muito obrigada por sempre estar disposta a me ajudar em todos os momentos!!

Ao Prof. Dr. Mario Sergio Palma e sua equipe, que gentilmente cederam alguns peptídeos para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos por me permitirem trabalhar em parceria com vocês!

Meu agradecimento mais que especial a minha amiga Natália Strohmayer, que tive a honra de conhecer no laboratório e que se tornou minha amiga de todas as horas! Obrigada por ser a pessoa que sempre se dispôs a me ajudar em muitas ocasiões no laboratório! Obrigada por sempre estar presente em todas as situações da minha vida.

A Dra. Paula Aboud Barbugli, assistente de suporte acadêmico IV da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pela paciência, ensinamentos, e pela disponibilidade do uso do aparelho de microscopia confocal.

A todos os funcionários e docentes da Universidade Estadual Paulista - UNESP, que de alguma forma, contribuíram para o rendimento e finalização deste estudo.

À CAPES pelo apoio financeiro cedido.

RESUMO

Devido ao aumento das doenças fúngicas, do uso indiscriminado de antimicrobianos, associados ao aparecimento de cepas resistentes e formadoras de biofilmes, é essencial a busca pelo desenvolvimento de novos antifúngicos mais eficientes. As espécies de *Candida* são conhecidas pela capacidade de infectar humanos, sendo a formação de biofilmes um dos fatores de virulência mais importantes. No estudo interação patógeno-hospedeiro, bem como para eficácia terapêutica e segurança, algumas vantagens no uso de modelos animais alternativos são a redução de tempo de resposta em experimentos, eficiência e baixo custo quando comparado ao uso de camundongos. Desta forma, moléculas antifúngicas estão sendo testadas nestes animais alternativos, como *Danio rerio* (Zebrafish), um vertebrado que apresenta rápida reprodução e homologia genética e funcional com os mamíferos. Em relação às moléculas em testes, há um crescente estudo de peptídeos oriundos de venenos e da hemolinfa de insetos, como novos compostos antifúngicos, os quais possam apresentar além de boa atividade, baixa toxicidade e não-teratogenicidade. Neste trabalho, foram estudados peptídeos análogos de Mastoparanos de vespas (MKs) cuja atividade antimicrobiana já é conhecida, previamente sintetizados com modificações nas suas características estruturais, como número de resíduos de Lisina e carga líquida. Levando em consideração as características estruturais dos MKs, outros quatro peptídeos foram sintetizados e estudados, dos quais dois peptídeos (PepM1; PepM2) são análogos do antimicrobiano Moricin C3, derivado da hemolinfa de *Galleria mellonella*, e dois peptídeos (PepM3; PepM4) análogos dos IsCT, uma classe oriunda do veneno do escorpião *Opisthacanthus madagascariensis*. Os resultados revelaram que as modificações quanto ao número de resíduos carregados e a distribuição em relação à fração hidrofóbica na cadeia peptídica, influenciaram tanto na atividade anti-*Candida* como em relação à toxicidade. Os análogos mostraram uma promissora atividade antifúngica contra *Candida albicans*, com a concentração inibitória mínima (CIM) variando de 15,62 a 250 µg/mL, apresentaram diferenças em relação à toxicidade em Zebrafish e também à citotoxicidade em queratinócitos de pele. Aqueles com melhores resultados da CIM foram selecionados para testes em espectrometria de massas para estudo da permeabilidade do córion do embrião de Zebrafish, onde foi visto também,

alterações no comportamento destes peptídeos de acordo com as diferenças das suas características estruturais. Além disso, a metodologia de infecção por imersão usando embriões de Zebrafish foi padronizada neste trabalho frente *C. albicans* e, através de mapeamento por imagem, foi possível verificar o estabelecimento da infecção e aderência do patógeno.

Palavras – chave: Peptídeos antimicrobianos; candidíase; córion; espectrometria de massas; toxicidade; zebrafish.

ABSTRACT

Due to the increase of fungal diseases, indiscriminate use of antimicrobial linked to occurrence of resistance and biofilm – forming strains, the search for the development of new efficient antifungals is essential. *Candida* species are known for their ability to infect humans, and biofilm formation is one of the most important virulence factors. In respect pathogen – host interaction, as well as for therapeutic efficacy and safety, some advantages in the use of alternative animal models are the reduction of response time in experiments, efficiency and low cost when compared to the use of mice. Thus, antifungal molecules are being tested in these alternative animals, such as *Danio rerio* (Zebrafish), a vertebrate that exhibits rapid reproduction and genetic and functional homology with mammals. Regarding molecules under test, there is a growing study of peptides from poisons and insect hemolymph, as new antifungal compounds, which may present aside from to good activity, low toxicity and non-teratogenicity. In this work, it was studied was mastoparan analog peptides (MKs), whose antimicrobial activity is already known, previously synthesized with modifications in their structural characteristics, such as Lysine residues number and net charge. Taking into account the structural characteristics of MKs, four other peptides were synthesized and studied, of which two peptides (PepM1; PepM2) are analogues of the antimicrobial Moricin C3, derived from *Galleria mellonella* hemolymph, and two peptides (PepM3; PepM4) analogs of IsCT, a class from the poison of the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. The results revealed that the changes in the number of charged residues and the distribution in relation to the hydrophobic fraction in the peptide chain influenced as well anti-*Candida* activity as toxicity and cytotoxicity. The analogues showed promising antifungal activity against *Candida albicans*, with minimal inhibitory concentration (MIC) ranging from 15.62 to 250 µg/mL, and showed differences in toxicity in Zebrafish. Those with the best MIC results were selected for mass spectrometric tests to study the permeability of the Zebrafish embryo chorion, where it was also seen changes in the behavior of these peptides according to differences in their structural characteristics. In addition, the methodology of immersion infection using Zebrafish embryos was standardized in this study against *C. albicans* and, through image mapping, it was possible to verify the infection establishment and pathogen adherence.

Keywords: Antimicrobial peptides; candidiasis; chorion; mass spectrometry; toxicity; zebrafish.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Candida albicans*

Infecções causadas por vários microrganismos representam uma grande ameaça para sobrevivência humana (WISE, 2011), e além disso, os que são considerados comensais tornam-se patogênicos no momento em que ocorrem mudanças no sistema de defesa do hospedeiro ou por procedimentos invasivos, sendo que a emergência da resistência aos medicamentos cria obstáculos aos tratamentos (PAYNE et al., 2006).

Considera-se dentro de um bilhão de pessoas, uma estimativa de mais de 150 milhões apresenta graves doenças fúngicas, ocasionando um grande impacto na sobrevivência destes ou até evoluindo para um caso fatal. Entretanto, a severidade varia de infecções mucocutâneas médias-assintomáticas a infecções sistêmicas potencialmente letais. A mortalidade relacionada as doenças fúngicas é similar à da tuberculose e três vezes maior do que a malária (BROWN et al., 2012; BONGOMIN et al., 2017).

Em relação as infecções fúngicas, as espécies que mais comumente estão envolvidas nestas doenças são as *Candida* spp., que estão presentes na cavidade oral com taxas em torno de 20-40% na população em geral, e em outros segmentos do trato gastrointestinal. As infecções por esta espécie apresentam um índice de 75%, causando uma variedade de infecções mucocutâneas que debilitam o paciente, e dependendo da condição do sistema imune (PFALLER & DIEKEMA, 2010; COLOMBO et al., 2013), como alterações fisiológicas na infância (prematuros), envelhecimento, imunodeficiências congênitas, doenças degenerativas, imunossupressão por drogas ou procedimentos médicos podem levar a alterações da defesa do paciente (COLOMBO et al., 2013; DIGNANI; SOLOMKIN; ANAISSIE, 2003).

Estudos estimam que cerca de um bilhão de pessoas apresentam infecções por fungos na pele, unhas e cabelo, com aproximadamente 10 milhões relacionados a infecção por candidíase na mucosa. Dentre as *Candida* spp. de importância clínica, as quais são aproximadamente 20 espécies, *Candida albicans* é o patógeno oportunista mais comum, responsável por 45% dos casos totais, especialmente em pacientes imunocomprometidos, tendo como um dos marcadores do agravamento imunológico de pacientes com AIDS a candidíase

oral, uma das infecções oportunistas mais prevalentes nesta população, podendo ocorrer recorrência ou até progredir para uma esofagite (COLOMBO et al., 2013; JOHNSON, 2010; BONGOMIN et al., 2017).

Estudos mostram que *C. albicans* continua a ser o principal agente etiológico de várias manifestações clínicas que vão desde lesões superficiais da pele até sistêmica candidíase invasiva (SELLAM et al., 2009; COSTA et al., 2013), e que, considerando isolados de amostras clínicas, 60% são referentes a *C. albicans* (BARBEDO & SGARBI, 2010). Este patógeno comumente coloniza vários sítios anatômicos em humanos (ODDS, 1988) e, mais do que isso, a sua resistência às drogas continua sendo uma séria preocupação no contexto clínico. Portanto, obter um entendimento na patogênese de *C. albicans* deverá melhorar a terapia antifúngica, e facilitar o estudo e desenvolvimento de novas drogas (BERMAN & SUDBERY, 2002).

Uma das formas de manifestação superficial causada por *C. albicans* é a candidíase oral, que pode ocorrer devido a uma alteração da imunidade local ou sistêmica, ocasionada pela idade (idosos e neonatos prematuros), por uso de prótese, exposição a drogas imunossupressivas como corticosteroides ou quimioterapia ou pela presença de doenças como desnutrição, diabetes, câncer, entre outras (VAZQUEZ & SOBEL, 2002; COLOMBO et al., 2013). *C. albicans* é responsável por aproximadamente 90% dos isolados causadores de candidíase oroesofágica (VAZQUEZ, 2003; COLOMBO et al., 2013).

Além disso, *C. albicans* é o agente causador mais comum de doenças fúngicas genitourinárias como candidíase vulvovaginal (CVV) (COLOMBO et al., 2013; PFALLER & DIEKEMA, 2010; ILKIT & GUZEL, 2011; ALGARIHI et al., 2019), sendo a segunda causa de leucorréia infecciosa, e em pacientes da América do Norte, é responsável por aproximadamente 13 milhões de casos de vaginite, anualmente. Estudos apontam que 75% das mulheres já apresentaram um episódio de CVV durante os anos férteis, estimando 5% de recidivas (estabelecido como quatro ou mais episódios todos os anos) (KENNEDY & SOBEL, 2010; COLOMBO et al., 2013; GIRALDO & WATKIN, 1998).

CVV se enquadra em duas classificações, dependendo da presença ou não de comorbidades associadas com esta condição, designadas de primária ou secundária. A primeira é, geralmente, responsável pela maioria dos casos e é idiopática; já a segunda pode manifestar-se por diferentes causas como

desequilíbrio hormonal, desordens metabólicas, altos níveis de estrógeno, alguns medicamentos como antibióticos ou contraceptivos e imunossupressão (ACHKAR & FRIES, 2010; COLOMBO et al., 2013).

Os fungos apresentam parede e membrana celular, sendo sua parede composta principalmente de polissacarídeos como glucanos, manana e quitina (RUIZ-HERRERA et al., 1994). Mais especificamente de células de *Candida*, a parede é composta abundantemente por glucanos, sendo 60-65% do total dos polissacarídeos, e as mananas entre 20-25%. A camada externa da parede celular é principalmente composta de manana e laminarina. O que mais diferencia a classe fúngica é o componente lipídico neutro principal, conhecido como ergosterol (WANG, et al., 2014; SULLIVAN et al., 1983; TANIDA et al., 2006).

Considerando a natureza oportunista deste patógeno, existe um verdadeiro desafio relacionado às defesas do sistema imune do hospedeiro e os fatores de virulência de *C. albicans* (CASADEVALL & PIROFSKI, 2003; JABRA-RIZK et al., 2016; GRATACAP et al., 2017), como por exemplo a candidíase orofaríngea aguda, sendo que ela é mais comum em pacientes com neutropenia, podendo ter a imunidade inata e adaptativa afetada devido aos tratamentos imunossupressores, como radiação, quimioterapia, uso de antibióticos e corticosteroides (LORTHOLARY & DUPONT, 1997; SCULLY et al., 1994; GRATACAP et al., 2017).

Juntamente com *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Candida* é um patógeno predominantemente nosocomial (adquirida no hospital) causando alta morbidade e mortalidade (PETERS et al., 2012). Entre todas as espécies de *Candida*, *C. albicans* é um dos patógenos fúngicos humanos melhor estudado, sendo conhecido por crescer em três distintas estruturas morfológicas (morfogênese): leveduras, pseudohifas e hifas verdadeiras (KIM & SUDBERY, 2011). Ambas as hifas e pseudohifas são invasivas, o que pode promover uma maior invasão nos tecidos durante o estágio inicial da infecção (SUDBERY et al., 2004; MAYER et al., 2013). Devido à hifa ter tendências de aderir e penetrar no tecido do hospedeiro, elas são responsáveis por infecções na mucosa (candidíase oral) (PETERS et al., 2012). Além disso, estas formas filamentosas são também importantes para a colonização de órgãos, como rins, causando infecções profundas. A forma de levedura, pelo contrário, pode ser

mais adequada para disseminação na corrente sanguínea e doença sistêmica (SUDBERY et al., 2004).

A infecção de corrente sanguínea causada por *C. albicans* é conhecida como “candidemia”, sendo que esta pode levar à infecção de órgãos internos, uma condição conhecida como “candidíase disseminada”; e tanto a candidemia quanto a candidíase disseminada representam problemas médicos e clínicos extremamente sérios (KIM & SUDBERY, 2011). A candidíase disseminada está associada a 30-40% da mortalidade em pacientes imunocomprometidos (CHENG et al., 2004; YANG et al., 2010). Em relação a epidemiologia no Brasil, estudos indicam que durante um período de 12 meses (março/2002-fevereiro/2003) em quatro hospitais da cidade de São Paulo, de um total de 7.038 casos de bacteremias e fungemias avaliados, 4,3% do total de infecções da corrente sanguínea correspondia a *Candida spp.* (COLOMBO & GUIMARAES, 2003; COLOMBO, 2003). Outros estudos indicam que a taxa de mortalidade atribuída a candidemia permanece aproximadamente 50% (COLOMBO et al., 2007; GUDLAUGSSON et al., 2003), e que *C. albicans* foi a principal causa de candidemia em 32 de 40 estudos, mostrando prevalência com taxas entre 18,8% e 66% (DA MATTA et al., 2017).

