



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS 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.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Tese	22
1. INTRODUÇÃO	23
1.1. <i>Candida albicans</i>	23
1.2. Peptídeos antimicrobianos (AMP`s)	28
1.3. Espectrometria de massas e Abordagem Proteômica	34
1.4. Abordagem Peptidômica	36
1.5. Modelo Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	36
2. OBJETIVO GERAL	41
3. METODOLOGIA GERAL	41
3.1. Microrganismos e condições de crescimento	41
3.2. Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	41
3.2.1. Ensaio de susceptibilidade (concentração inibitória mínima – CIM)	41
3.2.2. Teste para determinação da concentração fungicida mínima (CFM)	42
3.3. Ensaio de toxicidade <i>in vitro</i>	42
3.3.1. Cultura de células	42
3.3.2. Avaliação da citotoxicidade em cultura celular	42
3.4. Avaliação de Segurança em modelo Zebrafish	43
3.5. Análise qualitativa em avaliação por espectrometria de massas utilizando Zebrafish	44
3.5.1. Permeação pela membrana do córion em embriões de Zebrafish	44
3.5.2. Espectrometria de Massas	44
3.6. Análise estatística	45
PARTE 1. PEPTÍDEOS ANÁLOGOS DE MASTOPARANOS (MKs), DERIVADOS DA VESPA <i>Apoica pallens</i>	46
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
2. METODOLOGIA ESPECÍFICA	47
2.1. Peptídeos modificados de Vespa	48
2.2. Microrganismos e condições de crescimento	48
2.3. Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	48
2.3.1. Ensaio de susceptibilidade (concentração inibitória mínima - CIM)	48
2.3.2. Teste para determinação da concentração fungicida mínima (CFM)	48
2.4. Avaliação da citotoxicidade em cultura celular	48
2.5. Avaliação de Segurança em modelo Zebrafish	48
2.6. Análise qualitativa em avaliação por espectrometria de massas utilizando Zebrafish	48
2.7. Análise estatística	48
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48

3.1. Estudo dos peptídeos de vespa	48
3.1.1. Peptídeos	49
3.1.2. Avaliação de segurança dos MKs em embriões de Zebrafish	50
3.1.3. Avaliação da citotoxicidade em cultura celular	51
3.1.4. Análise qualitativa da permeação do córion em avaliação por espectrometria de massas	53
PARTE 2. ESTUDO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS PRESENTES NA HEMOLINFA DE <i>Galleria mellonella</i>	57
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
2. METODOLOGIA ESPECÍFICA	58
2.1. Extração da hemolinfa de <i>Galleria mellonella</i>	59
2.1.1. Determinação da concentração de proteínas totais	59
2.1.2. Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 1D)	59
2.1.3. Abordagem proteômica por shotgun	60
2.2. Síntese dos peptídeos	61
2.3. Microrganismos e condições de crescimento	61
2.4. Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	61
2.4.1. Ensaio de susceptibilidade (concentração inibitória mínima - CIM)	61
2.4.2. Teste para determinação da concentração fungicida mínima (CFM)	62
2.5. Avaliação da citotoxicidade em cultura celular	62
2.6. Avaliação de Segurança em modelo Zebrafish	62
2.7. Análise qualitativa em avaliação por espectrometria de massas utilizando Zebrafish	62
2.8. Análise estatística	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1. Análise do perfil proteico da hemolinfa de <i>Galleria mellonella</i>	62
3.1.1. Estudo dos precipitados da extração da hemolinfa – SDS Page e shotgun	62
3.1.2. Avaliação de segurança de PepM1 e PepM2 em embriões de Zebrafish	67
3.1.3. Avaliação da citotoxicidade em cultura celular	68
3.1.4. Análise qualitativa da permeação do córion em avaliação por espectrometria de massas	70
PARTE 3. ESTUDO DOS PEPTÍDEOS ANÁLOGOS DE IsCT E PADRONIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR IMERSÃO EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH	72
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	72
2. METODOLOGIA ESPECÍFICA	73
2.1. Peptídeos	74
2.2. Microrganismos e condições de crescimento	74
2.3. Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	74
2.3.1. Ensaio de susceptibilidade (concentração inibitória mínima - CIM)	74

2.3.2. Teste para determinação da concentração fungicida mínima (CFM)	74
2.4. Avaliação da citotoxicidade em cultura celular	74
2.5. Avaliação de Segurança em modelo Zebrafish	74
2.6. Análise qualitativa em avaliação por espectrometria de massas utilizando Zebrafish	74
2.7. Avaliação do possível efeito sinérgico de PepM3 combinado a Fluconazol e Anfotericina B	74
2.8. Ensaio de influxo por Iodeto de Propídio	75
2.9. Padronização da infecção por imersão em embriões de Zebrafish	75
2.10. Eficácia de PepM3 em embriões de Zebrafish	76
2.11. Análise estatística	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
3.1. Estudo dos análogos de IsCT	77
3.1.1. Teste de susceptibilidade (CIM)	77
3.1.2. Avaliação de segurança de PepM3 e PepM4 em embriões de Zebrafish	80
3.1.3. Avaliação da citotoxicidade em cultura celular	82
3.1.4. Análise qualitativa da permeação do córion em avaliação por espectrometria de massas	83
3.2. Avaliação do possível efeito sinérgico de PepM3 combinado à Fluconazol e Anfotericina B	84
3.3. Ensaio de influxo por Iodeto de Propídio	85
3.4. Padronização da infecção por imersão em embriões de Zebrafish	86
3.5. Eficácia de PepM3 utilizando embriões de Zebrafish e carga fúngica	88
4. CONCLUSÕES	91
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
CAPÍTULO 2 – ARTIGOS	117
1. Artigos publicados durante o Doutorado	118
1.1. Study of mastoparan analogues peptides against <i>Candida albicans</i> and safety in zebrafish embryos (<i>Danio rerio</i>) – Future Microbiology	118
1.2. Fungal biofilms and polymicrobial diseases – Journal of Fungi (coautoria)	119
2. Artigos submetidos durante o Doutorado (coautoria)	120
2.1. Antifungal activity, toxicity and mechanism of action of a mastoparan analog peptide – Frontiers Pharmacology	120
CAPÍTULO 3 – PREMIAÇÃO	121
1. Premiação IV Simpósio Zebrafish como modelo animal de pesquisa	122
1.1. Trabalho intitulado “Structure-function relationship of modified synthetic peptides of the wasp (<i>Apoica pallens</i>) against <i>Candida albicans</i> and safety in Zebrafish embryos (<i>Danio rerio</i>)” foi classificado em 1º lugar	122

LISTA DE FIGURAS

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)	31
Figura 2. Fluxograma representando a metodologia específica da parte 1	47
Figura 3. Porcentagem de sobrevivência dos embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações dos peptídeos MK5789 (A); MK58911 (B); MK4589 (C), até 72 horas pós fertilização (hpf) ($p < 0,05$).	51
Figura 4. Porcentagem de viabilidade na linhagem celular HaCaT expostas a diferentes concentrações dos peptídeos MKs, e Dimetil sulfóxido (DMSO) usado como controle positivo	52
Figura 5. Espectro MS ¹ para o peptídeo MK5789 (62,5 µg/mL): A) Amostra padrão: mostrando os picos de m/z 820,94 e 547,62, correspondente aos íons moleculares [M+2H] ²⁺ e [M+3H] ³⁺ , respectivamente (setas verdes); B) Amostra 6 hpf: os íons m/z [M+2H] ²⁺ e [M+3H] ³⁺ não foram observados	54
Figura 6. Espectro MS ¹ para o peptídeo MK58911 (62,5 µg/mL): A) Amostra padrão: mostrando os picos de m/z 820,95 e 547,98, correspondente aos íons moleculares [M+2H] ²⁺ e [M+3H] ³⁺ , respectivamente (setas vermelhas); B) Amostra 6 hpf: os íons m/z [M+2H] ²⁺ e [M+3H] ³⁺ (m/z 820,97 e 547,67) com baixa intensidade (setas vermelhas)	54
Figura 7. Espectro MS ¹ para o peptídeo MK4589 (62,5 µg/mL): A) Amostra padrão: mostrando os picos de m/z 799,94 e 533,64, correspondente aos íons moleculares [M+2H] ²⁺ e [M+3H] ³⁺ , respectivamente (setas azuis); B) Amostra 6 hpf: os íons m/z [M+2H] ²⁺ e [M+3H] ³⁺ (m/z 799,94 e 533,64) com baixa intensidade (setas azuis)..	55

Figura 8. Fluxograma representando a metodologia específica da parte 2	58
Figura 9. Gel SDS-PAGE 12% dos precipitados da extração da hemolinfa. 1- Padrão de proteínas - P (kDa); 2- Hemolinfa infectada - HGI; 3- Hemolinfa controle – HGNI	63
Figura 10. Alinhamento Moricin C3, PepM1 e PepM2 com suas respectivas informações	66
Figura 11. Porcentagem de sobrevivência dos embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações do peptídeo PepM1 (A) e PepM2 (B), até 72 horas pós fertilização (hpf)	68
Figura 12. Porcentagem de viabilidade na linhagem celular HaCaT expostas a diferentes concentrações de PepM2, e Dimetil sulfóxido (DMSO) usado como controle positivo	69
Figura 13. Espectro MS ¹ para o peptídeo PepM2 (250 µg/mL): A) Amostra padrão: mostrando os picos de m/z 515,08, 600,79, 720,76 e 900,73, correspondente aos íons moleculares [M+7H] ⁷⁺ , [M+6H] ⁶⁺ , [M+5H] ⁵⁺ e [M+4H] ⁴⁺ respectivamente (setas azuis); B) Amostra 6 hpf: os íons m/z [M+7H] ⁷⁺ , [M+6H] ⁶⁺ , [M+5H] ⁵⁺ e [M+4H] ⁴⁺ (m/z 515,05, 600,62, 720,74 e 900,45) com baixa intensidade (setas azuis)	70
Figura 14. Fluxograma representando a metodologia específica da parte 3	73
Figura 15. Alinhamento dos peptídeos com suas respectivas informações: IsCT com PepM3 (A); [K7]-IsCT com PepM4 (B)	79
Figura 16. Porcentagem de sobrevivência dos embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações do peptídeo PepM3 (A) e PepM4 (B), até 72 horas pós fertilização (hpf)	81
Figura 17. Porcentagem de viabilidade na linhagem celular HaCaT expostas a diferentes concentrações de PepM3, e Dimetil sulfóxido (DMSO) usado como controle positivo	82
Figura 18. Espectro MS ¹ para o peptídeo PepM3 (125 µg/mL): A) Amostra padrão: mostrando os picos de m/z 505,90 e 758,51, correspondente aos íons moleculares [M+3H] ³⁺ e [M+2H] ²⁺ ,	

respectivamente (setas verdes); B) Amostra 6 hpf: o íon m/z $[M+3H]^{3+}$ e $[M+2H]^{2+}$ (m/z 505,92 e 758,51) com baixa intensidade (setas verdes) 84

Figura 19. Porcentagem de células de *C. albicans* positivas ao iodeto de propídio (IP) em 24h de exposição a duas concentrações de PepM3 (250 e 125 $\mu\text{g/mL}$) e Fluconazol (Flu 2 e 1 $\mu\text{g/mL}$). * $p < 0,05$; ** = $p < 0,0022$; *** = $p < 0,0002$ comparado ao grupo controle 85

Figura 20. Localização de células de *C. albicans* (marcado com Calcofluor – azul) em infecção por imersão em embriões de Zebrafish (marcado com FITC – verde): A) Visualização do embrião e da *C. albicans* aderida no córion, ou seja, com a infecção estabelecida; B) Cortes entre as camadas do embrião, os quais comprovam que o fungo foi capaz de penetrar o córion (indicado por setas vermelhas). As imagens são representativas de imageamento por microscopia confocal a 405 nm de leitura com uma objetiva de 10x. Barra de escala = 100 μm 87

Figura 21. Efeito de PepM3 (125 $\mu\text{g/mL}$) e fluconazol (1 $\mu\text{g/mL}$) na carga fúngica de embriões de Zebrafish infectados com 1×10^6 células/mL 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura primária, modificações e ensaios de susceptibilidade dos peptídeos MKs contra <i>C. albicans</i> : Massa Molecular (MM), sequência de aminoácidos, número de resíduos de Lisina (K), carga líquida (Q), Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	49
Tabela 2. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), concentração inibitória 50% (CI50) e índice de seletividade (IS) para linhagem celular HaCaT referente aos três MKs	53
Tabela 3. Principais peptídeos/proteínas com atividade antimicrobiana descritos em literatura com seus respectivos números de acesso, massa molecular e score	64
Tabela 4. Peptídeos análogos de <i>Galleria mellonella</i> com os valores de massa molecular (MM), número de Lisina (K), carga líquida (Q), concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)	66
Tabela 5. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), concentração inibitória 50% (CI50) e índice de seletividade (IS) para linhagem celular HaCaT referente ao PepM2	69
Tabela 6. Peptídeos análogos de IsCT com as respectivas estruturas, os valores de Massa Molecular (MM), número de Lisina (K), carga líquida (Q), Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	80
Tabela 7. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), concentração inibitória 50% (CI50) e índice de seletividade (IS) para linhagem celular HaCaT referente ao PepM3	83
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)	91

LISTA DE ABREVIATURAS

α - Alfa

μg - Micrograma

μL - Microlitros

μm - Micrômetros

% - Por cento

$^{\circ}\text{C}$ - Graus Celsius

ACN - Acetonitrila

AMP's - Peptídeos Antimicrobianos

Anfo - Anfotericina B

ATCC - American Type Culture Collection

CFI - Concentração Fracional Inibitória

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CID - Decomposição induzida por colisão

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CI50 - Concentração Inibitória 50%

CL₅₀ - Concentração Letal 50%

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

Da - Daltons

DMSO - Dimetil sulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucléico

ESI/IT - Sistema Electrospray - Ion trap

ESI-MS¹ - Espectro massa/carga do peptídeo

FDR - False Discovery Rate

FITC - Isotiocianato de Fluoreceína Isomero I

Flu - Fluconazol

G - Gramas

HaCaT - Linhagem Celular de Queratinócito de Pele Humana

HGI - Hemolinfa Infectada

HGNI - Hemolinfa Não Infectada

Hpf - Horas Pós Fertilização

IP - Iodeto de propídio

IS - Índice de Seletividade

K - Resíduos de Lisina
kDa - KiloDalton
kPa - Kilopascal
LC/MS - Liquid chromatography–mass spectrometry
M - Molar
mA - Miliampère
MALDI-TOF - Matrix-assisted laser desorption/ionization
ME - Meio Embriônico
Min - Minutos
MKs - Peptídeos de vespa *Apoica pallens*
mL - Mililitro
mM - Milimolar
MM - Massa Molecular
MOPS - Ácido 3-Morfolinopropanosulfônico
MS - Espectrometria de Massas
MS/MS - Espectrometria de massas sequencial
m/z - Massa / Carga
Nº - Número
Nm - Nanômetros
Ns - Não significativa
PBS - Tampão de Fosfato
pH - Potencial hidrogeniônico
PLs - Fosfolipases
Q - Carga Líquida
Rpm - Rotação por Minuto
SAPs - Proteases Aspartil Secretadas
SDS 1D - Dodecil sulfato de sódio
SFB - Soro Fetal Bovino
TFA - Ácido trifluoroacético
Tris - tris(hidroximetil)amino metano
UFC - Unidades Formadoras de Colônia
UFLC - Ultra Fast Liquid Chromatography
V - Volts
v/v - volume/volume

CVV – Candidíase Vulvovaginal

x g - Força G

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.

CAPÍTULO 1 – TESE

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 ovóides 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 fosfolípidios 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).

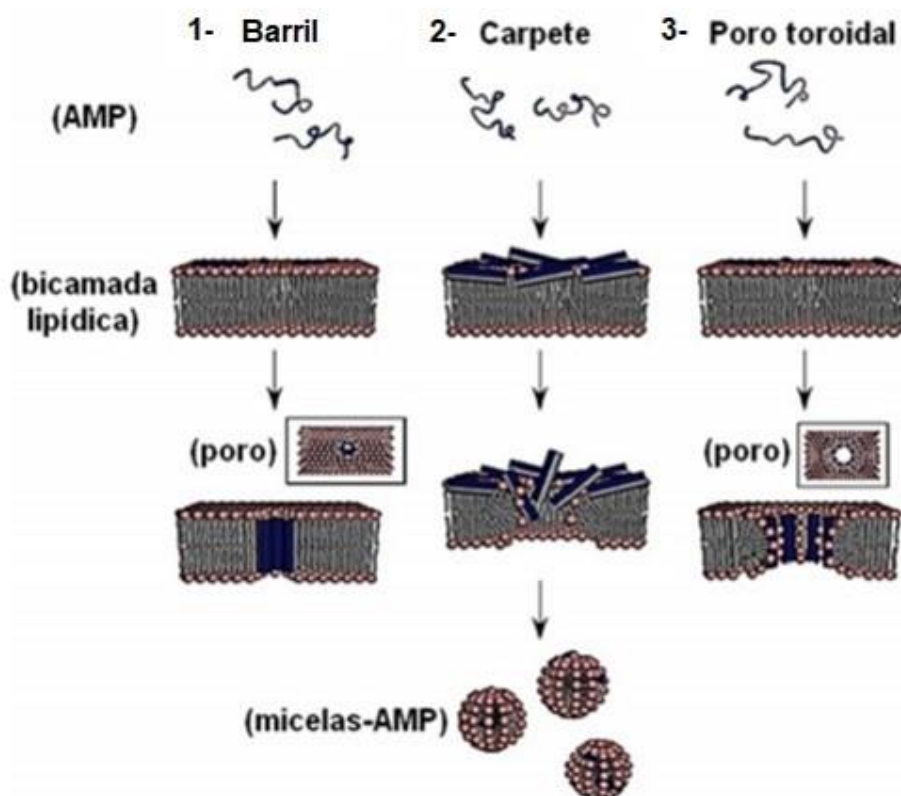
Os AMP's constituem um grupo representado por peptídeos com estruturas lineares ou cíclicas, com propriedades hidrofóbicas ou anfipáticas. Em relação às estruturas primárias dos AMP's, assim como no caso dos peptídeos antibacterianos, não existe um domínio estrutural conservado ao qual seja atribuída 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; MAK 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 peptídeo 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 Crypinidae. 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), fluutuabilidade 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 óptica 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 peritonias 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. OBJETIVO GERAL

Estudar e caracterizar peptídeos antimicrobianos que apresentem atividade anti-*Candida albicans* com baixa toxicidade e não-teratogenicidade em embriões de Zebrafish (*Danio rerio*).

3. METODOLOGIA GERAL

3.1. Microrganismos e condições de crescimento

Neste estudo foi analisada a cepa de *Candida albicans* (ATCC 90028), pertencentes à coleção do Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Campus Araraquara. Essas leveduras foram crescidas em Agar Sabouraud Dextrose a 37 °C por 24 horas.

3.2. Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

3.2.1. Ensaio de susceptibilidade (concentração inibitória mínima - CIM)

Os ensaios de susceptibilidade da cepa em forma planctônica foram realizados utilizando os peptídeos nas concentrações de 0,488-250 µg/mL, tendo como controle as drogas fluconazol e anfotericina B. O ensaio foi realizado em

microplacas de 96 poços e foi baseado no documento CLSI M27A3 (2008), com modificações. Como controle do ensaio, foram preparadas dez concentrações do fármaco anfotericina B (0,015 µg/mL a 16 µg/mL) e fluconazol (0,125 µg/mL a 64 µg/mL). Também foi utilizado o controle positivo para o crescimento fúngico, ou seja, sem tratamento, e o controle negativo sem a presença dos fungos, somente o meio de cultura. Foi preparado um inóculo com concentração de $2,5 \times 10^3$ células/mL em meio RPMI-1640 tamponado com MOPS, suplementado com 2% de glicose e com pH na faixa de 7,2 a 7,4. Foram acrescentados 100 µL do inóculo por poço, juntamente com os peptídeos em suas devidas concentrações diluídos em RPMI, e as placas foram incubadas a 37 °C, sob agitação por 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada a leitura visual do crescimento fúngico através da turvação do meio de cultura, e determinada a menor concentração que inibe o crescimento fúngico, ou seja, a CIM.