Fatores de virulência que permitem *C. albicans* evoluir de comensal para patógeno incluem reconhecimento de biomoléculas do hospedeiro (adesinas), morfogênese, proteases aspartil secretadas (SAPs), fosfolipases (PLs) e alteração fenotípica (CALDERONE & FONZI, 2001; KUO et al., 2013; DEMUYSER et al., 2014). Entre estes fatores, a transição levedura-hifa (morfogênese) é considerada um fator de virulência crucial para patogênese de *C. albicans* (KUO et al., 2013).

Uma condição para a patogenicidade de espécies de *Candida* é a invasão do tecido do hospedeiro, sendo mediada por moléculas de adesão (adesinas) expressas na superfície, interações específicas ligante-receptor e também interações não específicas, que permitem a este patógeno se ligar a uma variedade de tecidos eucarióticos (LASS-FLORL, 2009; CHIN et al., 2016).

O fenômeno descrito como transição reversível entre levedura unicelular e formas de crescimento filamentosas para pseudohifa e hifa é chamado morfogênese (CALDERONE & FONZI, 2001). O crescimento de hifas é promovido por um número de fatores ambientais como temperatura de

crescimento a 37 °C, presença de soro, pH neutro, alto CO₂, entre outros (KIM & SUDBERY, 2011; MAYER et al., 2013). Células de leveduras crescem a 30 °C e em pH ácido (pH 4,0); e as pseudohifas em condições como 35 °C e pH 5,5 (KIM & SUDBERY, 2011; MAYER et al., 2013).

A alteração fenotípica é uma transição entre estados celulares alternativos considerada categórica para a patogênese fúngica, para colonizar e infectar diferentes nichos no hospedeiro. *Candida albicans* altera de colônias brancas e lisas para colônias planas e cinzas (mais opacas), sugerindo ser importante, principalmente, na interação com o sistema imune do hospedeiro (GEIGER et al., 2004; LOHSE & JOHNSON, 2008; CHIN et al., 2016). Existem diferenças entre esses dois tipos de colônias, como por exemplo a forma da célula, em que as células brancas são ovoides e as opacas são alongadas em forma de feijão (CALDERONE & FONZI, 2001; ANDERSON et al., 1990). Além disso, esta alteração pode ser um mecanismo adaptativo das células de *C. albicans* para escapar do sistema imune do hospedeiro, pois as células brancas e opacas são diferencialmente fagocitadas por macrófagos (LOHSE & JOHNSON, 2008; CHIN et al., 2016).

Outro fator de virulência de *C. albicans* são as aspartil proteinases secretadas (SAPs), que são produzidas logo depois do processo de adesão à superfície celular. As SAPs facilitam a penetração ativa do fungo para dentro das células hospedeiras e aumentam a eficiência na aquisição de nutriente extracelular para as próprias células do patógeno (WACHTLER et al., 2012; NAGLIK et al., 2003; CHIN et al., 2016). Esse fornecimento de nutrientes se dá pela degradação de proteínas do hospedeiro, o que facilita a penetração e invasão dos tecidos, além da evasão das respostas imunes (GAUWERKY et al., 2009; CHAFFIN et al., 1998; CHIN et al., 2016).

As fosfolipases também são enzimas que aumentam a patogenicidade da infecção por *Candida*. Elas quebram os fosfolipídios das membranas da célula hospedeira, que por sua vez, auxilia na aderência, penetração e por fim, na invasão celular (MAVOR et al., 2005; CHIN et al., 2016).

Muitos fungos e bactérias são descritos como capazes de formar biofilmes, estabelecendo comunidades resistentes em uma variedade de superfícies clínicas (DONLAN, 2001; HOYLE et al., 1990). Estes conglomerados de células aderentes representam um sério obstáculo para o tratamento da

infecção. Em comparação com as células planctônicas, estes são extremamente resistentes às terapias antimicrobianas (HAWSER et al., 1998).

Biofilmes são comunidades dinâmicas de microrganismos aderidos fortemente a superfícies biológicas e não biológicas (CHANDRA, et al., 2001), caracterizados por uma malha fibrilar de polissacarídeos (matriz) à qual se fixam microrganismos, formando uma arquitetura tridimensional complexa (CHANDRA, et al., 2001), e estas células microbianas, ditas sésseis, diferem em suas propriedades biológicas de suas homólogas livres, flutuantes ou planctônicas (COSTERTON, et al., 1995; DONLAN & COSTERTON, 2002). A matriz de um biofilme funciona como barreira física afetando a penetração do agente antimicrobiano aplicado externamente, protegendo as células internas do biofilme (LONNEMANN, 2000; PIERCE et al., 2008). As células em biofilme exibem um distinto fenótipo de células livres flutuantes (planctônicas), incluindo sua reduzida susceptibilidade para agentes antimicrobianos (KUCHARIKOVA et al., 2013, KUCHARIKOVA et al., 2011; NOBILE et al., 2006). Estudos tem mostrado que a matriz extracelular do biofilme tem uma importante função na tolerância para os antifúngicos como a classe dos azóis (NETT et al., 2010b; BONHOMME & D'ENFERT, 2013; MITCHELL et al., 2015); outro processo desta tolerância é a densidade celular, expressão de bombas de efluxo ou ocorrência de células persistentes (variantes fenotípicas de tipo selvagem que são altamente tolerantes) (LAFLEUR et al., 2006; BONHOMME & D'ENFERT, 2013).

Recentemente, WÖLLERT & LANGFORD, (2016), descreveram mudanças na arquitetura e no mecanismo de rearranjo do citoesqueleto de actina em células epiteliais de pele infectadas com biofilmes de *C. albicans*, mostrando que os biofilmes são formas presentes em células hospedeiras.

A produção de células persistentes associada com a resistência das respostas imunes do hospedeiro tem mostrado que a necessidade de melhorar as terapias medicamentosas é crucial (CHRISTENSEN et al., 2007; SHIRTLIFF et al., 2009).

1.2. Peptídeos antimicrobianos (AMP`s)

A resistência dos fungos aos agentes antifúngicos traz a necessidade emergencial de se descobrir novas terapias, uma vez que estas infecções podem ser letais. Concomitante a isto, como há um número limitado de antibióticos

disponíveis com atividades e mecanismo de ação similares, pesquisas intensivas estão em progresso para novas e não-convencionais terapias antimicrobianas (CZAPLEWSKI et al., 2016; MAHLAPUU et al., 2016).

Devido ao fator emergencial para a pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos antifúngicos, um interesse amplo em produtos naturais tem levado aos estudos com compostos não-tradicionais, como por exemplo os venenos de insetos e outros animais, que apresentam funcionalidades medicinais valorizadas no combate a muitas doenças como câncer, analgésicos, anticoagulantes, diabetes, entre outros (SAMY, et al., 2015; HARVEY, 2014; BEA, et al., 2017).

Peptídeos de defesa do hospedeiro ou AMP`s envolvem mecanismos de membrana ativa ou de alvos intracelulares sem danos de membrana, que geram interesse por sua possível utilização como agentes antimicrobianos em uma era de resistência antibiótica (BROGDEN & BROGDEN, 2011; MEMARIANI et al., 2016). Estes compostos podem ser encontrados em todos os organismos, são componentes importantes da defesa não específica e do sistema imune inato de diferentes grupos de animais (MITSUHARA, 2001; DE SOUZA et al., 2011). Possuem uma notável estrutura e diversidade funcional, e somando-se a atividade antimicrobiana direta, eles apresentam propriedades imunomodulatórias, o que os tornam interessantes para desenvolvimento de novas terapêuticas (FJELL et al., 2012; MAHLAPUU et al., 2016).

Adicionalmente, HANCOCK & PATRZYKAT (2002) observaram que os AMP`s apresentam muitas propriedades benéficas, incluindo amplo espectro de atividade antimicrobiana, comumente não induzem resistência bacteriana, rápido mecanismo de morte, e apresentam atividade sinérgica quando combinados com antibióticos clássicos, sendo um atrativo no desenvolvimento de novos candidatos antimicrobianos.

Estudos presumem que os microrganismos não criarão resistência contra muitos AMP`s, uma vez que eles agem na membrana celular. Isto porque, apesar de alguns mecanismos de resistência já terem sido descritos, eles envolvem uma grande alteração na composição da membrana a fim de mudar a carga, interferindo na associação peptídeo-alvo, ou também por serem mecanismos altamente específicos que não são cabíveis a um grande número de peptídeos antimicrobianos (BROGDEN, 2005; CHAN et al., 2006).

Apesar de ainda ser pouco estudado como ocorre a interação de peptídeos com os fungos, AMP's que são catiônicos anfipáticos podem interagir com os lipídios aniônicos da membrana fúngica e romper a integridade desta (WANG et al., 2014), formando poros que permitem a saída de nutrientes e íons essenciais (LI et al., 2014; MATSUZAKI, 1999; ZASLOFF, 2002).

DENNISON et al., (2005) indicaram que o mecanismo de atuação dos AMP's pode ser desde ataque direto à membrana microbiana, como até exercer a atividade antimicrobiana através de alvos adicionais como DNA e peptidoglicano (MEMARIANI et al., 2016). Muitos AMP's possuem uma direta e rápida atividade devido à quebra da integridade física da membrana microbiana e/ou pela translocação através da membrana no interior do citoplasma da bactéria, atuando em alvos intracelulares (HANCOCK & SAHL, 2006; MAHLAPUU et al., 2016).

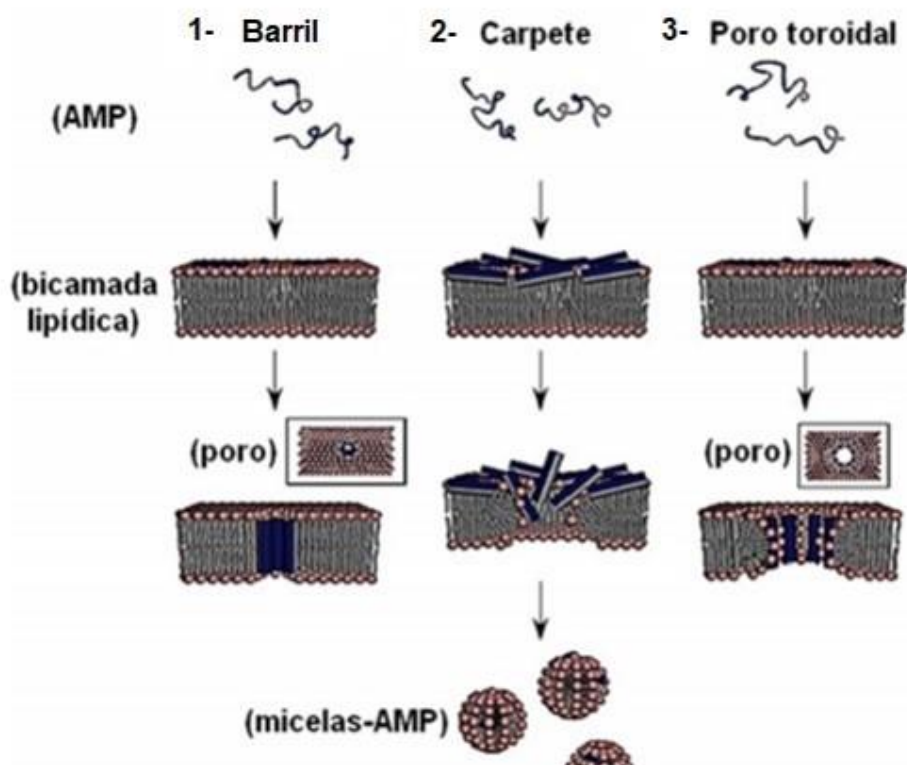
Entretanto, os diferentes mecanismos de morte que não envolvem danos de membrana são alvos intracelulares que incluem inibição de síntese de macromoléculas como ácidos nucleicos ou proteínas (SUBBALAKSHMI & SITARAM 1998; LI et al., 2014), inibição de função enzimática ou metabólica (OTVOS et al. 2000; LI et al., 2014), e inibição da formação da membrana ou parede celular do microrganismo (BRÖTZ et al. 1998; LI et al., 2014).

Os AMP's constituem um grupo representado por peptídeos com estruturas lineares ou cíclicas, com propriedades hidrofóbicas ou anfipáticas. Em relação às estruturas primárias dos AMP's, assim como no caso dos peptídeos antibacterianos, não existe um domínio estrutural conservado ao qual seja atribuída a atividade antifúngica dessas moléculas (FALICO & CASTRO, 2014; JESSEN et al., 2006). Muitos peptídeos antifúngicos são capazes de formar α -hélice, o que poderia estar relacionado com sua habilidade em interagir com as cadeias laterais de lipídeos da membrana dos diferentes microrganismos, levando à ruptura da função da membrana e interferindo com o balanço osmótico da célula (FALICO & CASTRO, 2014; GORAYA et al., 1998).

Forças eletrostáticas entre AMP's catiônicos e a carga negativa da superfície dos microrganismos são pontos alvos para a interação entre peptídeos e membrana microbiana, uma vez que a interação com a membrana é fator crucial para a atividade direta destes (YEAMAN & YOUNT, 2003; GIULIANI et al., 2007; YEUNG et al., 2011; EBENHAN et al., 2014; MAHLAPUU et al., 2016).