3.2.2. Teste para determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

A determinação da CFM foi realizada conforme descrito por GULLO et al., (2012) e REGASINI, et al., (2010). Após determinada a CIM, foi transferida uma alíquota de cada concentração para uma placa de Ágar Sabourand Dextrose a qual foi incubada por 24 horas a 37 °C. Em seguida, foi observado se houve o crescimento fúngico, determinando assim a menor concentração fungicida (CFM).

3.3. Ensaio de toxicidade *in vitro*

3.3.1. Cultura de células

Nos ensaios que requerem avaliação da citotoxicidade foi utilizada a linhagem celular HaCaT (queratinócito de pele humano). As células foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C.

3.3.2. Avaliação da citotoxicidade em cultura celular

A citotoxicidade dos peptídeos que apresentaram atividade contra *C. albicans* foi avaliada pelo protocolo de Resazurina 0,01 % (PAVAN et al., 2010; AHMED et al., 1994). Foi utilizada a linhagem celular HaCaT para o ensaio. Placas de microdiluição de 96 poços foram preparadas com $5,0 \times 10^4$ células por poço e incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ por 24 horas até a formação da monocamada

celular. Foram avaliadas as concentrações de 7,81 a 500 µg/mL dos peptídeos, as quais foram preparadas a partir de diluições seriadas em meio de cultura celular. Além disso, foi utilizado DMSO 100% como controle positivo. As células foram incubadas com os tratamentos e após 24 horas de incubação à 37 °C, 5% de CO₂, foram adicionados 100 µL da solução de Resazurina 0,01% em meio DMEM, incubado por 4 horas a 37 °C, 5% de CO₂. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Biotek-Epoch 2) com comprimento de onda de 570 – 600 nm. Os ensaios foram realizados em réplicas de experimentos independentes. A viabilidade celular foi calculada com base nos valores de absorbância, tendo o controle negativo considerado como 100% de células viáveis. Foi considerada a concentração inibitória 50% (CI50) e o cálculo de índice de seletividade (IS) de acordo com a fórmula abaixo:

$$IS = \frac{\text{concentração inibitória 50\% (CI50)}}{\text{concentração inibitória mínima (CIM)}}$$

3.4. Avaliação de Segurança em modelo Zebrafish

Foram utilizados embriões fornecidos pelo laboratório de Zebrafish do Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP – Araraquara.

Os embriões obtidos por criadeiras foram lavados em meio embriônico (NaCl; KCl; CaCl₂.2H₂O; MgSO₄.7H₂O; H₂O e azul de metileno 0,00003%) e estes com desenvolvimento normal foram selecionados para o teste. Aproximadamente 1-2 hpf (horas pós fertilização), os embriões selecionados foram transferidos para uma placa de 96 poços (2 embriões por poço) junto com os peptídeos em diferentes concentrações, em torno da CIM de cada um. A placa foi incubada a 28 °C e os embriões foram observados até 72 horas por microscopia (Zeiss - Discovery. V12, com objetiva de 40x).

Distúrbios de desenvolvimento como um indicador de efeito teratogênico (coagulação, falta de formação de sômites, retardo de desenvolvimento, deformação da cauda e falta de batimento cardíaco) foram avaliados de acordo com o guia da ZEFT (Zebrafish embryo acute toxicity test, OECD test guideline 236 - Organisation for Economic Cooperation and Development test guideline, Busquet et al., 2014), com pequenas modificações em relação ao tempo final de experimento.

Concentração letal 50% (CL₅₀) foi determinada a partir de curvas concentração-resposta plotadas até o tempo de 72 hpf.

3.5. Análise qualitativa em avaliação por espectrometria de massas utilizando Zebrafish

3.5.1. Permeação pela membrana do córion em embriões de Zebrafish

A análise qualitativa por espectrometria de massas dos peptídeos MKs, peptídeos análogos do estudo da hemolinfa e análogos de IsCT, foi realizada para avaliar o comportamento relacionado a permeação do córion do embrião de Zebrafish.

Os embriões foram colocados em contato com os peptídeos em diferentes concentrações de acordo com a CIM. Alíquotas de 20 µL foram retiradas de cada poço nos tempos de 0 hora e 6 hpf para as análises, sendo: A) amostra padrão = peptídeo + meio embriônico no tempo 0 hora; B) amostra = peptídeo + meio embriônico no tempo de 6 hpf.

3.5.2. Espectrometria de Massas

As análises por espectrometria de massas foram realizadas com a utilização de um sistema Electrospray - Ion trap (ESI/IT), modelo Amazon SL (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), acoplado a um sistema Ultra Fast Liquid Chromatography (UFLC) (Nexera-Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan). Para o controle de aquisição dos dados foram utilizados os softwares HyStar e Trap Control (BRUKER Daltonics) e LC Solution (SHIMADZU). O espectrômetro de massas foi operado no modo íon positivo, com scan num intervalo de 200 a 2200 m/z. As análises de espectrometria de massas sequenciais, ou seja, espectros de fragmentação em condições de decomposição induzida por colisão (CID) (MS₂) foram realizados utilizando-se os mesmos parâmetros dos experimentos de MS₁, exceto a varredura que foi feita num intervalo entre 50 e 2200 m/z. Foi utilizado Hélio como gás de colisão, a uma pressão de 100 kPa. O software Data Analysis (BRUKER Daltonics) foi utilizado para análise de dados.

3.6. Análise estatística

Os gráficos e análise estatística dos resultados foram realizados no programa Graph Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc., LaJolla, CA, EUA). Os dados dos testes de mecanismo de ação (iodeto de propídio) foram comparados utilizando análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste Dunnet. Os dados considerando a análise de sobrevivência *in vivo* foram comparados utilizando testes Mantel-cox (log-rank). O valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

PARTE 1

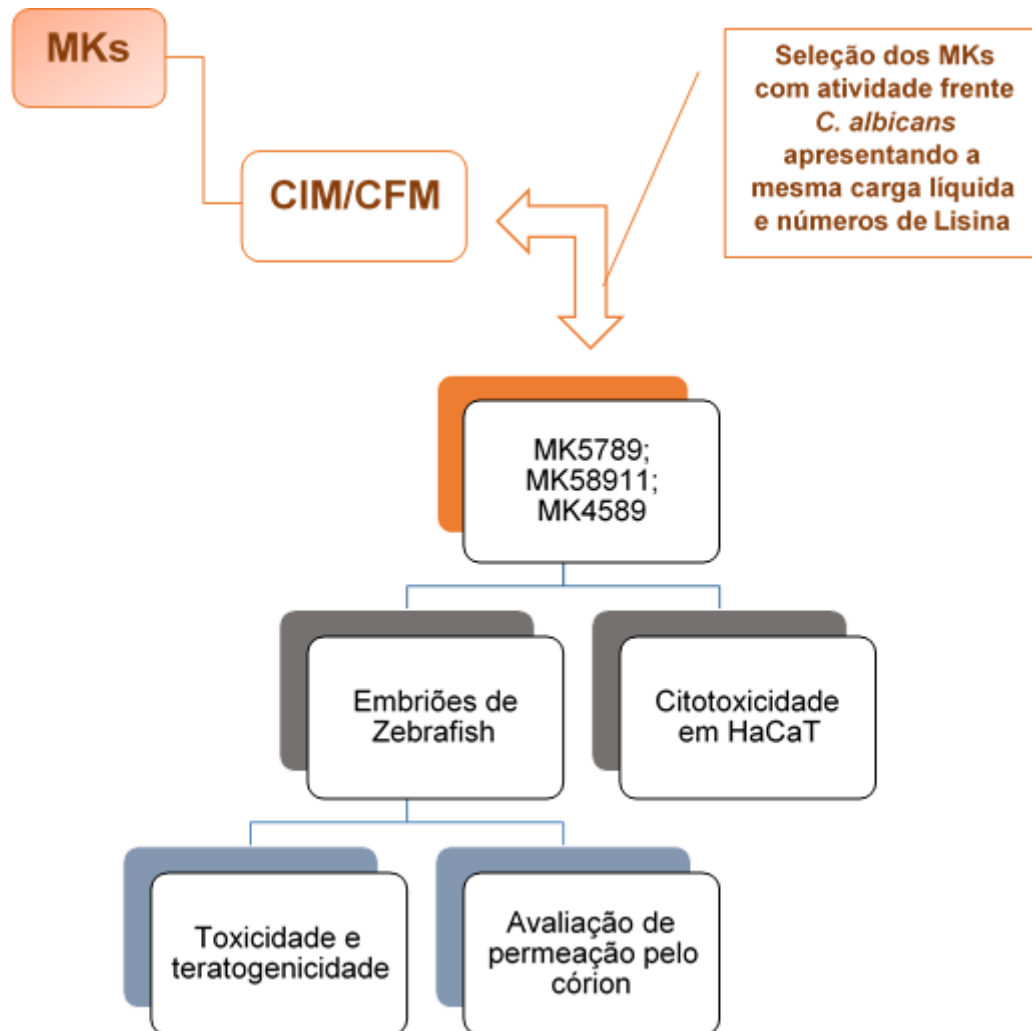
PEPTÍDEOS ANÁLOGOS DE MASTOPARANOS (MKs), DERIVADOS DA VESPA *Apoica pallens*

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a susceptibilidade de *C. albicans* aos peptídeos (MKs) previamente engenheirados e sintetizados;
- Selecionar os MKs com mesmo número de Lisina e carga líquida que apresentaram atividade anti-*C. albicans*;
- Aplicar testes de toxicidade e teratogenicidade com os MKs em embriões de Zebrafish;
- Verificar a citotoxicidade dos peptídeos em linhagem celular HaCaT;
- Avaliar a capacidade de permeação dos peptídeos pelo córion de embriões de Zebrafish.