Levando em consideração AMP's que atuam como dano de membrana, existem três mecanismos já descritos que podem causar a lise pela formação de poros, provocados pelos peptídeos: “carpete” (SHAI, 1999), “barril” (SANSOM, 1991; SHAI, 1999) e “toroidal” (LUDTKE et al., 1996). No primeiro modelo, os peptídeos estão em contato com a cabeça do grupo lipídico durante o processo de permeação de membrana e não se inserem dentro do núcleo hidrofóbico da membrana (POUNY et al., 1992; SHAI, 1999). Já no segundo modelo, os AMP's se inserem no núcleo hidrofóbico da membrana e formam poros transmembrana (EHRENSTEIN & LECAR, 1977; SHAI, 1999). O último modelo, apresenta uma maior complexidade de entendimento, resumidamente a bicamada lipídica dobra-se nela mesma como se fosse o interior de um toro, deformando a membrana e formando uma curvatura. Esta deformação e a flexão na área toroidal custam uma energia. Assim, os peptídeos seriam incorporados para auxiliar nesta energia e tensão gerados pela expansão da membrana, estabilizando os poros (LUDTKE et al., 1996). A figura 1 é representativa dos mecanismos de ação dos AMP's (CARVALHO & MACHINI, 2013).

Figura 1. Modelos de mecanismo de ação dos AMP's em membrana lipídica. 1 – Adsorção peptídica na superfície da membrana (modelo “barril”); 2- Interação eletrostática entre os resíduos carregados positivamente do peptídeo e as cargas negativas dos fosfolipídeos (modelo “carpete”); 3 - Inserção do AMP pela bicamada resultando em poro toroidal ou cilíndrico (modelo “toroidal”) (CARVALHO & MACHINI, 2013).



O desenho de novos peptídeos, no intuito de aumentar atividade antimicrobiana e reduzir a toxicidade, tem sido amplamente estudado, apesar do mecanismo de ação específico ainda não ser muito bem compreendido. Esta melhora nas funções dos AMP`s podem ser realizadas por alterações nos parâmetros físico-químicos, como por exemplo tamanho da cadeia, anfipacidade, conteúdo de conformação alfa-hélice e carga líquida positiva (DATHE & WIPRECHT, 1999; DATHE et al., 2002; DE SOUZA et al., 2011).

Estudos destacam que alguns peptídeos são capazes de suprimir a formação de biofilmes e induzir a dissolução de biofilmes existentes, sendo este último especialmente importante, uma vez que pode alterar totalmente a maturação dele, existindo ainda aqueles que possuem capacidade de sensibilizar os biofilmes, permitindo que estes se tornem mais sensíveis a ação de outros agentes microbianos (FJELL et al., 2012; MEMARIANI et al., 2016; LEITCH & WILLCOX, 1999).

Peptídeos antimicrobianos têm sido isolados de venenos de animais, que são misturas complexas de componentes utilizados no intuito de defesa e no ataque as suas presas. Muitos venenos já foram estudados com objetivo de isolar os AMP`s, incluindo insetos como vespas e também do escorpião, como por exemplo o peptídeo polybia-CP, ILGTILGLLKSL-NH₂, isolado da vespa *Polybia paulista* (SOUZA et al., 2005). Este AMP mostrou atividade antibacteriana e antitumoral, com mecanismo de ação membrana-ativa, entretanto, pouco se conhece sobre este mecanismo (WANG et al., 2011; WANG et al., 2012; WANG et al., 2016).

Peptídeos mastoparanos isolados dos venenos de vespas tem alta atividade antimicrobiana, por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, entre outros. Eles são tetradecapeptídeos amidados na porção C-terminal, policatiônicos e geralmente tem de dois a quatro resíduos de Lisina em suas sequências (DE SOUZA et al., 2011; NAKAJIMA et al., 1986). Estudos de número de resíduos de Lisina e sua distribuição na sequência dos peptídeos sugerem sua influência na anfipacidade e na carga líquida positiva destes

peptídeos, promovendo um segmento hélice estável e uma mais homogênea superfície hidrofóbica, e conseqüentemente influenciando a interação com membranas (DE SOUZA et al., 2011; DE SOUZA et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2004; DA SILVA et al., 2014).

Mastoparanos possuem muitos mecanismos de ação, além dos causadores de membrana discutidos na figura 1. O posicionamento dos resíduos de Lisina (posições estratégicas 4/5 e 11/13) mantém estável a alfa-hélice, que se expande do resíduo 4 ao 13, tendo uma superfície hidrofóbica mais homogênea na estrutura anfipática, podendo contribuir para a máxima eficiência lítica (DE SOUZA et al., 2011).

Os insetos apresentam um sistema imune efetivo, com mecanismos de resposta humoral e inata. Fagocitose e encapsulação, por exemplo, são mediados por hemócitos, e os peptídeos e proteínas antimicrobianas são componentes essenciais da resposta imune humoral, sendo estes sintetizados no corpo gordo do inseto durante a resposta contra patógenos, e secretados na hemolinfa (apresenta funcionalidades análogas ao soro de mamíferos), sendo depois difundidos para os locais da infecção para combater os componentes das bactérias ou da parede celular fúngica (BULET & STOCKLIN, 2005; FERRANDON et al., 2007; JIRAVANICHPAISAL et al., 2006; LAVINE & STRAND, 2002; LECLERC & REICHHART, 2004; MARMARAS & LAMPROPOULOU, 2009; MAKHA et al., 2010; BULET et al., 1999; VIERSTRAETE et al., 2004; BERGIN et al., 2006), uma vez que a resposta imune adaptativa é inexistente nestes invertebrados (FARUCK et al., 2016).

Um modelo de inseto que tem sido amplamente utilizado para estudos de resposta imune é a traça de cera *Galleria mellonella* (*Lepidoptera*). Pesquisas recentes mostraram a presença de um grande conjunto de peptídeos antimicrobianos na hemolinfa da mesma. Dentre os identificados, alguns são peptídeos lineares alfa hélice (cecropina e moricin-like), peptídeos estabilizados por cisteína (defensinas), ricos em prolina e glicina (gloverin) (BROWN et al., 2008, 2009; CYTRYNSKA et al., 2007; KIM et al., 2004; LEE et al., 2004; MAKHA et al., 2001; SCHUHMANN et al., 2003; MAKHA et al., 2010).

Os AMP's produzidos pela larva podem ter interações benéficas que incluem sinergismo, diversificação funcional e potencialização (BARRIBEAU et al., 2014; DOBSON et al., 2013; MOGHADDAM et al., 2016), tornando-se mais

eficaz e permitindo a ação direta sobre patógenos específicos (VILCINSKAS et al., 2013; HAINE et al., 2008; MOGHADDAM et al., 2016).

Estudos indicam que o sistema imune da larva de *Galleria mellonella* diferencia – se e responde adequadamente a partir do patógeno em que entrou em contato. Peptídeos antimicrobianos e proteínas são cruciais na resposta imune humoral e são produzidos contra os patógenos invasores (MAK et al., 2001).

MAK et al., 2001 fizeram estudos com *G. mellonella* infectada com vários patógenos, sendo um deles *C. albicans*, e analisaram a resposta imune da larva frente produção de AMP`s, como cecropin, anionic 1 e 2, entre outros. Eles observaram que quando a larva está infectada com *C. albicans* não provoca muitas mudanças efetivas nos níveis dos peptídeos antimicrobianos estudados, pois talvez leva ao aparecimento de outros peptídeos não investigados. Outra observação foi que o peptídeo anionic 2 pode atuar sinergicamente com outros AMP`s presentes na hemolinfa, potencializando sua atividade.

Destacando outros dois peptídeos isolados de animais, conhecidos como a classe do IsCT, foram denominados como IsCT (ILGKIWEGIKSLF-NH₂) o primeiro AMP isolado por DAI et al., 2001, e IsCT2 (IFGAIWNGIKSLF-NH₂), isolado do mesmo veneno, dividindo 78% de homologia com o primeiro, apresentando semelhante atividade biológica, isolado por DAI et al., 2002. Ambos foram originados do veneno do escorpião da espécie *Opithancatus madagascariensis*, apresentando 13 resíduos de aminoácidos com C-terminal amidado, formando uma estrutura secundária alfa-hélice com propriedades anfipáticas. A denominação IsCT é devido à esta espécie ter sido encontrada em Isalo, Madagascar e o peptídeo ter atividade citotóxica (DAI et al., 2001; BEA et al., 2017).

DAI et al., (2001, 2002), mostrou uma promissora atividade antimicrobiana dos dois IsCT (IsCT e IsCT2) frente *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, entre outros; por outro lado, os peptídeos resultaram em alta atividade hemolítica (BELOKONEVA et al., 2003). Desta forma, estes resultados mostram o quão importante são os estudos relacionados à substituição de alguns resíduos de aminoácidos na estrutura peptídica, a fim de reduzir a toxicidade e melhorar atividade antimicrobiana.

Sendo assim, estudos já demonstraram vários análogos de IsCT com resíduos substituídos em posições definidas que apresentaram uma melhora da atividade com a toxicidade considerada moderada ou até mínima (LIM et al., 2005; BEA et al., 2017), porém estudos envolvendo a atividade antifúngica desta classe de AMP`s ainda são escassos na literatura.

1.3. Espectrometria de massas e Abordagem Proteômica

A espectrometria de massas (MS) abrange uma tecnologia imprescindível para a interpretação das informações codificadas pelos genes, ou seja, proteínas. O primeiro espectro de massas foi obtido em 1912 e o grande avanço da espectrometria de massas no campo biológico aconteceu somente a partir da década de 80, com o desenvolvimento de técnicas mais avançadas conhecidas como MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization) e ESI (Electrospray Ionization) (PALMA et al., 2010).

A análise proteômica é um conjunto de metodologias analíticas que são capazes de caracterizar qualitativamente e quantitativamente um proteoma, sendo uma área interdisciplinar da ciência, agrupando disciplinas como química, física, biologia e informática (CANTÚ et al., 2008; TYERS & MANN, 2003; AEBERSOLD & MANN, 2003). Toda essa junção de áreas e conhecimentos é extremamente necessária pois o objetivo é estudar a função e/ou comportamento dos genes com base na identificação das proteínas por eles expressas. Os dados de espectrometria de massas também são utilizados para informações relacionadas na identificação de peptídeos e proteínas a partir de banco de dados depositados (CANTÚ et al., 2008; TYERS & MANN, 2003; AEBERSOLD & MANN, 2003).

O instrumento conhecido como espectrômetro de massas é formado por sistema de injeção de amostra, fonte de íons, analisador de massas, detector e sistema de aquisição de dados. A técnica de espectrometria de massas determina a relação de massa e carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa (PALMA et al., 2010).

As fontes de ionização, como o próprio nome indica, possuem a função de ionizar suavemente, para preservar a estrutura polipeptídica, e transferir as moléculas a serem analisadas para fase gasosa. O analisador de massas separa os íons formados de acordo com sua relação m/z . Após esta separação, os íons

são detectados por eletromultiplicadores que constituem os detectores mais largamente usados, e então são isolados e submetidos à fragmentação por colisão com moléculas de gás inerte, como nitrogênio. Este espectro de fragmentação resultante é chamado de espectro de massas sequencial ou MS/MS (CANTÚ et al., 2008).

Finalmente, após todos esses processos, os resultados de massa molecular (MM) dos peptídeos, tanto quanto a relativa sequência de aminoácidos destes (MS/MS) podem ser pesquisados nos bancos de dados depositados nos softwares mais comumente utilizados, que são o Sequest (ENG et al., 1994) e o Mascot (PERKINS et al., 1999) (CANTÚ et al., 2008).

1.4. Abordagem Peptidômica

O peptidoma representa o conjunto inteiro de peptídeos naturais de um sistema de célula, tecido ou corpóreo, em um determinado prazo, sob uma específica condição fisiológica (AMADO et al., 2010). Estudos já demonstraram que o peptidoma vai além de uma simples junção de produtos da degradação de proteínas, podendo ser espécies ativas cruciais em muitos processos biológicos (VILLANUEVA et al., 2006; VILLANUEVA et al., 2006; AMADO et al., 2010), apesar de habitualmente o peptidoma ser considerado uma consequência de um desequilíbrio entre a atividade de proteases e a ação de inibidores destas (DOUCET et al., 2008; AMADO et al., 2010).

A metodologia de análise peptidômica foi introduzida por SCHULZ-KNAPPE et al., (2001), a fim de avançar nas limitações propostas pelas metodologias proteômicas convencionais baseadas em gel, para moléculas com tamanho inferior a 15000Da. Tendo em mente estes fatores, o peptidoma pode ser então considerado como uma ampliação do proteoma, estendendo-se aos menores valores de massa de todas as proteínas, independente da origem do peptídeo (AMADO et al., 2010).

Uma vez que a abordagem peptidômica vem crescendo, os avanços em instrumentos permitem uma rotina de sequenciamento e identificação de muitos peptídeos em várias amostras, como por exemplo fluídos corpóreos, tecidos e células (VILLANUEVA et al., 2005; AMADO et al., 2010); e com isso, o desenvolvimento de novas ferramentas médicas para diagnósticos ou até para desvendar a fisiopatologia de algumas doenças, estão se destacando. Um

exemplo importante dessas novas ferramentas é a possibilidade de descobrir um potencial peptídico biomarcador de doenças, como infecção ou câncer de tireóide (VILLANUEVA et al., 2006; AMADO et al., 2010), entre outras aplicabilidades.

1.5. Modelo Zebrafish (*Danio rerio*)

O controle sobre o uso de animais experimentais é crescente, e este assunto atrai a atenção de toda sociedade por ser um debate ético. Após os anos 70 surgem leis que se baseiam no princípio dos 3Rs da experimentação animal, que foram propostos por Russel e Burch em 1959, em busca de uma estratégia de abordagem em relação à experimentos envolvendo animais (SCHATZMAYR & MÜLLER, 2008).

Os 3Rs provém do inglês Replacement (Substituição), Reducement (Redução) e Refinement (Refinamento) do uso de animais em experimentos, e logo tornaram-se diretrizes para o controle destes em diversos países (SCHATZMAYR & MÜLLER, 2008). Para isso, métodos alternativos são considerados, sendo estes prioritários para diminuir a dor e o desconforto dos animais, reduzir seu número em trabalhos ou que substitua o uso de uma espécie animal por outra, de categoria inferior na escala zoológica, ou também por métodos computadorizados ou *in vitro*. Além disso, os animais selecionados para uso em protocolos experimentais devem ser de espécie e qualidade apropriada e com número mínimo para a obtenção de resultados válidos cientificamente (BONELLA, 2009).

Em 8 de Outubro de 2008, o Brasil sanciona uma lei federal que regulamenta a experimentação animal, a chamada Lei Arouca, que estabelece critérios na criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo território nacional. Esta lei visa proteger e equacionar o uso dos animais de laboratório, reconhecer os direitos e estatuto moral dos animais, sem atitudes radicais e desarmônicas de qualquer natureza, e ainda assim, não impedir o avanço do conhecimento e da pesquisa (CALDAS, 2009).

Estabelecer modelos efetivos de animais para estudos de interação patógeno-hospedeiro e busca de novos antifúngicos, é fundamental para o crescimento e desenvolvimento das pesquisas.

Os camundongos são modelos animais predominantes usados para pesquisa de *C. albicans*, entretanto, estes são difíceis de usar em estudo de

larga escala devido ao número limitado de descendentes produzidos e excessivo custo experimental. Logo, vários modelos invertebrados têm sido utilizados nas pesquisas, tais como *Galleria mellonella* (traça de cera), *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta) e o nematódeo *Caenorhabditis elegans* (ALARCO et al., 2004; COTTER et al., 2000; PUKKILA et al., 2009). Estes simples hospedeiros apresentam muitas vantagens, como imunidade inata conservada, sistemas bem desenvolvidos, e cuidados acessíveis, entre outros (MYLONAKIS et al., 2007). Por outro lado, o sistema imune destes animais possui maior diferença quando comparado com os mamíferos, particularmente a falta da imunidade adaptativa. As limitações destacam a necessidade de outros modelos para revelar o mecanismo complexo da patogênese fúngica (ZON & PETERSON, 2005).

O *Danio rerio*, popularmente conhecido como Zebrafish, peixe-paulistinha ou peixe-zebra, é uma espécie de peixe vertebrado teleósteo que pertence à família Cryprinidae. O nome Zebrafish é derivado das faixas que estão presentes no lado do seu corpo, sendo que ele tem cinco listras alternadas em azul-preto e prata-amarelo, contendo dois tipos de células de pigmentos, melanóforos e iridóforos, xantóforos e iridóforos, respectivamente (REED & JENNINGS, 2011). Os peixes machos possuem uma barriga amarelada e são mais magros do que as fêmeas, que são mais prateadas (BOPP et al., 2006; STAVELEY, 2015).

A utilização do Zebrafish como modelo experimental cresceu consideravelmente em poucas décadas. E levando em consideração os princípios dos 3Rs, como revisto pelo autor SNEDDON et al., (2017), Directive 2010/63/EU na proteção de animais utilizados para propostas científicas especificou que, o peixe torna-se um animal protegido uma vez que ele é capaz de alimentar-se independentemente, ou em aproximadamente 120 horas pós fertilização (hpf). Desta forma, de acordo com estes estudos e com DUCHARME et al., 2015, o uso de embriões e larvas de Zebrafish está de acordo por ser considerado um modelo alternativo em estágios embriônicos (HAMM, et al., 2019).

Este peixe, que anteriormente era criado apenas como ornamental, tem sido utilizado em diversos estudos, desde células tronco até as bases das mudanças comportamentais induzidas por vício em drogas. Essa rápida mudança se tornou possível devido a avanços em tecnologia, conjuntamente

com uma caracterização detalhada do animal em nível genético e molecular. Estes avanços permitiram o uso do Zebrafish como um vantajoso modelo experimental, a fim de buscar soluções para questões em biologia, doenças e genética humana. O Zebrafish apresenta rápida reprodução e fecundação externa, e tem sido muito utilizado em ensaios toxicológicos de novos fármacos devido à homologia genética e funcional com mamíferos (LEE & FREEMAN, 2014; RIZZO et al., 2013; LANTZ et al., 2014; CARLSSON et al., 2014).

O peixe é conhecido por ter alta fertilidade, o que o torna adequado para estudos de grande escala, e a fertilização ocorrer externamente (ZON & PETERSON, 2005; CHIN et al., 2016; BOPP et al., 2006). Quando os ovos não estão fertilizados, o crescimento é interrompido depois da primeira divisão de poucas células e aparecem mais turvos. Ovos fertilizados imediatamente tornam-se transparentes, o que faz este modelo animal muito utilizado na pesquisa (CHAO et al., 2010).

Em comparação aos outros animais, o Zebrafish possui a vantagem de usar técnicas menos invasivas, pois tanto o embrião quanto a larva são transparentes, facilitando procedimentos como manipulação genética ou tratamento farmacológico. Além disso, estas técnicas minimizam o sofrimento do animal e melhoram os resultados experimentais (CHIN et al., 2016).

Outra vantagem no uso deste embrião frente aos outros animais alternativos é a presença de imunidade inata e adaptativa, e mimetiza os mamíferos no contexto de anatomia, genética e fisiologia (MEEKER & TREDE, 2008; CHIN et al., 2016).

Além disso, o seu desenvolvimento é independente do peixe materno e acontece rapidamente, sendo que dentro de três dias, o embrião já se torna larva; são mantidos em água tratada especificamente com parâmetros de fácil manutenção, adequando o peixe para testes de alto rendimento (HERMSEN et al., 2011).

A larva do Zebrafish é considerada ideal para avaliar testes de atividade antifúngica *in vivo* bem como toxicidade em hospedeiros, por ser um vertebrado complexo comparado aos outros modelos alternativos, com sistemas de órgãos conservados e vias metabólicas (MACRAE & PETERSON, 2015; ROSOWSKI et al., 2018). Além disso, este animal oferece uma alternativa econômica aos estudos com mamíferos, excelentes ferramentas visuais e moleculares; mas

como qualquer modelo animal, ele também apresenta algumas limitações, porém quando utilizado da melhor maneira em que é aplicável, este modelo é capaz de responder muitas perguntas (ROSOWSKI et al., 2018).

Em embriões de Zebrafish, existem dois complexos diferentes de membranas, que são nomeadas como coriônica externa (zona radiata, conhecida como córion) e membrana plasmática interna (vitelina), e entre estas membranas, há um espaço perivitelino preenchido com líquido viscoso (KIMMEL & LAW, 1985; RAWSON et al., 2000).

O córion do embrião é um envelope acelular, altamente estruturado que envolve o ovo durante o desenvolvimento embrionário, funcionando como uma barreira ao ambiente externo (HART et al., 1984; HENN, 2011), com várias funções, como proteção mecânica (RIEHL, 1991; HENN, 2011), proteção contra microrganismos (HISAOKA, 1958; HENN, 2011), flutuabilidade funcional (PODOLSKY, 2002; HENN, 2011), entre outras. Esta barreira é composta principalmente de glicoproteínas e proteínas, em que compostos e outras moléculas passam através de canais de poros, que são parciais ou totalmente fechados, e parecem ser livremente permeáveis à água, eletrólitos e pequenas moléculas, dependendo da fase de desenvolvimento em que o embrião se encontra (COWARD et al., 2002, POTTS & EDDY, 1972; RAWSON et al., 2000; SCAPIGLIATI et al., 1994; YAMAGAMI et al., 1992; ZHANG & RAWSON, 1996; HENN & BRAUNBECK, 2011; BONSIGNORIO et al., 1996). As glicoproteínas possivelmente são responsáveis por prevenir a transferência de material aquoso para dentro e fora do embrião (LILICRAP, 2010; HENN, 2011).

Desta forma, dependendo do estágio embrionário, o córion apresenta diferenças na sua permeabilidade, sendo maior conforme seu crescimento e também ficando mais sensível aos compostos em fases posteriores. No estágio de clivagem inicial (entre 1 e 2 hpf), a permeabilidade começa a aumentar e o fechamento do blastóporo (entre 2 e 4 hpf) é observado, com permeabilidade máxima durante a epibolia (entre 5 e 10 hpf) (HARVEY et al., 1983; ADAMS et al., 2005; HERRMANN, 1993).

Zebrafish é utilizado em pesquisa biomédica devido à facilidade em experimentação manual e administração de drogas. Além disso, essa transparência ótica dos embriões permite a visualização em tempo real das interações patógeno-hospedeiro (CHEN et al., 2015).

Recentemente, o Zebrafish tem sido utilizado em genética, na descoberta de drogas, otimização de compostos, toxicologia e estudo de segurança de medicamentos (KAWAHARA & KUNKEL, 2013; SANTORIELLO & ZON, 2012); seus genes são homólogos aos genes humanos em aproximadamente 70%, e parcialmente em sequência de proteínas (HOWE et al., 2013; SORAYA et al., 2013). Além disso, o Zebrafish possui similaridade com sistemas nervoso e cardiovascular, fígado, pâncreas, intestino, vesícula biliar e algumas vias metabólicas de mamíferos; este animal apresenta citocromo p450, enzimas e receptores nucleares (CHEN & ZENG, 2011) similares aos mamíferos. Portanto, é uma espécie que tem sido usada como modelo para estudos de farmacologia e toxicologia (JURCZYK et al., 2011; LI et al., 2010).

Em relação a ensaio de infecção, CHAO et al. (2010) demonstraram que *C. albicans* coloniza e invade o Zebrafish em múltiplos sítios anatômicos, causando mortalidade depois de ser injetada no interior das cavidades peritoniais de peixe adulto ou no saco vitelino de embriões.

Nos últimos anos, indústrias farmacêuticas têm adotado testes em embriões de Zebrafish com a finalidade de identificar potenciais efeitos adversos de compostos em desenvolvimento, pelo fato de apresentarem baixo custo e rápida resposta aos experimentos (RÁLDUA & PIÑA, 2014).

Devido à urgência na busca de novos medicamentos sem teratogenicidade para tratamento de infecções fúngicas, este trabalho baseou-se no estudo de peptídeos de três grupos de animais, sendo o primeiro composto por peptídeos oriundos de veneno de vespa previamente engenheirados, o segundo análogos de Moricin C3 derivado da hemolinfa de *Galleria mellonella* infectada com *C. albicans*, e por último, peptídeos análogos de IsCT, oriundos do veneno de escorpião, todos modificados baseando-se em estudos estruturais.

2. CONCLUSÕES

Os peptídeos apresentados neste trabalho foram avaliados estruturalmente e modificados quanto às suas respectivas sequências peptídicas, objetivando um composto antifúngico eficaz e seguro. Sendo assim, foram testados frente atividade anti-*Candida albicans*, toxicidade e teratogenicidade em embriões de Zebrafish, citotoxicidade em linhagem celular

HaCaT, permeação ao córion, sinergismo, possível efeito de dano de membrana e eficácia *in vivo*. A tabela 8, apresenta um resumo dos resultados obtidos para os principais testes realizados.

Tabela 8. Principais resultados obtidos para os peptídeos avaliados: Massa Molecular (MM), Sequência dos aminoácidos, número de Lisina (K), carga líquida (Q), concentração inibitória mínima (CIM), concentração fungicida mínima (CFM), concentração letal 50% (CL50), concentração inibitória 50% (CI50) e índice de seletividade (IS).

Peptídeo	MM	Sequência	K	Q	CIM/CFM µg/mL	Zebrafish CL50	HaCaT CI50	IS
MK5789	1641,12	INWLKIKKKVAGML-NH ₂	4	+5	62,5	15,62	>500	>8
MK58911	1641,12	INWLKIAKKVKGML-NH ₂	4	+5	15,62	13,02	500-250	32-16
MK4589	1599,04	INWKKIAKKVAGML-NH ₂	4	+5	15,62	9,64	500-250	32-16
PepM1	1408,96	GAIKKGGKIIKKGL-NH ₂	5	+6	>250	250	-	-
PepM2	3599,20	IGAIKGGKIIKKGLGVIGAA GTAHEVYSHVKNRQ-NH ₂	6	+7	250	62,5	>500	>2
PepM3	1515,02	ILGKIAEGIKSLFK-NH ₂	3	+3	125	125	500-250	4 - 2
PepM4	1333,60	KIWKGIKSLFD-NH ₂	3	+3	>250	> 250	-	-

- Os melhores resultados para atividade anticandida foram MK5789, MK58911 e MK4589, com mesmo número de resíduos de Lisina e carga líquida, diferindo em seus posicionamentos;

- MK5789 apresentou-se menos tóxico devido a permanência de 50% dos embriões vivos mesmo tendo permeabilidade total pelo córion, quando comparado aos demais, que nas mesmas condições, demonstraram permeação parcial pelo córion com 100% de mortalidade dos embriões;

- PepM1 apresentou CIM > 250 µg/mL sem efeitos tóxicos e teratogênicos;

- PepM2 apresentou CIM = 125 µg/mL, não – teratogênico, porém apresentou toxicidade nos embriões e mostrou ser mais seletivo para membranas de mamíferos do que microbianas, verificado pelo IS baixo;
- PepM4 apresentou CIM > 250 µg/mL, no entanto, apresentou aproximadamente 80% de sobrevivência dos embriões na concentração mais alta;
- PepM3 apresentou resultados satisfatórios com CIM para *C. albicans*, sem efeitos tóxicos, teratogênicos e com viabilidade celular alta para HaCaT;
- PepM3 demonstrou efeito sinérgico com Anfotericina B, e sugeriu ser um peptídeo que ocasiona dano de membrana fúngica;
- A infecção por imersão e ensaio de eficácia *in vivo* em embriões de Zebrafish foi padronizada;
- A avaliação de modificações estruturais se torna essencial para o desenvolvimento de novos agentes com potencial efeito contra patógenos fúngicos, e com redução de efeitos tóxicos e teratogenicidade;
- PepM3 pode ser um potencial candidato para estes estudos estruturais objetivando melhora de eficácia e segurança.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHKAR, J.M.; FRIES, B.C. Candida infections of the genitourinary tract. **Clin Microbiol Rev**, v. 23, p. 253–73, 2010.
- ADAMS, S.L., ZHANG, T., RAWSON, D.M. The effect of external medium composition on membrane water permeability of Zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v. 64, p.1591-1602, 2005.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. **Nature**, v. 422, p.198-207, 2003.
- AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170, p. 211–224, 1994.
- AKLE, V.; AGUDELO-DUENAS, N.; MOLINA-RODRIGUEZ, M.A.; KARTCHNER, L.B.; RUTH, A.M.; GONZALEZ, J.M.; FORERO-SHELTON, M. Establishment of Larval Zebrafish as an Animal Model to Investigate Trypanosoma cruzi Motility In Vivo. **J. Vis. Exp**, v. 127, 2017.
- ALARCO, A. M.; MARCIL, A.; CHEN, J.; SUTER, B.; THOMAS, D.; WHITEWAY, M. Immune-deficient *Drosophila melanogaster*: a model for the innate. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 9, p. 5622-5628, 2004.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 5th. ed. New York: Garland science, 2008. p.1268.
- ALGARIHI, A.; SINGH, S.; EDWARDS JR. J.E.; IBRAHIM, A.S.; UPPULURI, P. NDV-3A vaccination prevents *C. albicans* colonization of jugular vein catheters in mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 6194, 2019.
- AMADO, F.; LOBO, M.J.C.; DOMINGUES, P.; DUARTE, J.A.; VITORINO, R. Salivary peptidomics. Expert Rev. **Proteomics**, v. 7, n.5, p. 709–721, 2010.
- ANDERSON, J.M.; MIHALIK, R.; SOLL, D.R. Ultrastructure and antigenicity of the unique cell and pimple of the *Candida albicans* opaque phenotype. **J. Bacteriol**, v. 172, n.1, p. 224–235, 1990.
- BARBEDO, L.S.; SGARBI, D.B.G. Candidíase. **DST - J Bras Doenças Sex Transm**, v. 22, n.1, p. 22-38, 2010.