2. METODOLOGIA ESPECÍFICA

Figura 2. Fluxograma representando a metodologia específica da parte 1.



2.1. Peptídeos modificados de Vespa

Foram utilizados peptídeos engenheirados análogos de mastoparanos (MKs) previamente caracterizados e sintetizados pelo grupo liderado pelo prof. Dr. Mario Sergio Palma do Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica (LBEZ) do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS)/ IB-UNESP - Rio Claro/SP, cedidos para a realização do presente trabalho.

2.2. Microrganismos e condições de crescimento

Vide Metodologia Geral na página 41.

2.3. Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

2.3.1. Ensaio de susceptibilidade (concentração inibitória mínima - CIM)

Vide Metodologia Geral na página 41.

2.3.2. Teste para determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Vide Metodologia Geral na página 42.

2.4. Avaliação da citotoxicidade em cultura celular

Vide Metodologia Geral na página 42.

2.5. Avaliação de Segurança em modelo Zebrafish

Vide Metodologia Geral na página 43.

2.6. Análise qualitativa em avaliação por espectrometria de massas utilizando Zebrafish

Vide Metodologia Geral na página 44.

2.7. Análise estatística

Vide Metodologia Geral na página 45.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estudo dos peptídeos de vespa

3.1.1. Peptídeos

Os peptídeos MKs foram engenheirados a partir de um peptídeo mastoparano já conhecido, com modificações pontuais de acordo com o número / posicionamento de resíduos de Lisina (**K**) e carga líquida (DE SOUZA et al., 2015). Estas modificações como também os resultados dos ensaios da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Estrutura primária, modificações e ensaios de susceptibilidade dos peptídeos MKs contra *C. albicans*: Massa Molecular (MM), sequência de aminoácidos, número de resíduos de Lisina (**K**), carga líquida (Q), Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).

Peptídeo	MM (Da)	Sequência	K	Q	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
MK89	1526,93	INWLAIAKKVAGMLNH ₂	2	+3	15,62	15,62
MK9	1469,84	INWLAIAAKVAGMLNH ₂	1	+2	>250	-
MK5789	1641,12	INWLKIKKKVAGMLNH ₂	4	+5	62,5	62,5
MK58911	1641,12	INWLKIAKKVKGMLNH ₂	4	+5	15,62	15,62
MK4589	1599,04	INWKKIAKKVAGMLNH ₂	4	+5	15,62	15,62
MK4578911	1713,23	INWKKIKKKVKGMLNH ₂	6	+7	62,5	62,5
Anfotericina B	924,08	-	-	-	0,25	0,25
Fluconazol	306,27	-	-	-	1,00	-

De acordo com a tabela 1, os peptídeos MKs apresentaram uma alta inibição de crescimento do fungo, com exceção do MK9 cuja atividade anti-*C. albicans* se mostrou baixa nas concentrações testadas.

Em um estudo de um peptídeo extraído do veneno da vespa *Pseudopolybia vespiceps*, da classe dos mastoparanos, característicos por provocar a lise celular, foi avaliada a sua atividade contra *C. albicans*, o qual apresentou um valor de CIM de 24,7 µg/mL (SILVA et al., 2017). Em outros estudos, dois peptídeos extraídos da vespa *Polybia paulista* foram testados contra *C. albicans*. O peptídeo Polybia-MPI (IDWKKLLDAAKQIL-NH₂) apresentou uma CIM de 26,4 µg/mL (WANG et al., 2014), enquanto o peptídeo Polybia CP (ILGTILGLLKSL-NH₂), um peptídeo pequeno, de 12 resíduos de aminoácidos apresentou uma CIM de 19,8 µg/mL (WANG et al.,

2016). Com base nestes valores, com exceção do peptídeo MK9, todos os peptídeos testados tiveram um valor de CIM considerável, podendo destacar a atividade inibitória com CIM que variaram de 62,5 a 15,62 µg/mL.

DE SOUZA et al., 2015 observaram que para otimizar a atividade antimicrobiana dos mastoparanos, é importante ter os posicionamentos dos resíduos de Lisina em posições estratégicas da estrutura primária, como por exemplo entre 4, 5, 7, 8, 9 e 11 da cadeia tetradecapeptídica, sendo que as outras posições podem ser de resíduos hidrofóbicos, com resíduo C-terminal na forma amidada. Desta forma, pode-se manter a estabilidade do segmento de hélice, resultando em uma superfície hidrofóbica mais definida e homogênea em uma estrutura anfipática, favorecendo a interação dos peptídeos com os fosfolípidios das membranas celulares e contribuindo também para uma eficiência lítica dos mastoparanos.

Levando em consideração os resultados de CIM e CFM, os peptídeos MK5789, MK58911 e MK4589 foram selecionados para continuidade dos estudos, por apresentarem a mesma quantidade de resíduos de Lisina distribuídos em diferentes posições na cadeia, como também a mesma carga líquida (tabela 1), na tentativa de avaliar se estas mudanças são capazes de provocar algum resultado diferenciado nos ensaios abordados.

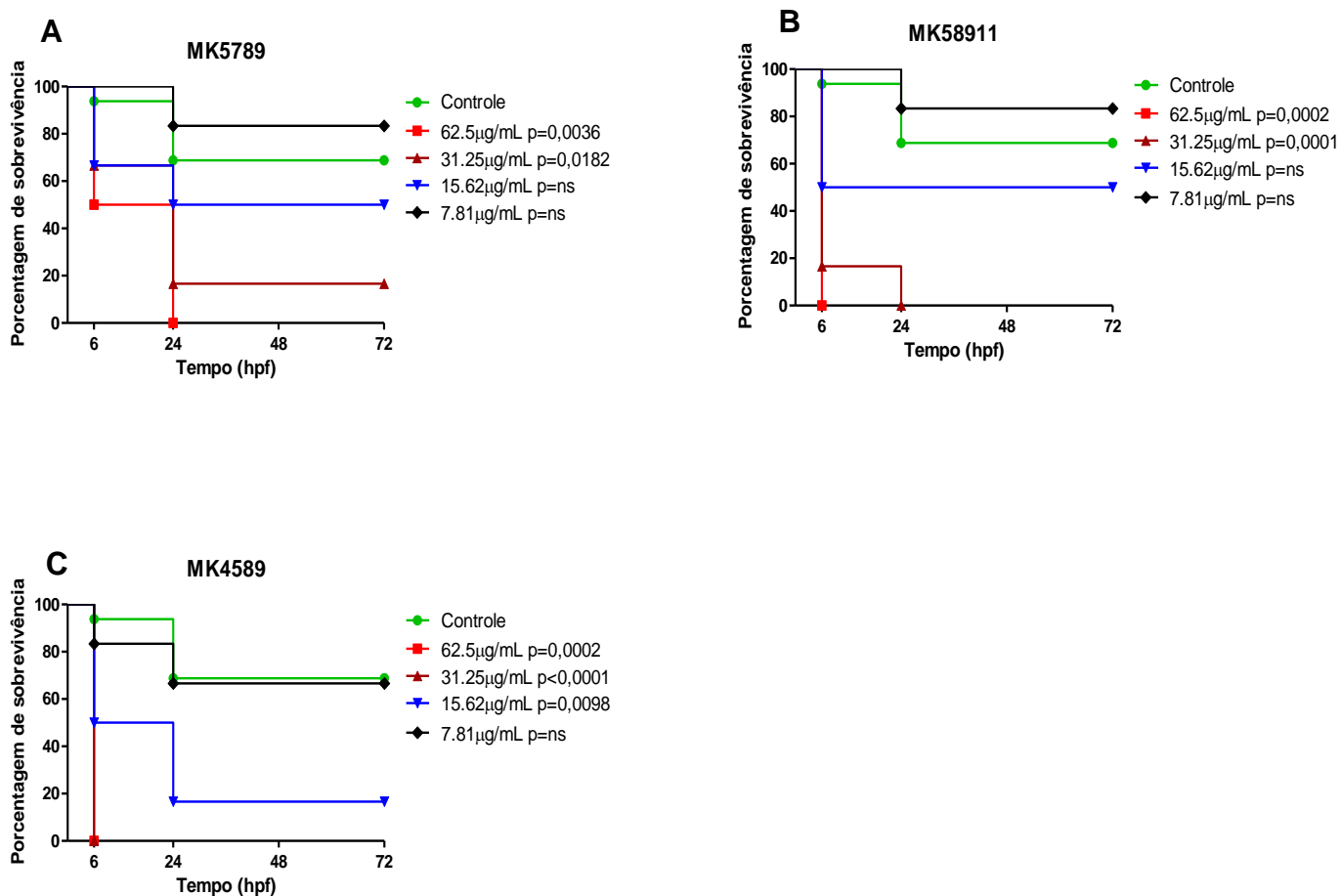
3.1.2. Avaliação de segurança dos MKs em embriões de Zebrafish

O teste para analisar toxicidade e teratogenicidade em embriões de Zebrafish vem ganhando cada vez mais destaque, pois é a única alternativa que possibilita o estudo de estágios iniciais de um desenvolvimento bem caracterizado de um embrião vertebrado, tudo isso devido a transparência desde a fase embrionária até a larval (GILBERT, 2000; HILL et al., 2005; HERMSEN et al., 2011).

A taxa de sobrevivência dos embriões expostos aos peptídeos MKs selecionados foi analisada em diferentes estágios de desenvolvimento até 72 horas pós fertilização (hpf). O efeito tóxico no desenvolvimento embrionário foi determinado como concentração dependente dos peptídeos (Figura 3). Os peptídeos MK5789 e MK58911 apresentaram baixa toxicidade nos embriões com valores de CL₅₀ de 15,62 e 13,02 µg/mL, respectivamente, enquanto MK4589 apresentou CL₅₀ de 9,64 µg/mL, em 72 hpf, com a taxa de sobrevivência do controle em torno de 70%.