BARRIBEAU, S. M.; SADD, B.; DU PLESSIS, L.; SCHMID-HEMPEL, P. Gene expression differences underlying genotype-by-genotype specificity in a host-parasite system. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 111, p. 3496-3501, 2014.

BEA, R.S.; PETRAGLIA, A.F., ASCUITTO, M.R., BUCK, Q.M. Antibacterial Activity and Toxicity of Analogs of Scorpion Venom IsCT Peptides. **Antibiotics**, v. 6, n. 3, p. 13, 2017.

BECHINGER, B. The structure, dynamics, and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1462, p. 157–183, 1999.

BELOKONEVA, O.S.; VILLEGAS, E.; CORZO, G.; DAI, L.; NAKAJIMA, T. The hemolytic activity of six arachnid cationic peptides is affected by the phosphatidylcholine-to-sphingomyelin ratio in lipid bilayers. **Biochim. Biophys. Acta Biomembr.**, v. 1617, p. 22–30, 2003.

BERGIN, D.; MURPHY, L.; KEENAN, J.; CLYNES, M.; KAVANAGH, K. Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 2105-2112, 2006.

BERMAN, J.; SUDBERY, P.E. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nat. Rev. Genet.**, v. 3, p. 918–930, 2002.

BLAXTER, J.H.S. Pattern and Variety in Development. *In*: HOAR, W.S., RANDALL, D.J. (Eds.). **Fish Physiology**. London: Academic Press, 1988. p. 1-58. (v. 11: The Physiology of Developing Fish. Part A: Eggs and Larvae.).

BONELLA, A.E. Animais em laboratórios e a lei Arouca. **Scienti & studia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 507-14, 2009.

BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R.O.; DENNING, D.W. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. **J. Fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.

BONHOMME, J.; D'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. **Current opinion in microbiology**, v. 16, n. 4, p. 398-403, 2013.

BONSIGNORIO, D.; PEREGO, L.; DEL GIACCO, L.; COTELLI, F. Structure and macromolecular composition of the Zebrafish egg chorion. **Zygote**, v. 4, p. 101-108, 1996.

BOPP, S. K.; MINUZZO, M.; LETTIERI, T. **The Zebrafish (*Danio rerio*): an Emerging model organism in the environmental field.** Luxembourg: European Commission, Joint Research Centre. 2006.

BOSHRA, H.; LI, J.; SUNYER, J.O. Recent advances on the complement system of teleost fish. **Fish Shellfish Immunol**, v. 20, p. 239–262, 2006.

BROGDEN, N.K.; BROGDEN, K.A. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 38, p. 217-225, 2011.

BROGDEN, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat. Rev., Microbiol.**, v. 3, p. 238-250, 2005.

BRÖTZ, H.; BIERBAUM, G.; LEOPOLD, K.; REYNOLDS, P.E.; SAHL, H.G. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, p.154–160, 1998.

BROWN, G.D.; DENNING, D.W.; GOW, N.A.R.; LEVITZ, S.M.; NETEA, M.G.; WHITE, T.C. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Sci. Transl. Med**,v. 4, p. 1–9, 2012.

BROWN, S.E.; HOWARD, A.; KASPRZAK, A.B.; GORDON, K.H.; EAST, P.D. The discovery and analysis of a diverged family of novel antifungal moricin-like peptides in the wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Biochem. Mol. Biol**, v.38, p. 201–212, 2008.

BROWN, S.E.; HOWARD, A.; KASPRZAK, A.B.; GORDON, K.H.; EAST, P.D. A peptidomic study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Biochem. Mol. Biol**, v. 39, p. 792–800, 2009.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function, **Dev. Comp. Immunol**, v. 23, p. 329-344, 1999.

BULET, P.; STOCKLIN, R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. **Protein Pept. Lett**, v.12, p. 3–11, 2005.

BUSQUET, F. et al. OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the Zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 69, n. 3, p. 496-511, Aug 2014.

CALDAS, C. Experimentação animal. **Cienc. Cult**, v. 61, n.1, 2009, São Paulo.

CALDERONE, A. R.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*.

Trends in microbiology, v. 9, n. 7, p. 327-335, 2001.

CANTÚ, M.D.; CARRILHO, E.; WULFF, N.A.; PALMA, M.S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Quim. Nova**, vol. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.

CARLSSON, G.; NORRGREN, L.; HYLLAND, K.; TOLLEFSEN, K.E. Toxicity screening of produced water extracts in a Zebrafish embryo assay. **J Toxicol Environ Health A**, v. 77, n. 9-11, p. 600-15, Apr 2014.

CARVALHO, L.A.C.; MACHINI, M.T. HEMOCIDINAS DERIVADAS DA HEMOGLOBINA: ESTRUTURAS, PROPRIEDADES E PERSPECTIVAS. **Quim. Nova**, v. 36, n. 7, p. 1021-1029, 2013.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L.A. The damage-response framework of microbial pathogenesis. **Nat Rev Microbiol**, v. 1, n.17, p.24, 2003.

CHAFFIN, W.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J.P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function, and expression. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, v. 62, p. 130–180, 1998.

CHAN, D.I.; PRENNER, E.J.; VOGEL, H.J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1758, p. 1184–1202, 2006.

CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; HOYE, R. L.L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M.A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J Bacteriol**, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, Sep 2001.

CHAO, C.C.; HSU, P.C.; JEN, C.F.; CHEN, I.H.; WANG, C.H.; CHAN, H.C.; TSAI, P.W.; TUNG, K.C.; WANG, C.H.; LAN, C.Y.; CHUANG, Y.J. Zebrafish as a model host for *Candida albicans* infection. **Infect Immun**, v. 78, p. 2512–2521, 2010.

CHEN, Y.; GUARNIERI, M.T.; VASIL, A.I.; VASIL, M.L.; MANT, C.T.; HODGES, R.S. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 51, p. 1398–1406, 2007.

CHEN, Q.X.; ZENG, S. Research progress of Zebrafish used in drug metabolism. **Acta pharm Sin.** v. 46, p. 1026–1031. 2011.

CHEN, Y.Z.; YANG, Y.L.; CHU, W.L.; YOU, M.S.; LO, H.J. Zebrafish egg infection model for studying *Candida albicans* adhesion factors. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, 2015.

CHENG, M.F.; YU, K.W.; TANG, R.B.; FAN, Y.H.; YANG, Y.L.; HSIEH, K.S.; HO, M.; LO, H.J. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia from 1996 to 1999. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v. 48, p. 33–37, 2004.

CHIN, V.K.; LEE, T.Y.; RUSLIZA, B.; CHONG, P.P. Dissecting *Candida albicans* infection from the perspective of *C. albicans* virulence and omics approaches on host-pathogen interaction: a review. **Int. J. Mol. Sci**, v. 17, p. 1643, 2016.

CHOI, H.; LEE, D.G. Antifungal activity and pore-forming mechanism of astacidin 1 against *Candida albicans*. **Biochimie**, v. 105, p. 58-63, 2014.

CHRISTENSEN, L. D.; MOSER, C.; JENSEN, P. O.; RASMUSSEN, T. B.; CHRISTOPHERSEN, L.; KJELLEBERG, S.; KUMAR, N.; HOIBY, N.; GIVSKOV, M.; BJARNSHOLT, T. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on biofilm persistence in an in vivo intraperitoneal foreign-body infection model. **Microbiology**, v. 153, n. 7, p. 2312-2320, 2007.

CLSI. **Reference Method For Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**; Approved Standard. 3rd. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. (CLSI document M27-A3). ISBN-1-56238-666-2.

COLOMBO, A.L. Contribuições para o entendimento da epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. e para sua abordagem terapêutica. Tese para obtenção do título de livre-docência apresentada a Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.

COLOMBO, A.L.; GUIMARAES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 36, n. 5, 2003.

COLOMBO, A.L.; GUIMARAES, T.; SILVA, L.R.B.F.; MONFARDINI, L.P.A.; CUNHA, A.K.B.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R.C. Prospective Observational Study of Candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence Rate, Epidemiology, and Predictors of Mortality. **Infection control and hospital epidemiology**, v. 28, n. 5, 2007.

COSTA, A.C.; PEREIRA, C.A.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis. **Virulence**, v. 4, p. 391–399, 2013.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES T.; CAMARGO, L.F.A.; RICHTMANNC, R.;P QUEIROZ-TELLES, F.; SALLESE, M.J.C.; DA CUNHA, C.A.; YASUDAG, M.A.S.; MORETTI, M.L.; NUCCI, M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, **Braz J Infect Dis**, v. 17, n. 3, p.283–312, 2013.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPINSCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annu Rev Microbiol**, v. 49, p. 711-745, Oct 1995.

COTTER, G.; DOYLE, S.; KAVANAGH, K. Development of an insect model for the *in vivo* pathogenicity testing of yeasts. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v. 27, p.163–169. 2000.

COWARD, K.; BROMAGE, N.K.; HIBBIT, O.; PARRINGTON, J. Gamete physiology, fertilization and activation in teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 12, p. 33-58, 2002.

CRETON, R. The calcium pump of the endoplasmic reticulum plays a role in midline signaling during early Zebrafish development. **Developmental Brain Research**, v. 151, p. 33- 41, 2004.

CYTRYNSKA, M.; MAK, P.; ZDYBICKA-BARABAS, A.; SUDER, P.; JAKUBOWICZ, T. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. **Peptides**, v. 28, p. 533–546, 2007.

CZAPLEWSKI, L.; BAX, R.; CLOKIE, M.; DAWSON, M.; FAIRHEAD, H.; FISCHETTI, V.A.; FOSTER, S.; GILMORE, B.F.; HANCOCK, R.E.W.; HARPER, D.; HENDERSON, I.R.; HILPERT, K.; JONES, B.V.; KADIOGLU, A.; KNOWLES, D.; OLAFSDÓTTIR, S.; PAYNE, D.; PROJAN, S.; SHAUNAK, S.; SILVERMAN, J.; THOMAS, C.M.; TRUST, T.J.; WARN, P.; REX, J.H. Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. **Lancet Infect.Dis**, v. 16, p. 239–251, 2016.

DA MATTA, D.A.; SOUZA, A.C.R.; COLOMBRO, A.L. Revisiting Species Distribution and Antifungal Susceptibility of Candida Bloodstream Isolates from Latin American Medical Centers. **J. Fungi**, v. 3, p. 24, 2017.

DA SILVA, A.V.R.; DE SOUZA, B. M.; DOS SANTOS CABRERA, M.P.; DIAS, N. B.; GOMES, P.C.; STABELI, R.G.; NETO, J.R.; PALMA, M.S. The effects of the C-terminal amidation of mastoparans on their biological actions and interactions with membrane-mimetic systems. **Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes**, v. 1838, p. 2357-2368, 2014.

DAI, L.; YASUDA, A.; NAOKI, H.; CORZO, G.; ANDRIANTSIFERANA, M.; NAKAJIMA, T. IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 286, p. 820–825, 2001.

DAI, L.; CORZO, G.; NAOKI, H.; ANDRIANTSIFERANA, M.; NAKAJIMA, T. Purification, structure–function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 293, p. 1514–1522, 2002.

DAI, H.; RAYAPROLU, S.; GONG, Y.; HUANG, R.; PRAKASH, O.; JIANG, H. Solution structure, antibacterial activity, and expression profile of *Manduca sexta* moricin. **J Pept Sci Off Publ Eur Pept Soc**, v. 14, p.855– 863, 2008.

DATHE, M.; WIPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1462, p. 71–78, 1999.

DATHE, M.; MEYER, J.; BEYERMANN, M.; MAUL, B.; HOISCHEN, C.; BIERNET, M. General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. **Biochim Biophys Acta**, v. 1558, p.171–186, 2002.

DEMUYSER, L.; JABRA-RIZK, M.; VAN DIJCK, P. Microbial cell surface proteins and secreted metabolites involved in multispecies biofilms. **Pathogens and disease**, v. 70, n. 3, p. 219-230, 2014.

DENNISON, S.R.; WALLACE, J.; HARRIS, F.; PHOENIX, D.A. Amphiphilic alpha-helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships, **Protein Pept. Lett.** v. 12, p. 31-39, 2005.

DE SOUZA, B.M.; SILVA, A.V.R.; RESENDE, V.M.F.; ARCURI, H.A.; DOS SANTOS, M.P.C.; RUGGIERO NETO, J.; PALMA, M.S. Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v. 30, p.1387–1395, 2009.