As curvas de sobrevivência dos grupos tratados nas concentrações de 62,5 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$, tanto para MK5789 quanto para MK58911 foram estatisticamente diferentes quando comparado ao grupo não tratado, e nas demais concentrações (15,62 e 7,81 $\mu\text{g/mL}$) não mostrou ser diferente estatisticamente em relação ao grupo controle. Logo para MK4589, os grupos de 62,5, 31,25 e 15,62 $\mu\text{g/mL}$ foram estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle, e a concentração de 7,81 $\mu\text{g/mL}$ não mostrou nenhuma diferença estatística.

Figura 3. Porcentagem de sobrevivência dos embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações dos peptídeos MK5789 (A); MK58911 (B); MK4589 (C), até 72 horas pós fertilização (hpf) ($p < 0,05$).

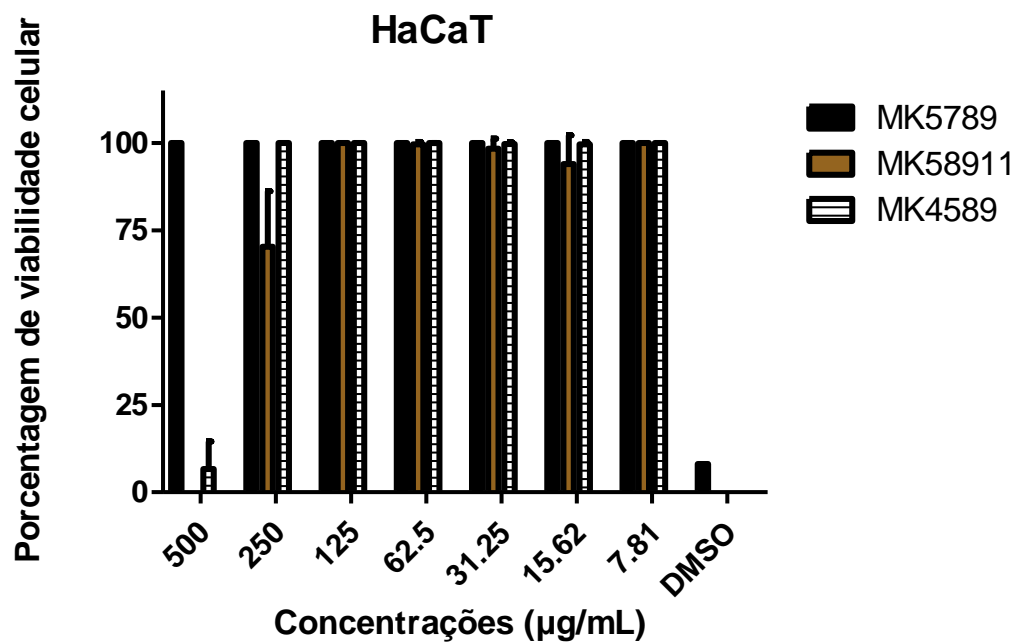


3.1.3. Avaliação da citotoxicidade em cultura celular

A linhagem celular utilizada neste ensaio de citotoxicidade foi queratinócito de pele humana (HaCaT). Essa linhagem é de bastante interesse uma vez que *C. albicans* é prevalente em infecções que acometem a pele, unhas, regiões genitais,

entre outras. O gráfico abaixo corresponde à porcentagem de viabilidade para linhagem celular HaCaT nas concentrações de 500 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$ dos peptídeos MKs selecionados (figura 4).

Figura 4. Porcentagem de viabilidade na linhagem celular HaCaT expostas a diferentes concentrações dos peptídeos MKs, e Dimetil sulfóxido (DMSO) usado como controle positivo.



Além dos resultados apresentados no gráfico, a tabela abaixo corresponde a concentração inibitória 50% (CI50) e índice de seletividade (IS), que é calculado pela razão entre o valor de CI50 e CIM, frente aos peptídeos MKs (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), concentração inibitória 50% (CI50) e índice de seletividade (IS) para linhagem celular HaCaT referente aos três MKs.

Peptídeos	CIM (µg/mL)	CI50-HaCaT	IS (CI50/CIM) HaCaT
MK5789	62,5	>500	>8
MK58911	15,62	500-250	32,01-16,00
MK4589	15,62	500-250	32,01-16,00

Como pode ser observado no gráfico, os três MKs apresentaram baixa toxicidade celular, com MK5789 apresentando 100% de viabilidade celular em todas as concentrações testadas. Já MK58911 apresentou aproximadamente 80% de viabilidade celular na concentração de 250 µg/mL, sendo 100% viável em todas as demais concentrações; e o MK4589 com aproximadamente 20% de células viáveis na maior concentração, e com 100% de viabilidade nas outras concentrações.

O índice de seletividade (IS) é considerado um parâmetro vital no desenvolvimento de novos antifúngicos, uma vez que considera a proporção entre a segurança e a potência de um composto. O IS que estiver com valor igual ou maior que 10 é considerado um composto altamente seletivo, destacando assim os três MKs testados (VICENTE et al., 2009, OCHOA-PACHECO et al., 2017; ORME et al., 2001).

3.1.4. Análise qualitativa da permeação do córion em avaliação por espectrometria de massas

Os três MKs (MK5789, MK58911 e MK4589) foram avaliados quanto à permeação do córion do embrião de Zebrafish por espectrometria de massas.

Foi possível identificar pelo espectro ESI-MS¹ referente ao peptídeo MK5789 (m/z 1640,86), dois picos de m/z 820,94 e 547,62, correspondente aos íons moleculares na forma de [M+2H]²⁺ e [M+3H]³⁺ respectivamente (Figura 5A); para o peptídeo MK58911 (m/z 1640,86), dois picos de m/z 820,95 e 547,98, correspondente aos íons moleculares de [M+2H]²⁺ e [M+3H]³⁺, respectivamente (Figura 6 A e B); e para o peptídeo MK4589 (m/z 1598,87), dois picos de m/z 799,94

e 533,64, correspondente aos íons moleculares $[M+2H]^{2+}$ e $[M+3H]^{3+}$, respectivamente (Figura 7 A e B).

Figura 5. Espectro MS¹ para o peptídeo MK5789 (62,5 µg/mL): A) Amostra padrão: mostrando os picos de m/z 820,94 e 547,62, correspondente aos íons moleculares $[M+2H]^{2+}$ e $[M+3H]^{3+}$, respectivamente (setas verdes); B) Amostra 6 hpf: os íons m/z $[M+2H]^{2+}$ e $[M+3H]^{3+}$ não foram observados.

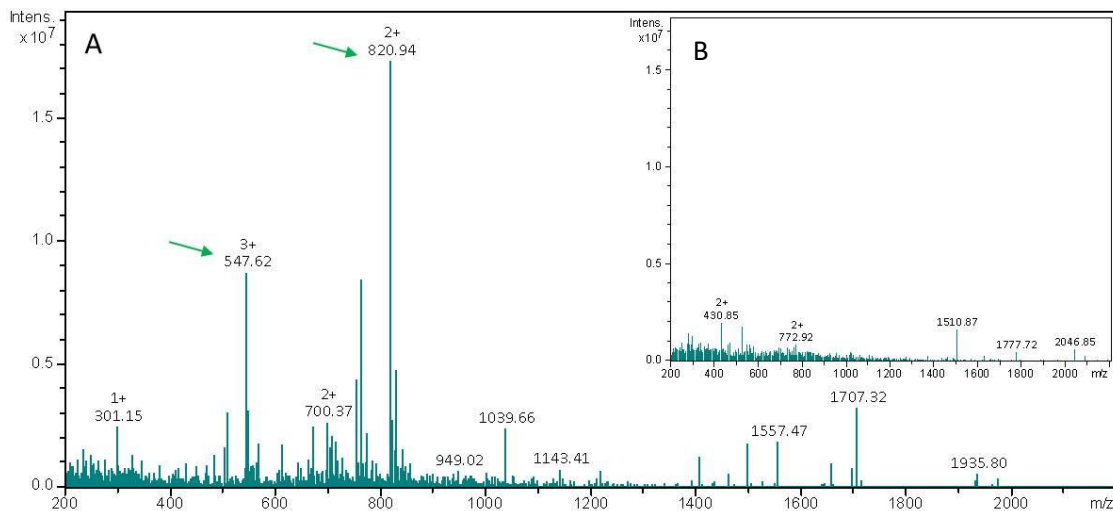


Figura 6. Espectro MS¹ para o peptídeo MK58911 (62,5 µg/mL): A) Amostra padrão: mostrando os picos de m/z 820,95 e 547,98, correspondente aos íons moleculares $[M+2H]^{2+}$ e $[M+3H]^{3+}$, respectivamente (setas vermelhas); B) Amostra 6 hpf: os íons m/z $[M+2H]^{2+}$ e $[M+3H]^{3+}$ (m/z 820,97 e 547,67) com baixa intensidade (setas vermelhas).

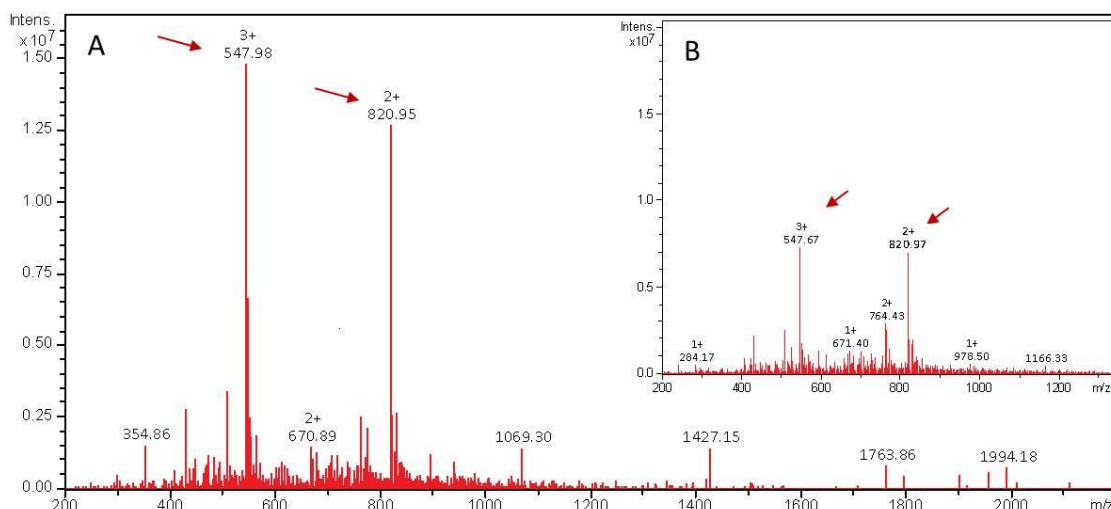
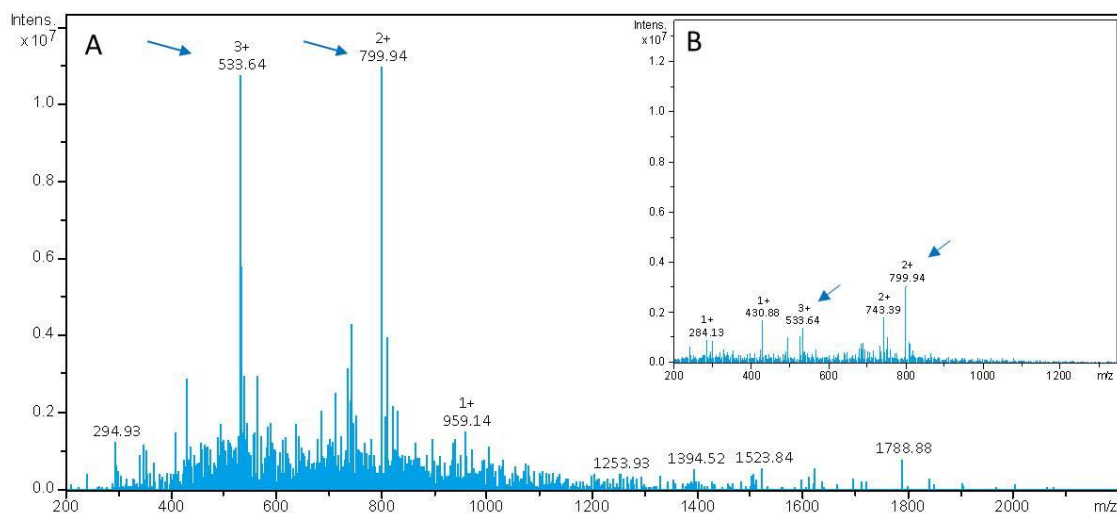


Figura 7. Espectro MS¹ para o peptídeo MK4589 (62,5 µg/mL): A) Amostra padrão: mostrando os picos de m/z 799,94 e 533,64, correspondente aos íons moleculares [M+2H]²⁺ e [M+3H]³⁺, respectivamente (setas azuis); B) Amostra 6 hpf: os íons m/z [M+2H]²⁺ e [M+3H]³⁺ (m/z 799,94 e 533,64) com baixa intensidade (setas azuis).



Após 6 hpf, observamos que na concentração de 62,5 µg/mL, os peptídeos MK58911 e MK4589 apresentaram 100% de mortalidade do embrião, já o MK5789 apresentou 50% de mortalidade (Figura 3). Pelos espectros apresentados acima (Figuras 4, 5 e 6), foi possível observar que o peptídeo MK5789 teve permeação total pelo córion, pois os íons moleculares não apareceram no espectro de 6 hpf. Os outros MKs apresentaram permeação parcial, pois é possível visualizar, em intensidades menores, os picos relacionados aos íons moleculares dos peptídeos, comparados com seus tempos de 0 hora.

Sendo assim, analisando todos os resultados obtidos, na concentração de 62,5 µg/mL, MK5789 apresentou este mesmo valor como menor concentração que inibiu o crescimento fúngico (CIM), e também pelo que observamos na figura 4, este peptídeo teve permeação total pela membrana do córion do embrião em 6 hpf, sendo neste mesmo tempo, mantido uma sobrevivência de 50%.

Já MK58911 e MK4589 apresentaram mesmo valor de CIM de 15,62 µg/mL, e pelas figuras 5 e 6, podemos observar que ambos apresentaram permeação parcial pelo córion do embrião. Logo, em 6 hpf, ambos também tiveram resultado semelhante com 100% de mortalidade de Zebrafish. Estes resultados indicam que o

peptídeo MK5789 não teve o melhor valor de CIM para *C. albicans*, porém, apresentou ser o menos tóxico, pois teve sua permeação total, mantendo ainda uma sobrevivência dos embriões.

Com estes resultados, verificamos que as diferenças no posicionamento dos resíduos de Lisina na sequência peptídica, alteraram o comportamento dos peptídeos selecionados, com uma CIM variando de > 250 µg/mL até 15,62 µg/mL, baixas toxicidade e citotoxicidade, não teratogenicidade e comportamentos diferenciados quanto à permeação pela membrana do córion, sugerindo MK5789 como um potencial candidato para futuros ensaios biológicos.

PARTE 2

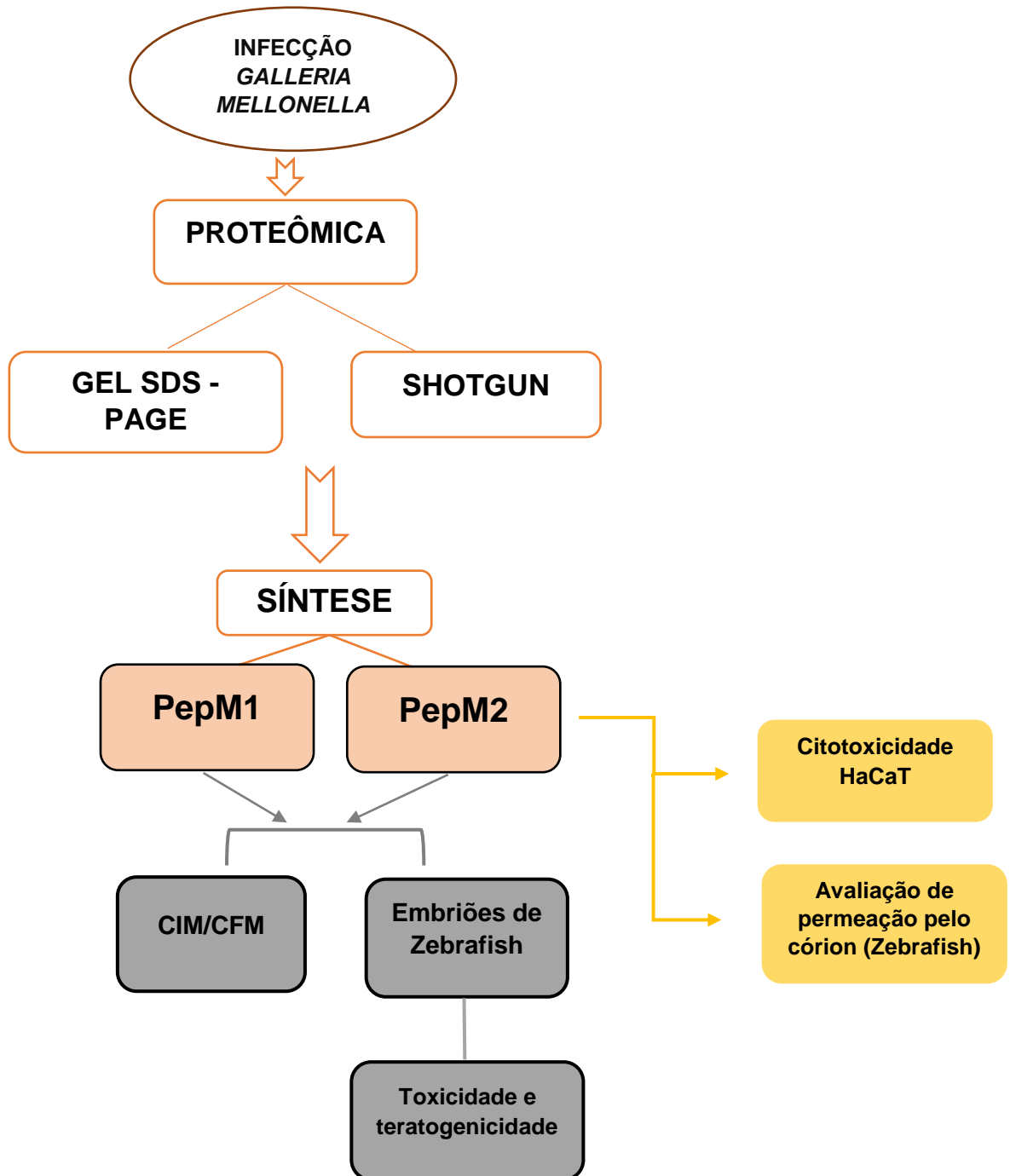
ESTUDO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS PRESENTES NA HEMOLINFA DE *Galleria mellonella*

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Infectar larvas de *Galleria mellonella* com *C. albicans* para extração da hemolinfa;
- Avaliar o perfil proteico da hemolinfa de *Galleria mellonella* infectada e não infectada;
- Identificar por proteômica de Shotgun, os peptídeos antimicrobianos já descritos em literatura;
- Sintetizar análogos do peptídeo Moricin C3 (PepM1 e PepM2), selecionado entre os AMP`s de *Galleria mellonella* para realização dos ensaios biológicos;
- Verificar a susceptibilidade de *C. albicans* aos peptídeos sintetizados;
- Aplicar testes de toxicidade e teratogenicidade de PepM1 e PepM2 em embriões de Zebrafish;
- Verificar a citotoxicidade de PepM2 em linhagem celular HaCaT;
- Avaliar a capacidade de permeação de PepM2 pelo córion dos embriões de Zebrafish.