DE SOUZA, B.M.; DOS SANTOS CABRERA, M.P.; RUGGIERO-NETO, J.; PALMA, M.S. Investigating the effect of different positioning of lysine residues along the peptide chain of mastoparans for their secondary structures and biological activities. **Amino Acids**, v. 40, p. 77–90, 2011.

DE SOUZA, B.M.; DOS SANTOS CABRERA, M.P.; GOMES, P.C.; DIAS, N.B.; STABELI, R.G.; LEITE, N.B.; NETO, J.R.; PALMA, M.S. Structure–activity relationship of mastoparan analogs: Effects of the number and positioning of Lys residues on secondary structure, interaction with membrane-mimetic systems and biological activity. **Peptides**, v. 72, p. 164–174, 2015.

DIGNANI, M.C.; SOLOMKIN, J.S.; ANAISSIE, E. *CANDIDA*. In: ANAISSIE, E.; MCGINNIS, M.R.; PFALLER, M.A, (editors). **Medical mycology**. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone, 2003. p. 195–239.

DOBSON, A. J.; PURVES, J.; KAMYSZ, W.; ROLFF, J. Comparing Selection on *S. aureus* between antimicrobial peptides and common antibiotics. **PloS One**, v. 8, p. 76521, 2013.

DONLAN, R.M. Biofilms and device-associated infections. **Emerg Infect Dis**, v. 7, p. 277–281, 2001.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, v.15, p. 167–193, 2002.

DOS SANTOS CABRERA, M.P.; DE SOUZA, B.M.; FONTANA, R.; KONNO, K.; PALMA, M.S.; DE AZEVEDO JR, W.F. Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. **J Pept Res**, v. 64, p. 95–103, 2004.

DOUCET, A.; BUTLER, G.S.; RODRIGUEZ, D.; PRUDOVA, A.; OVERALL, C.M. Metadegradomics: toward in vivo quantitative degradomics of proteolytic post-translational modifications of the cancer proteome. **Mol. Cell Proteomics**, v. 7, n. 10, p.1925–1951 2008.

DUCHARME, N. A.; REIF, D. M.; GUSTAFSSON, J. A.; BONDESSON, M. Comparison of toxicity values across Zebrafish early life stages and mammalian studies: Implications for chemical testing. **Reprod Toxicol**, v. 55, p. 3-10.doi:10.1016/j.reprotox.2014.09.005, 2015.

EBENHAN, T.; GHEYSENS, O.; KRUGER, H.G.; ZEEVAART, J.R.; SATHEKGE, M. M. Antimicrobial peptides: their role as infection-selective

tracers for molecular imaging. **Bio Med Res. Int**, v. 2014, Article ID 867381, 15 p. 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/867381>.

EHRENSTEIN, G.; LECAR, H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. **Q. Rev. Biophys**, v. 10, p. 1-34, 1977.

ENG, J. K.; MCCORMACK, A. L.; YATES, J. R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. **J. Am. Soc. Mass. Spectrom**, v. 5, n. 11, p. 976-989, 1994.

FALICO, D.A.; CASTRO, M.S. **Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps***. Dissertação (Mestrado) - Fundação Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas. Brasília, DF, 2014.

FARUCK, M.O.; YUSOF, F.; CHOWDHURY, S. An overview of antifungal peptides derived from insect. **Peptides**, v. 80, p. 80–88, 2016.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M.; **Science**, v. 246, p. 64, 1989.

FERRANDON, D., IMLER, J.-L., HETRU, C., HOFFMANN, J.A. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. **Nat. Rev. Immunol**, v. 7, p. 862–874, 2007.

FJELL, C.D.; HISS, J.A.; HANCOCK, R.E.; SCHNEIDER, G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nat.Rev.DrugDiscov**, v. 11, p.37–51, 2012.

FUAD, N.M.; KASLIN, J.; WLODKOWIC, D. Development of chorion-less Zebrafish embryos in millifluidic living embryo arrays. **Biomicrofluidics**, v. 11, n. 5, 051101, doi: 10.1063/1.5001848, 2017.

GAUWERKY, K.; BORELLI, C.; KORTING, H.C. Targeting virulence: A new paradigm for antifungals. **Drug Discov. Today**, v. 14, p. 214–222, 2009.

GEIGER, J.; WESSELS, D.; LOCKHART, S.R.; SOLL, D.R. Release of a potent polymorphonuclear leukocyte chemoattractant is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. **Infect. Immun**, v. 72, p. 667–677, 2004.

GILBERT, S.F. Developmental biology, 6th ed. Sinauer Associates, Inc, 2000.

GIRALDO, P.; WATKIN, S. Vaginal candidiasis: an incomprehensible challenge. **J Bras Dis Sex Transm**, v. 10, p.31–36, 1998.

GIULIANI, A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, S. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. **Cent. Eur. J. Biol.** v. 2, p. 1–33, 2007.

GORAYA, J.; KNOOP, F. C.; CONLON, J. M. Ranatuerins: antimicrobial peptides isolated from the skin of the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 250, n.3, p. 589-592, 1998.

GRATACAP, R.L.; RAWLS, J.F.; WHEELER, R.T. Mucosal candidiasis elicits NF-kappaB activation, proinflammatory gene expression and localized neutrophilia in Zebrafish. **Dis model & mech**, v. 6, p. 1260–1270, 2013.

GRATACAP, R.L.; SCHERER, A.K.; SEMAN, B.G.; WHEELER, R.T. Control of mucosal candidiasis in the Zebrafish swim bladder depends on neutrophils that block filament invasion and drive extracellular-trap production. **Infect Immun**, v. 85, n. 9, 2017.

GRATACAP, R.L.; WHEELER, R.T. Utilization of Zebrafish for intravital study of eukaryotic pathogen-host interactions. **Dev. Comp. Immunol**, v. 46, p. 108–115, 2014.

GUDLAUGSSON, O.; GILLESPIE, S.; LEE, K.; et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. **Clin Infect Dis**, v. 37, p. 1172-1177, 2003.

GULLO, F.P.; SARDI, J.C.; SANTOS, V.A.; SANGALLI-LEITE, F.; PITANGUI, N.S.; ROSSI, S.A.; DE PAULA E SILVA, A.C.; SOARES, L.A.; SILVA, J.F.; OLIVEIRA, H.C.; FURLAN, M.; SILVA, D.H.; BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.; FUSCO-ALMEIDA, A.M. Antifungal activity of maytenin and pristimerin. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, Article ID 340787, 6 pages.

Doi:10.1155/2012/340787.

HAINÉ, E. R.; MORET, Y.; SIVA-JOTHY, M. T.; ROLFF, J. Antimicrobial defense and persistent infection in insects. **Science**, v. 322, p. 1257-1259, 2008.

HAMM, J.T.; CEGER, P.; ALLEN, D.; STOUT, M.; MAULL, E.A.; BAKER, G.; ZMAROWSKI, A.; PADILLA, S.; PERKINS, E.; PLANCHART, A.; STEDMAN, D.; TAL, T.; TANGUAY, R.L.; VOLZ, D.C.; WILBANKS, M.S.; WALKER, N.J. Characterizing Sources of Variability in Zebrafish Embryo Screening Protocols. **ALTEX**, v. 36, n.1, p. 103-120, 2019.

HANCOCK, R.E.; PATRZYKAT, A. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. **Curr. Drug Targets Infect Disord**, v. 2, p. 79-83, 2002.

HANCOCK, R. E.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nat. Biotechnol.** v. 24, p. 1551–1557, 2006.

HART, N.H.; PIETRI, R.; DONOVAN, M. The structure of the chorion and associated surface filaments in *Oryzias*--evidence for the presence of extracellular tubules. **Journal of Experimental Zoology**, v. 230, p. 273-296, 1984.

HARVEY, A.L. Toxins and drug discovery. **Toxicon**, v. 92, p. 193–200, 2014.

HARVEY, B.; KELLEY, R.N.; ASHWOOD-SMITH, M.J. Permeability of intact and dechorionated zebra fish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide. **Cryobiology**, v, 20, p. 432-439, 1983.

HAWSER, S.P.; BAILLIE, G.S.; DOUGLAS, L.J. Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. **J Med Microbiol**, v. 47, p. 253–256, 1998.

HEMMI, H.; ISHIBASHI, J.; HARA, S.; YAMAKAWA, M. Solution structure of moricin, an antibacterial peptide, isolated from the silkworm *Bombyx mori*. **FEBS Lett**, v. 518, p. 33–38, 2002.

HENN, K. **Limits of the fish embryo toxicity test with *Danio rerio* as an alternative to the acute fish toxicity test.** Dissertation of Doctor (Doctor of Natural Sciences) - Combined Faculties for the Natural Sciences and for Mathematics of the Ruperto-Carola University of Heidelberg. Heidelberg: Germany. 2011.

HENN, K.; BRAUNBECK, T. Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the Zebrafish (*Danio rerio*). **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol**, v. 153C, n. 1, p. 91-98, 2011.

HERMSEN, S.A.B.; VAN DEN BRANDHOF, E.J.; VAN DER VEN, L.T.M.; PIERSMA, A.H. Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified Zebrafish embryotoxicity test and comparison with their *in vivo* potencies. **Toxicology in vitro**, v. 25, p. 745–753, 2011.

HERRMANN, K. Effects of the anticonvulsant drug Valproic Acid and related substances on the early development of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*). **Toxicology in Vitro**, v. 7, p. 41-54, 1993.

HIGASHIJIMA, T.; UZU, S.; NAKAJIMA, T.; ROSS, E. M. Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). **J. Biol. Chem**, v. 263, p. 6491–6494, 1988.

HILL, A.J.; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R.E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicol. Sci**, v. 86, p. 6–19, 2005.

HISAOKA, K.K. Microscopic Studies of the Teleost Chorion. **Trans Am Microsc Soc**, v. 77, N. 3, P. 240-243, 1958. <https://www.jstor.org/stable/3223685>.

HOWE, K.; CLARK, M.D.; TORROJA, C.F.; TORRANCE, J.; BERTHELOT, C.; MUFFATO, M. et al. The Zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p. 498–503, 2013.

HOYLE, B.D.; JASS, J.; COSTERTON, J.W. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. **J Antimicrob Chemother**, v. 26, p. 1–5, 1990.

ILKIT, M.; GUZEL, A.B. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. **Crit Rev Microbiol**, v. 37, p. 250–261, 2011.

JABRA-RIZK, M.A.; KONG, E.F.; TSUI, C.; NGUYEN, M.H.; CLANCY, C.J.; FIDEL JR, P.L.; NOVERR, M. *Candida albicans* pathogenesis: fitting within the host-microbe damage response framework. **Infect Immun**, v. 84, p. 2724–2739, 2016.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. Peptide antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev**, v. 19, p. 491–511, 2006.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B.L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v. 211, p. 213–236, 2006.

JOHNSON N.W. The mouth in HIV/AIDS: markers of disease status and management challenges for the dental profession. **Aust Dent J**, v. 55 Suppl. 1:85–102, 2010.

JURCZYK, A.; ROY, N.; BAJWA, R.; GUT, P.; LIPSON, K.; YANG, C.; COVASSIN, L.; RACKI, W.J.; ROSSINI, A.A.; PHILLIPS, N.; STAINIER, D.Y.R.; GREINER, D.L.; BREHM, M.A.; BORTELL, R.; DILORIO, P. Dynamic glucoregulation and mammalian like responses to metabolic and developmental disruption in Zebrafish. **Gen Comp Endocrinol**. v. 170, p. 334–345, 2011.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F.; **Anal. Chem**, v. 60, p. 2299, 1988.

KATAYAMA, H.; OHIRA, T.; AINDA, K.; NAGASAWA, H. Significance of a carboxyl-terminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone. **Peptides**, v. 23, n. 9, p. 1537-1546, 2002.

KATSU, T.; KUROKO, M.; MORIKAWA, T.; SANCHIKA, K.; YAMANAKA, H.; SHIMODA, S.; FUJITA, Y. Interaction of wasp venom mastoparan with biomembranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1027, p. 185–190, 1990.

KAWAHARA, G.; KUNKEL, L.M. Zebrafish based small molecule screens for novel DMD drugs. **Drug Discov Today Technol**, v. 10, p. 91–96, 2013.

KENNEDY, M.A.; SOBEL, J.D. Vulvovaginal candidiasis caused by non-albicans *Candida* species: new insights. **Curr Infect Dis Rep**, v. 12, p.465–70, 2010.

KHARA, J. S.; LIM, F. K.; WANG, Y.; KE, X.-Y.; VOO, Z. X.; YANG, Y. Y.; EE, P. L. R. Designing α -helical peptides with enhanced synergism and selectivity against *Mycobacterium smegmatis* : Discerning the role of hydrophobicity and helicity. **Acta Biomater**, v. 28, p. 99–108, 2015.

KIM, C.H.; LEE, J.H.; KIM, I.; SEO, S.J.; SON, S.M.; LEE, K.Y. Purification and cDNA cloning of a cecropin-like peptide from the great wax moth, *Galleria mellonella*. **Mol. Cells**, v. 17, p. 262–266, 2004.

KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **The journal of microbiology**, v. 49, n. 2, p. 171-177, 2011.

KIM, H.; JANG, J.H.; KIM, S.C.; CHO, J.H. De novo generation of short antimicrobial peptides with enhanced stability and cell specificity. **J Antimicrob Chemother**, v. 69, n. 1, p. 121–132, 2014.

KIMMEL, C.B.; LAW, R.D. Cell lineage of Zebrafish blastomeres. **Developmental Biology**, v. 108, p. 86-93, 1985.

KUCHARIKOVA, S.; SHARMA, N.; SPRIET, I.; MAERTENS, J.; VAN DIJCK, P.; LAGROU, K. Activities of systemically administered echinocandins against in vivo mature *Candida albicans* biofilms developed in a rat subcutaneous model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2365-2368, 2013.