2. METODOLOGIA ESPECÍFICA

Figura 8. Fluxograma representando a metodologia específica da parte 2.



2.1. Extração da hemolinfa de *Galleria mellonella*

Grupos de 30 larvas da traça de cera *G. mellonella* com peso entre 0,15 e 0,20 g foram colocados em placas de Petri e incubados a 37 °C, na noite anterior aos experimentos. Dois grupos de 15 foram separados, sendo um deles utilizado como controle (injetando 10 µL de PBS na última pró-pata esquerda de cada larva). Para o desafio imunológico, suspensões fúngicas de *C. albicans* (ATCC 90028) foram preparadas em PBS em concentrações de 5×10^6 células/larva. A última pró-pata esquerda das larvas foi esterilizada com solução de etanol 70% e 10 µL da suspensão fúngica foi injetada com auxílio de uma seringa Hamilton. Após a inoculação, os grupos foram incubados a 37 °C por 48 horas para posterior extração da hemolinfa.

Após o período de incubação, as hemolinfas das larvas foram retiradas com auxílio de bisturi e colocadas imediatamente em eppendorf contendo acetona 90% banhado em gelo. As amostras foram centrifugadas a 4300 xg por 2 minutos, o sobrenadante foi recolhido e seco em concentrador de amostra tipo Speed-Vac, pesado e armazenado em -20 °C, e o precipitado recolhido e armazenado em -80 °C.

2.1.1. Determinação da concentração de proteínas totais

As proteínas foram quantificadas pelo método direto de absorvância de luz ultravioleta a 280 nm e determinados no espectrofotômetro (Epoch 2 – Biotek).

2.1.2. Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 1D)

Os perfis proteicos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio, SDS-PAGE, sob condições redutoras, utilizando sistema de tampão descontínuo de LAEMMLI (1970); STUDIER (1973).

Os componentes foram primeiramente separados em gel a 12% e em gel de empilhamento a 5% de acrilamida. Para a preparação desse gel foi usada solução estoque com 30% acrilamida e 0,8% bis-acrilamida (mix de acrilamida). Para o gel de separação, a polimerização foi feita em solução com 1,5 M de Tris- HCl, pH 8,8 e 0,4% de SDS, em presença de 0,1%v/v de N, N,N', N'- tetrametiletenodiamida (TEMED) e 0,1% de persulfato de amônio. O gel de empilhamento foi polimerizado

em presença de 0,5 M de Tris-HCl pH 6,8 e 0,4% de SDS, além de 0,1% de persulfato de amônio e 0,05% v/v de TEMED.

Para o preparo da amostra foi utilizada uma proporção 4:1 da amostra diluída em tampão de amostra (62,5 mM de Tris-HCl [tris (hidroxi-metil) aminometano] pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,5 M de ditiotreitol e 0,002% de bromofenol). As proteínas foram dissociadas em banho maria por 3 minutos. Foram aplicados 20 µg de cada amostra e 5 µg de padrão de Massa Molecular (GE healthcare protein mixture LMW 17044601). A corrida eletroforética foi realizada com tampão composto por Tris 0,075 M, glicina 0,57 M e SDS 0,1%, pH 8,3, e a voltagem utilizada foi 10 mA (50 V) até a penetração no gel de separação, e a seguir a 20 mA (120 V) até o final do gel. A revelação do gel foi feita utilizando Azul de Coomassie G-250, para visualização do perfil de bandas específico.

2.1.3. Abordagem proteômica por *shotgun*

Digestão enzimática do Precipitado

Após a quantificação da concentração proteica, uma massa correspondente a ~600 µg de proteínas de cada amostra foi desnaturada por Ureia 7,5 M e bicarbonato de amônia 50 mM, reduzida com DTT 100 mM, durante 60 minutos a 37 °C, e alquilada com iodoacetamida 400 mM, durante 60 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. As amostras foram diluídas em tampão bicarbonato de amônia 100 mM e CaCl₂ 1 M. A digestão das amostras ocorreu durante a noite com Tripsina (Promega) na proporção 1:100 (enzima: amostra), a 37 °C, sendo encerrada com adição de ácido fórmico. Os digestos foram dessalinizados em coluna SEP-PAK C18 (Waters) e então submetidos à secagem, pesagem e mantidos a -20 °C.

Espectrometria de Massas LC-MS/MS

Os digestos foram analisados por espectrometria de massas, onde foram aplicados 50 µL (~200 µg) de cada amostra com auxílio do injetor automático (SIL-20AXR, Shimadzu). As análises cromatográficas foram realizadas sob um gradiente: solução (A) – 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA) em água, solução (B) - 0,05% de TFA em acetonitrila (ACN); (2-45% de B (0-70 min), 45-60% de B (70-90 min), 60-90% de B (90-120min)), utilizando-se uma coluna XBrigde™ BEH300 C18

(2,1x100mm; 3,5µm) (Waters). A eluição dos componentes foi monitorada por absorvância a 215 nm, com fluxo de 0,2 mL/min.

Identificação

Para a identificação das proteínas, a busca foi executada com o software ProteinScape (versão 3.1, Bruker Daltonics) e o algoritmo Mascot (v2.3, Matrix Science, UK), realizando buscas contra o banco de dados *Galleria mellonella*.fasta.

Parâmetros utilizados:

- Enzima: Tripsina;
- Carbamidometilação (C) como modificação fixa;
- Oxidação (M), como modificação variável;
- N° de clivagens perdidas pela enzima: 2;
- Massa molecular do tipo: Monoisotópica;
- Massa molecular: sem restrições;
- Erro de tolerância de peptídeos $\pm 0,4$ Da e erro de tolerância de MSn $\pm 0,4$ Da;
- Protonação: +2, +3, +4 para o estado da carga dos peptídeos;
- Tipo de instrumento: ESI-Trap;
- Protein Scores significativos ($p < 0,05$);
- FDR < 1% (False Discovery Rate) para validar a identificação dos peptídeos.

2.2. Síntese dos peptídeos

Os peptídeos foram modificados de acordo com os estudos das características estruturais dos MKs e baseados nos estudos de literatura da hemolinfa de *Galleria mellonella*, sintetizando dois análogos de Moricin C3. A síntese foi realizada pela empresa Aminotech Pesquisa e Desenvolvimento Ltda. (São Paulo, BR), com grau de pureza 99%.

2.3. Microrganismos e condições de crescimento

Vide Metodologia Geral na página 41.

2.4. Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

2.4.1. Ensaio de susceptibilidade (concentração inibitória mínima - CIM)

Vide Metodologia Geral na página 41.

2.4.2. Teste para determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Vide Metodologia Geral na página 42.

2.5. Avaliação da citotoxicidade em cultura celular

Vide Metodologia Geral na página 42.

2.6. Avaliação de Segurança em modelo Zebrafish

Vide Metodologia Geral na página 43.

2.7. Análise qualitativa em avaliação por espectrometria de massas utilizando Zebrafish

Vide Metodologia Geral na página 44.

2.8. Análise estatística

Vide Metodologia Geral na página 45.

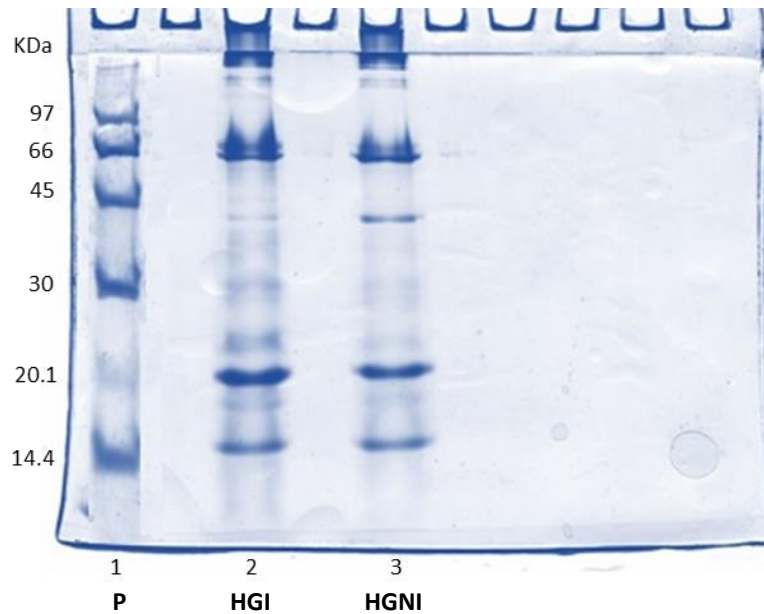
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise do perfil proteico da hemolinfa de *Galleria mellonella*

3.1.1. Estudo dos precipitados da extração da hemolinfa – SDS Page e shotgun

Após a centrifugação do extrato da hemolinfa infectada (HGI) e não infectada - controle (HGNI), os precipitados foram avaliados quanto ao conteúdo proteico por gel SDS-PAGE 1D, no qual foi possível validar o protocolo de precipitação utilizado. Bandas de proteínas foram visualizadas em perfis distintos para cada amostra. (Figura 9).

Figura 9. Gel SDS-PAGE 12% dos precipitados da extração da hemolinfa. 1- Padrão de proteínas - P (kDa); 2- Hemolinfa infectada - HGI; 3- Hemolinfa controle - HGNI.



Posteriormente, as amostras HGI e HGNI foram digeridas e analisadas pela estratégia de shotgun, com objetivo de identificar os principais peptídeos/proteínas com atividade antimicrobiana já descritos em literatura. Estes resultados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Principais peptídeos/proteínas com atividade antimicrobiana descritos em literatura com seus respectivos números de acesso, massa molecular e score.