KUCHARIKOVA, S.; TOURNU, H.; LAGROU, K.; VAN DIJCK, P.; BUJDAKOVA, H. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. **Journal of medical microbiology**, v. 60, n. 9, p. 1261-1269, 2011.

KUO, Z.Y.; CHUANG, Y.J.; CHAO, C.C.; LIU, F.C.; LAN, C.Y.; CHEN, B.S. Identification of infection-and defense-related genes via a dynamic host-

pathogen interaction network using a *Candida albicans*-Zebrafish infection model. **Journal of innate immunity**, v. 5, n. 2, p. 137-152, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680, 1970.

LAFLEUR, M. D.; KUMAMOTO, C. A.; LEWIS, K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3839-3846, 2006.

LANTZ, M.S.; GUO, X.; CUEVAS, E.; DUMAS, M.; NEWPORT, G.D.; ALI, S.F.; PAULE, M.G.; KANUNGO, J. Developmental toxicity assay using high content screening of Zebrafish embryos. **J Appl Toxicol**, v. 35, n. 3, p. 261-272, May 2014.

LASS-FLÖRL, C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. **Mycoses**, v. 52, p. 197–205, 2009.

LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochem. Mol. Biol.** v. 32, p. 1295–1309, 2002.

LECLERC, V.; REICHHART, J.M. The immune response of *Drosophila melanogaster*. **Immunol. Rev.** v. 198, p. 59–71, 2004.

LEE, J.; FREEMAN, J.L. Zebrafish as a model for investigating developmental lead (Pb) neurotoxicity as a risk factor in adult neurodegenerative disease: a mini-review. **Neurotoxicology**, v. 43, p. 57-64, Jul 2014.

LEE, K.; SHIN, S.Y.; KIM, K.; LIM, S.S.; HAHM, K.S.; KIM, Y. Antibiotic activity and structural analysis of the scorpion-derived antimicrobial peptide IsCT and its analogs. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 323, p. 712–719, 2004.

LEE, Y.S.; YUN, E.K.; JANG, W.S.; KIM, I.; LEE, J.H.; PARK, S.Y.; RYU, K.S.; SEO, S.J.; KIM, C.H.; LEE, I.H. Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. **Insect Mol. Biol**, v. 13, p. 65–72, 2004.

LEITCH, E. C.; WILLCOX, M. D. Lactoferrin increases the susceptibility of *S. epidermidis* biofilms to lysozyme and vancomycin. **Curr Eye Res**, v. 19, n. 1, p. 12-19, Jul 1999.

LI, W.; TAILHADES, J.; O'BRIEN-SIMPSON, N.M.; SEPAROVIC, F.; JR OTVOS, L.; HOSSAIN, M.A.; WADE, J.D. Proline-rich antimicrobial peptides: potential therapeutics against antibiotic-resistant bacteria. **Amino Acids**, v. 46, p.2287–2294, 2014.

LI, S.; POZHITKOV, A.; RYAN, R.A.; MANNING, C.S.; BROWN-PETERSON, N.; BROUWER, M. Constructing a fish metabolic network model. **Genome Biol**, v. 11, p. R115, 2010.

LILLICRAP, A. **The use of Zebrafish embryos as an alternative approach for ecotoxicity testing**. PhD thesis (Master of Philosophy in Biological Sciences) - University of Exeter, UK, 2010. <http://hdl.handle.net/10036/94256>.

LIM, S.S.; KIM, Y.; PARK, Y.; KIM, J.I.; PARK, I.-S.; HAHM, K.-S.; SHIN, S.Y. The role of the central L- or D-pro residue on structure and mode of action of a cell-selective alpha-helical IsCT-derived antimicrobial peptide. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 334, p. 1329–1335, 2005.

LOHSE, M.B.; JOHNSON, A.D. Differential phagocytosis of white versus opaque *Candida albicans* by *Drosophila* and mouse phagocytes. **PLoS ONE**, v. 3, p. 1473, 2008.

LONNEMANN, G. Chronic inflammation in hemodialysis: the role of contaminated dialysate. **Blood Purif**, v. 18, n. 3, p. 214-223, Feb 2000.

LORTHOLARY, O.; DUPONT, B. Antifungal prophylaxis during neutropenia and immunodeficiency. **Clin Microbiol Rev**, v. 10, p. 477–504, 1997.

LUDTKE, S.J.; HE, K.; HELLER, W.T.; HARROUN, T.A.; YANG, L.; HUANG, H.W. Membrane pores induced by magainin. **Biochemistry**, v. 35, p. 13723–13728, 1996.

MACRAE, C.A.; PETERSON, R.T. Zebrafish as tools for drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov**, v. 14, p. 721–731, 2015.

MAHLAPUU, M.; HÅKANSSON, J.; RINGSTAD, L.; BJÖRN, C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. **Front. Cell. Infect. Microbiol**, v. 6, Article n. 194, 2016.

MAK, P.; CHMIEL, D.; GACEK, G.J. Antibacterial peptides of the moth *Galleria mellonella*. **Acta Biochim. Pol**, v. 48, p. 1191–1195, 2001.

MAKA, P.; ZDYBICKA-BARABAS, A.; CYTRYNSKA, M. A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, p. 1129–1136, 2010.

MARMARAS, V.J.; LAMPROPOULOU, M. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. **Cell. Signal**, v. 21, p. 186–195, 2009.

MATSUZAKI, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, p. 1-10, 1999.

MATSUZAKI, K. Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1462, p. 1–10, 1999.

MAVOR, A.L.; THEWES, S.; HUBE, B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: Epidemiology, infection process and virulence attributes. **Curr. Drug Targets**, v. 6, p. 863–874, 2005.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MEEKER, N.D.; TREDE, N.S. Immunology and Zebrafish: Spawning new models of human disease. **Dev. Comp. Immunol**, v. 32, p. 745–757, 2008.

MEMARIANI, H.; SHAHBAZZADEH, D.; SABATIER, J.M.; MEMARIANI, M.; KARBALAEIMAHDI, A.; BAGHERI, K.P. Mechanism of action and in vitro activity of short hybrid antimicrobial peptide PV3 against *Pseudomonas aeruginosa*, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 479, n. 1, p. 103-108, 2016.

MITCHELL, K. F.; ZARNOWSKI, R.; SANCHEZ, H.; EDWARD, J. A.; REINICKE, E. L.; NETT, J. E.; MITCHELL, A.P.; ANDES, D.R. Community participation in biofilm matrix assembly and function. **PNAS**, v. 112, n. 13, p. 4092-4097, 2015.

MITSUHARA, I. *In vitro* growth inhibition of human intestinal bacteria by sarcotoxin IA, an insect bactericidal peptide. **Biotechnol Lett**, v. 23, p. 569–573, 2001.

MOGHADDAM, M.R.B.; TONK, M.; SCHREIBER, C.; SALZIG, D.; CZERMAK, P.; VILCINSKAS, A.; RAHNAMAEIAN, M. The potential of the *Galleria mellonella* innate immune system is maximized by the co–presentation of diverse antimicrobial peptides. **Biological Chemistry**, v. 397, n. 9, DOI: 10.1515/hsz-2016-0157, 2016.

MORASH, M.G.; DOUGLAS, S.E.; ROBOTHAM, A.; RIDLEY, C.M.; GALLANT, J.W.; SOANES, K.H. The zebrafish embryo as a tool for screening and characterizing pleurocidin host-defense peptides as anti-cancer agents, **Dis Model Mech**, v. 4, n. 5, p. 622-633, 2011.

MYLONAKIS, E.; CASADEVALL, A.; AUSUBEL, F.M. Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. **PLoS Pathog**, v. 3, p.e101, 2007.

NAGLIK, J.R.; RODGERS, C.A.; SHIRLAW, P.J.; DOBBIE, J.L.; FERNANDES-NAGLIK, L.L.; GREENSPAN, D.; AGABIAN, N.; CHALLACOMBE, S.J. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. **J. Infect. Dis**, v. 188, p. 469–479, 2003.

NAKAJIMA, T.; UZU, S.; WAKAMATSU, K.; SAITO, K.; MIYAZAWA, T.; YASUHARA, T.; TSUKAMOTO, Y.; FUJINO, M. Amphiphilic peptides in wasp venom. **Biopolymers**, v. 25, p. 115–121, 1986.

NETT, J. E.; SANCHEZ, H.; CAIN, M. T.; ANDES, D. R. Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan. **Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 1, p. 171-175, 2010b.

NOBILE, C. J.; ANDES, D. R.; NETT, J. E.; SMITH, JR, F. J.; YUE, F.; PHAN, Q.-T.; EDWARDS, JR, J.E.; FILLER, S.G.; MITCHELL, A.P. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. **PLoS pathogens**, v. 2, n. 7, p. e63, 2006.

OCHOA-PACHECO, A.; ESCALONA ARRANZ, J.C.; BEAVEN, M.; PERES-ROSES, R.; GAMEZ, Y.M.; CAMACHO-POZO, M.I, et al. Bioassay-guided *in vitro* Study of the Antimicrobial and Cytotoxic Properties of the Leaves from *Excoecaria Lucida* Sw. **Pharmacogn Res**, v. 9, p. 396–400, 2017.

ODDS, F. C. *Candida* and candidosis: a review and bibliography. 2nd. ed. London, United Kingdom: Bailliere Tindal, 1988.

OIZUMI, Y.; HEMMI, H.; MINAMI, M.; ASAOKA, A.; YAMAKAWA, M. Isolation, gene expression and solution structure of a novel moricin analogue, antibacterial peptide from a lepidopteran insect, *Spodoptera litura*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1752, p. 83–92, 2005.

ORME, I.; SECRIST, J.; ANATHAN, S.; KWONG, C.; MADDRY, J.; REYNOLDS, R.; POFFENBERGER, A.; MICHAEL, M.; MILLER, L.; KRAHENBUH, J.; ADAMS, L.; BISWAS, A.; FRANZBLAU, S.; ROUSE, D.; WINFIELD, D.; BROOKS, J. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 45, p. 1943–1946, 2001.

OTVOS, L.; OTVOS, I.; ROGERS, M.E.; CONSOLVO, P.J.; CONDIE, B.A.; LOVAS, S.; BULET, P.; BLASZCZYK-THURIN, M. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. **Biochemistry** (Mosc), v. 39, p.14150–14159, 2000.

PALMA, M.S.; DOS SANTOS, L.D.; DE SOUZA, B.M.; GOMES, P.C.; SAIDEMBERG, D.M.; SAIDEMBERG, N.B.B.; DIAS, N.B.; PINTO, J.R.A.S.; MENEGASSO, A.R.S. Apostila de Análise proteômica. Rio Claro, SP, 2010.

PAVAN, F.R.; MAIA, P.I.; LEITE, S.R.; DEFLON, V.M.; BATISTA, A.A.; SATO, D.N. et al. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. **Eur J Med Chem**, v. 45, p. 1898–1905, 2010.

PAYNE, D.J.; GWYNN, M.N.; HOLMES, D.J.; POMPLIANO, D.L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nat. Rev. Drug Discovery**, v. 6, p. 29-40, 2006.

PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J.; CREASY, D. M.; COTTRELL, J. S.; **Electrophoresis**, v. 20, p. 3551, 1999.

PETERS, B. M.; OVCHINNIKOVA, E. S.; KROM, B. P.; SCHLECHT, L.; ZHOU, H.; HOYER, L. L.; BUSSCHER, H.J.; VAN DER MEI, H.C.; JABRA-RIZK, M.A.; SHIRTLIFF, M.E. *Staphylococcus aureus* adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 12, p. 2975-2986, 2012.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Mycoses in North America, **Crit. Rev. Microbiol**, v. 36, n. 1, p. 1-53, 2010.

PIERCE, C.G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A.R.; WORMLEY, F.L.; MOWAT, E.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J.L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nat Protoc**, v.3, p. 1494-1500, 2008.

PODOLSKY, R.D. Fertilization ecology of egg coats; physical versus chemical contributions to fertilization success of free-spawned eggs. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, p. 1657-1668, 2002.

POTTS, W.T.W.; EDDY, F.B. The Permeability to Water of the Egg of Certain Marine Teleosts. **Journal of Comparative Physiology**, v. 82, p. 305-315, 1972.

POUNY, Y.; RAPAPORT, D.; MOR, A.; NICOLAS, P.; SHAI, Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes. **Biochemistry**, v. 31, n. 49, p. 12416-12423, 1992.

PUKKILA-WORLEY, R.; PELEG, A.Y.; TAMPAKAKIS, E.;MYLONAKIS, E. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. **Eukaryot. Cell**, v. 8, p. 1750–1758, 2009.

RALDÚA, D.; PIÑA, B. In vivo Zebrafish assays for analyzing drug toxicity. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 10, n. 5, p. 685-697, May 2014.

RAWSON, D.W.; ZHANG, T.; KALICHARAN, D.; JONGEBLOED, W.L. Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the Zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and functional relationships with respect to cryoprotectant penetration. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 325 – 336, 2000.

REED, B.; JENNINGS, M. Guidance on the housing and care of Zebrafish *Danio rerio*. Research Animals Department, Science Group. West Sussex England: RSPCA, Updated May 2011.

REGASINI, L.O.; PIVATTO, M.; SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES GIANNINI, M.J.S.; BARREIRO, E.J.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S. Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi. **Braz. J. Pharmacog.** v. 20, n.5, p. 706–711, 2010.

RIEHL, R. Die Struktur der Oocyten und Eihüllen oviparer Knochenfische – eine Übersicht. **Acta Biologica Benrodis**, v. 3, p. 27-65, 1991.

RIZZO, L.Y.; GOLOMBEK, S.K.; MERTENS, M.E.; PAN, Y.; LAAF, D.; BRODA, J.; JAYAPPAUL, J.; MÖCKEL, D.; SUBR, V.; HENNINK, W.E.; STORM, G.; SIMON, U.; JAHNEN-DECHENT, W.; KIESSLING, F.; LAMMERS, T. In Vivo Nanotoxicity Testing using the Zebrafish Embryo Assay. **J Mater Chem B Mater Biol Med**, v. 1, p. 3918-3925, Jun 2013.

ROSOWSKI, E.E.; KNOX, B.P.; ARCHAMBAULT, L.S.; HUTTENLOCHER, A.; KELLER, N.P.; WHEELER, R.T.; DAVIS, J.M. The Zebrafish as a Model Host for Invasive Fungal Infections. **J. Fungi**, v. 4, n. 4, p. 136; doi:10.3390/jof4040136, 2018.

RUIZ-HERRERA, J.; MORMENEO, S.; VANACLOCHA, P.; FONT-DE-MORA, J.; IRANZO, M.; PUERTES, I.; SENTANDREU, R. Structural organization of the components of the cell wall from *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 140, p. 1513–23, 1994.

SADYGOV, R. G.; COCIORVA, D.; YATES, J. R. Large-scale database searching using tandem mass spectra: looking up the answer in the back of the book. **Nat Methods**, v. 1, n. 3, p. 195-202, 2004.

SAMY, R.P.; SATYANARAYANAJOIS, S.; FRANCO, O.L.; STILES, B.G.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Animal venoms as natural sources of antimicrobials. In *Antibiotics: Current Innovations and Future Trends*; Sánchez, S., Demain, A.L., Eds.; Caister Academic Press: Haverhill, UK, p. 229–247, 2015.

SANSOM, M.P. The biophysics of peptide models of ion channels. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 55, p. 139–215, 1991.

SANTANA, D.P.; RIBEIRO, E.L.; MENEZES, A.C.S.; NAVES, P.L.F. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*, **Rev. Ciênc. Méd. Biol**, v.12, n.2, p. 229-233, Mai./Ago. 2013

SANTORIELLO, C.; ZON, L.I. Hooked! Modeling human disease in Zebrafish. **J Clin Invest**, v. 122, p. 2337– 2343, 2012.

SCAPIGLIATI, G.; CARCUPINO, M.; TADDEI, A.R.; MAZZINI, M. Characterization of the Main Egg Envelope Proteins of the Sea Bass *Dicentrarchus Labrax* L. (Teleostea, Serranidae). **Molecular Reproduction and Development**, v. 38, p. 48-53, 1994.

SCHATZMAYR, H.G.; MÜLLER, C.A. AS INTERFACES DA BIOÉTICA NAS PESQUISAS COM SERES HUMANOS E ANIMAIS COM A BIOSSEGURANÇA. **Ciênc. vet. tróp**, v. 11, p.130-134, 2008.

SCHUHMANN, B.; SEITZ, V.; VILCINSKAS, A.; PODSIADLOWSKI, L. Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. **Arch. Insect Biochem. Physiol**, v. 53, p. 125–133, 2003.

SCHULZ-KNAPPE, P.; ZUCHT, H.D.; HEINE, G.; JURGENS, M.; HESS, R.; SCHRADER, M. Peptidomics: the comprehensive analysis of peptides in complex biological mixtures. **Comb. Chem. High Throughput Screen**, v. 4, n. 2, p. 207–217, 2001.

SCULLY, C.; EL-KABIR, M.; SAMARANAYAKE, L.P. *Candida* and oral candidosis: a review. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 5, p. 125–157, 1994.

SELLAM, A.; AL-NIEMI, T.; MCINNERNEY, K.; BRUMFIELD, S.; NANTEL, A.; SUCI, P.A. A *Candida albicans* early stage biofilm detachment event in rich medium. **BMC Microbiol**, v. 9, Article n. 25, 2009.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochim Biophys Acta**, v. 1462, p.55–70, 1999.

SHIRTLIFF, M. E.; PETERS, B. M.; JABRA-RIZK, M. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. **FEMS microbiology letters**, v. 299, n. 1, p. 1-8, 2009.

SILVA, J.C.; NETO, L.M.; NEVES, R.C.; GONÇALVES, J.C.; TRENTINI, M.M.; MUCURY-FILHO, R.; SMIDT, K.S.; FENSTERSEIFER, I.C.; SILVA, O.N.; LIMA, L.D.; CLISSA, P.B.; VILELA, N.; GUILHELMELLI, F.; SILVA, L.P.; RANGEL, M.; KIPNIS, A.; SILVA-PEREIRA, I.; FRANCO, O.L.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P.; BOCCA, A.L.; MORTARI, M.R. Evaluation of the antimicrobial activity of the mastoparan Polybia-MPII isolated from venom of the social wasp *Pseudopolybia vespiceps testacea* (Vespidae, Hymenoptera). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 19, p. 167–175, 2017.

SNEDDON, L. U.; HALSEY, L. G; BURY, N. R. Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. **J Exp Biol**, v. 220, p. 3007-3016. doi:10.1242/jeb.147058. 2017.

SORAYA, S.; EDUARDO, P.R.; JAVIER, S.B. Can Zebrafish be used as animal model to study Alzheimer's disease? **Am J Neurodegener Dis**, v. 1, p. 32–48, 2013.

SOUZA, B.M.; MENDES, M.A.; SANTOS, L.D.; MARQUES, M.R.; CÉSAR, L.M.; ALMEIDA, R.N.; PAGNOCCA, F.C.; KONNO, K.; PALMA, M.S. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v. 26, p. 2157–2164, 2005.

SPADARI, C.C.; VILA, T.; ROZENTAL, S.; ISHIDA, K. Miltefosine Has a Postantifungal Effect and Induces Apoptosis in *Cryptococcus* Yeasts. **Antimicrob Agents and Chemother**, v. 62, n. 8, p. 312-318, 2018.

STAVELEY, B. E. Molecular & Developmental Biology (BIOL 3530). Disponível em:

http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_03/devo_03.html.

2015. Retrieved May 13, 2015.

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J Mol Biol**, v.79, n. 2, p. 237-48, 1973.

SUBBALAKSHMI, C.; SITARAM, N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. **FEMS Microbiol Lett**, v.160, p.91–96, 1998.

SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 7, p. 317-324, 2004.

SULLIVAN, C.; MATTY, M.A.; JURCZYSZAK, D.; GABOR, K.A.; MILLARD, P.J.; TOBIN, D.M.; KIM, C.H. Infectious disease models in Zebrafish. **Methods Cell. Biol.**, v. 138, p. 101–136, 2017.

SULLIVAN, P.A.; YIN, C.Y.; MOLLOY, C.; TEMPLETON, M.D.; SHEPHERD, M.G. An analysis of the metabolism and cell wall composition of *Candida albicans* during germ-tube formation. **Can J Microbiol**. v. 29, n. 11, p. 1514–25, 1983.

SUZUKI, T.; FUJIKURA, K.; HIGASHIYAMA, T.; TAKATA, K. DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. **J. Histochem. Cytochem**. v. 45, p. 49-53, 1997.

TANIDA, T.; OKAMOTO, T.; UETA, E.; YAMAMOTO, T.; OSAKI, T. Antimicrobial peptides enhance the Candidacidal activity of antifungal drugs by promoting the efflux of ATP from *Candida* cells. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, p. 94–103, 2006.

TRIPATHI, J.K.; KATHURIA, M.; KUMAR, A.; MITRA, K.; GHOSH, J.K. An Unprecedented alteration in mode of action of IsCT resulting its translocation into bacterial cytoplasm and inhibition of macromolecular syntheses. **Sci. Rep**, v. 5, n. 1, p.9127, 2015.

TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 193, 2003.

VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D. Mucosal candidiasis. **Infect Dis Clin N Am**,v. 16, p.793–820, 2002.

VAZQUEZ, J.A. Invasive oroesophageal candidiasis: current and developing treatment options. **Drugs**, v. 63, p.971–89, 2003.

VEERMAN, E.C.; VALENTIJN-BENZ, M.; NAZMI, K.; RUISSEN, A.L.; WALGREENWETERINGS, E.; VAN MARLE, J.; DOUST, A.B.; VAN'T HOF, W.; BOLSCHER, J.G.; AMERONGEN, A.V. Energy depletion protects *Candida albicans* against antimicrobial peptides by rigidifying its cell membrane. **J. Biol. Chem**, v. 282, p. 18831-18841, 2007.

VICENTE, E.; PEREZ-SILANES, S.; LIMA, L.M.; ANCIZU, S.; BURGUETE, A.; SOLANO, B. et al. Selective activity against *Mycobacterium tuberculosis* of new quinoxaline 1,4-diN-oxides. **Bioorg Med Chem**, v.17, p. 385–389, 2009.

VIERSTRAETE, E.; VERLEYEN, P.; BAGGERMAN, G.; D'HERTOG, W.; VAN DEN BERGH, G. ARCKENS, L.; DE LOOF, A.; SCHOOF, L.A. Proteomic approach for the analysis of instantly released wound and immune proteins in *Drosophila melanogaster* hemolymph, **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.101, n. 2, p. 470-475, 2004.

VILCINSKAS, A.; MUKHERJEE, K.; VOGEL, H. Expansion of the antimicrobial peptide repertoire in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci**, v. 280, p. 1-9, 2013.

VILLANUEVA, J.; PHILIP, J.; CHAPARRO, C.A. et al. Correcting common errors in identifying cancer-specific serum peptide signatures. **J. Proteome Res**, v. 4, n. 4, p. 1060–1072, 2005.

VILLANUEVA, J.; SHAFFER, D.R.; PHILIP, J. et al. Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns. **J. Clin. Invest**, v. 116, n. 1, p. 271–284, 2006.

VILLANUEVA, J.; MARTORELLA, A.J.; LAWLOR, K. et al. Serum peptidome patterns that distinguish metastatic thyroid carcinoma from cancer-free controls are unbiased by gender and age. **Mol. Cell Proteomics**, v. 5, n. 10, p. 1840–1852, 2006.

VON WESTERNHAGEN, H. Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. . In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. (Eds.), **Fish Physiology**. The physiology of developing fish. Eggs and larvae. Part A. London: Academic Press, 1988. v. 11, p. 253–347.

WÄCHTLER, B.; CITIULO, F.; JABLONOWSKI, N.; FÖRSTER, S.; DALLE, F.; SCHALLER, M.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* - epithelial interactions: Dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. **PLoS ONE**, v. 7, p. 36952, 2012.

WANG, K.; YAN, J.; LIU, X.; ZHANG, J.; CHEN, R.; ZHANG, B.; DANG, W.; ZHANG, W.; KAI, M.; SONG, J.; WANG, R. Novel cytotoxicity exhibition mode of polybia-CP, a novel antimicrobial peptide from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Toxicology**, v. 288, p. 27–33, 2011.

WANG, K.; YAN, J.; CHEN, R.; DANG, W.; ZHANG, B.; ZHANG, W.; SONG, J.; WANG, R. Membrane-active action mode of polybia-CP, a novel antimicrobial peptide isolated from the venom of *Polybia paulista*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 56, p. 3318–3323, 2012.

WANG, K.; YAN, J.; DANG, W.; XIE, J.; YAN, B.; YAN, W.; SUN, M.; ZHANG, B.; MA, M.; ZHAO, Y.; JIA, F.; ZHU, R.; CHEN, W.; WANG, R. Dual antifungal properties of cationic antimicrobial peptides polybia-MPI: Membrane integrity disruption and inhibition of biofilm formation. **Peptides**, v. 56, p. 22–29, 2014.

WANG, K.; JIA, F.; DANG, W.; ZHAO, Y.; ZHU, R.; SUN, M.; QIU, S.; AN, X.; MA, Z.; ZHU, Y.; YAN, J.; KONG, Z.; YANA, W.; WANG, R. Antifungal effect and action mechanism of antimicrobial peptide polybia-CP. **J. Pept. Sci**, v. 22, p. 28–35, 2016.

WISE, R. The urgent need for new antibacterial agents. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 66, p. 1939-1940, 2011.

WÖLLERT, T.; LANGFORD, G.M. Long-Term Live Cell Imaging of Cell Migration: Effects of Pathogenic Fungi on Human Epithelial Cell Migration. **Methods Mol. Biol**, v. 1365, p. 3-23, 2016.

XIANG, J.; ZHOU, M.; WU, Y.; CHEN, T.; SHAW, C.; WANG, L. The synergistic antimicrobial effects of novel bombinin and bombinin H peptides from the skin secretion of *Bombina orientalis*. **Bioscience Rep**, v. 37, n. 5, BSR20170967 DOI: 10.1042/BSR20170967, 2017.

YAMAGAMI, K.; HAMAZAKI, T.S.; YASUMASU, S.; MASUDA, K.; IUCHI, I. Molecular and Cellular Basis of Formation, Hardening, and Breakdown of the Egg Envelope in Fish. *International review of cytology: a survey of cell biology*. **International Review of Cytology**, v. 136, p. 51-92, 1992.

YAMAKAWA, M.; HARA, S. Moricin, a Novel Type of Antibacterial Peptide Isolated from the Silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 50, p. 29923–29927, 1995.

YANG, Y.L.; CHENG, M.F.; WANG, C.W.; WANG, A.H.; CHENG, W.T.; LO, H.J.; HOSPITALS, T. The distribution of species and susceptibility of

amphotericin B and fluconazole of yeast pathogens isolated from sterile sites in Taiwan. **Med Mycol**, v. 48, p. 328–334, 2010.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacol. Rev.**, v. 55, p. 27–55, 2003.

YEUNG, A. T.; GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 68, p. 2161–2176, 2011.

YI, H.Y.; CHOWDHURY, M.; HUANG, Y.D.; YU, X.Q. Insect antimicrobial peptides and their applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 98, n. 13, p. 5807-5822, 2014.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p.389–395, 2002.

ZHANG, J.; LIU, W.; TAN, J.; SUN, Y.; WAN, Z.; LI, R. Antifungal Activity of Geldanamycin Alone or in Combination with Fluconazole Against Candida species. **Mycopathologia**, v.175, p. 273–279. 2013.

ZHANG, T., RAWSON, D.M. Feasibility Studies on Vitrification of Intact Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Embryos. **Cryobiology**, v. 33, p. 1-13, 1996.

ZON, L. I.; PETERSON, R.T. *In vivo* drug discovery in the Zebrafish. **Nat. Rev. Drug Discov**, v. 4, p.35–44, 2005.