Accession	Protein	MM [kDa]	Scores HGNI	Scores HGI
CAA07363.1	apolipoporphin III [Galleria mellonella]	20,4	736,7	798,2
AAT76806.1	apolipoporphin, partial [Galleria mellonella]	167,2	2347,0	2512,2
AAA85089.1	gallerin [Galleria mellonella]	22,5	55,3	66,4
ACU09501.1	hemolin [Galleria mellonella]	46,9	84,8	114,0
ABQ42574.1	moricin-like peptide B [Galleria mellonella]	7,0	56,0	59,7
ABQ42575.1	moricin-like peptide C1 [Galleria mellonella]	6,6	38,3	52,0
ABQ42577.1	moricin-like peptide C3 [Galleria mellonella]	6,5	55,1	49,1
ABQ42578.1	moricin-like peptide C4 [Galleria mellonella]	6,6	41,1	53,2
ABQ42580.1	moricin-like peptide D [Galleria mellonella]	6,6	39,7	39,7
AAN15786.1	peptidoglycan recognition-like protein B, partial [Galleria mellonella]	16,3	49,0	54,4
ACQ99193.1	proline-rich protein [Galleria mellonella]	23,0	100,8	119,8
P85216.1	RecName: Full=Anionic antimicrobial peptide 2	7,0	207,8	254,0
P85210.1	RecName: Full=Cecropin-D-like peptide	4,3	111,2	92,9
P82174.2	RecName: Full=Lysozyme; AltName: Full=1,4-beta-N-acetylmuramidase	14,0	202,0	263,7

Com base na literatura, sabe-se que o estudo da atividade antifúngica de peptídeos de *G. mellonella* ainda é escasso, sendo uma área de amplo interesse que necessita ser mais explorado.

Primeiro relato do peptídeo Moricin foi a partir da sua identificação em estudos da hemolinfa de larvas de *Bombyx mori*, imunizadas com *E. coli*, apresentando 42 resíduos e altamente básico. Estudos de ressonância magnética nuclear demonstraram que a estrutura do Moricin contém uma longa alfa-hélice, sendo o segmento N-terminal da alfa-hélice anfipática e o C-terminal hidrofóbico, importante para sua atividade antimicrobiana (HEMMI et al., 2002; OIZUMI et al., 2005; DAI et al., 2008; HARA & YAMAKAWA, 1995). De acordo com Yi et al., 2014, Moricins são sintetizados, secretados como proteínas segregadas após a clivagem dos peptídeos sinalizadores. Em um estudo feito por BROWN et al., 2008, a família de moricin-like foi testada contra alguns fungos filamentosos e considerando o moricin C3-like deste estudo, houve atividade apenas contra dois fungos, com CIM

de 39,23 µg/mL e 392 µg/mL (*Fusarium graminearum* e *Fusarium oxysporum*, respectivamente).

Após considerar a busca no banco de dados, estudos da literatura, e observar os resultados obtidos dos MKs, considerando o número de resíduos de Lisinas, a carga líquida e a distribuição em relação à fração hidrofóbica na cadeia peptídica, selecionamos um peptídeo da hemolinfa de *G. mellonella* que já tem sua atividade antimicrobiana descrita em literatura, conhecido como Moricin C3. Com base nestas características, engenheiramos dois peptídeos análogos e solicitamos as suas sínteses (figura 10). Em um primeiro momento, o peptídeo PepM1, modificado com base na região de Moricin C3 que apresentava maior número de resíduos de Lisina, originou um peptídeo curto, com 14 resíduos de aminoácidos, 05 resíduos de Lisina, com uma inserção amida na porção C-terminal e apresentando carga líquida +6. Esta amidação que pode ser natural ou inserida por síntese, é relatada por proporcionar o aumento da atividade em AMP`S, como melhorar a estabilidade dos peptídeos (WEIE BOBEK, 2005; KATAYAMA, et al. 2002).

Moricin C3 apresenta em sua estrutura uma sequência de 23 resíduos de aminoácidos na região N-terminal, correspondente a um “peptídeo sinal” (UniProtKB - A5JSU9 (A5JSU9_GALME)). Geralmente, o peptídeo sinal possui entre 15 e 30 resíduos de aminoácidos localizado na região N-terminal de proteínas. Muitas proteínas necessitam ser exportadas para a região específica onde exercerão suas funções, sendo a sequência sinal normalmente removida na proteína (ALBERTS, et al. 2008). O segundo peptídeo análogo PepM2 foi sintetizado sem a sequência peptídeo sinal. Considerando um número máximo de 35 resíduos de aminoácidos para a síntese, optamos por retirar os 5 resíduos da região N-terminal (DPKVP), preservando uma porção polar C-terminal e adicionando uma amidação nesta região.

Figura 10. Alinhamento Moricin C3, PepM1 e PepM2 com suas respectivas informações.



Para a síntese, a massa molecular também foi considerada devido a permeação pelo córion do embrião de Zebrafish, já que estudos indicam que sua permeabilidade muda com o tempo, e que apenas ultrapassam o córion moléculas de tamanho máximo até 3000 a 4000 Da (CRETON, 2004; HENN, 2011). Desta forma, após a síntese, estes peptídeos foram testados contra *C. albicans* em ensaios de susceptibilidade (CIM) e CFM. Os resultados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Peptídeos análogos de *Galleria mellonella* com os valores de massa molecular (MM), número de Lisina (K), carga líquida (Q), concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM).

Peptídeos	MM (Da)	K	Q	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
PepM1	1408,96	5	+6	>250	-
PepM2	3599,20	6	+7	250	250
Anfotericina B	924,08	-	-	0,25	0,25
Fluconazol	306,27	-	-	1	-

Comparando com a atividade antimicrobiana obtida dos MKs, PepM1 não apresentou uma atividade anti-*C. albicans* favorável, não tendo uma inibição de crescimento deste fungo nas concentrações testadas. Já PepM2 teve CIM e CFM no valor de 250 µg/mL, mostrando que a modificação estrutural realizada promoveu uma atividade frente *C. albicans*, sendo considerado um resultado inédito na literatura.

3.1.2. Avaliação de segurança de PepM1 e PepM2 em embriões de Zebrafish

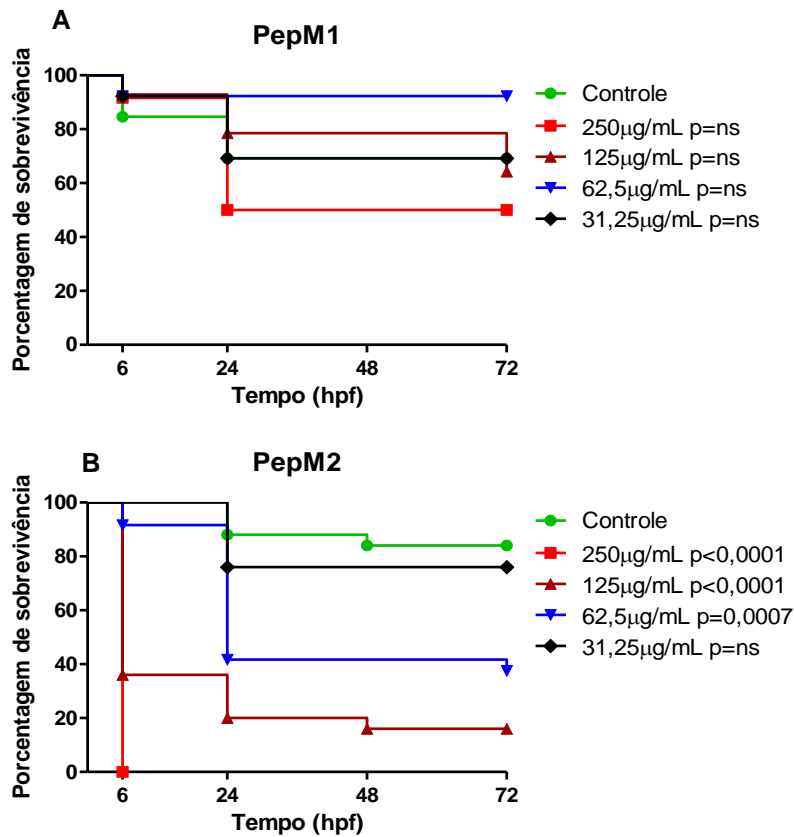
Após realizarmos o teste de inibição de crescimento fúngico com PepM1 e PepM2, os peptídeos foram avaliados quanto à segurança em embriões de Zebrafish, em quatro concentrações (250 – 31,25 µg/mL) e os resultados são observados na figura 11.

O peptídeo PepM1 teve CL₅₀ de 250 µg/mL, e nas demais concentrações apresentou taxa de sobrevivência acima de 60%, o que o diferencia dos outros peptídeos deste estudo (MKs, PepM2) pela baixa toxicidade, com sobrevivência de 70% do controle. Além disso, as curvas de sobrevivência dos grupos tratados não foram estatisticamente diferentes do grupo controle (não tratado).

O peptídeo PepM2 na concentração de 250 µg/mL apresentou 100% de mortalidade em 6 hpf e na concentração de 125 µg/mL obteve 20% de sobrevivência dos embriões até o fim do experimento (72 hpf). O valor de CL₅₀ ficou entre 62,5 e 31,25 µg/mL, com uma sobrevivência de 37,5% e 76% respectivamente. Este composto obteve também um resultado concentração dependente, e pode ser observado pelas curvas de sobrevivência uma diferença estatística significativa para os grupos tratados (250, 125 e 62,5 µg/mL) em relação ao não tratado, e para o grupo tratado com a menor concentração (31,25 µg/mL) não houve diferença estatística quando comparado ao grupo controle.

Em relação a toxicidade, podemos comparar entre os MKs, PepM1 e PepM2, observando um resultado muito promissor para PepM1, pois na maior concentração testada (250 µg/mL), os embriões permaneceram 50% vivos até o fim do experimento, sendo que os MKs, na concentração de 62,5 µg/mL que foi a maior testada (devido ao CIM), apresentaram alta mortalidade já com 6 hpf. O PepM2 apresentou-se mais tóxico aos embriões na concentração de 250 µg/mL, tendo 100% de morte já nas primeiras 6 hpf.

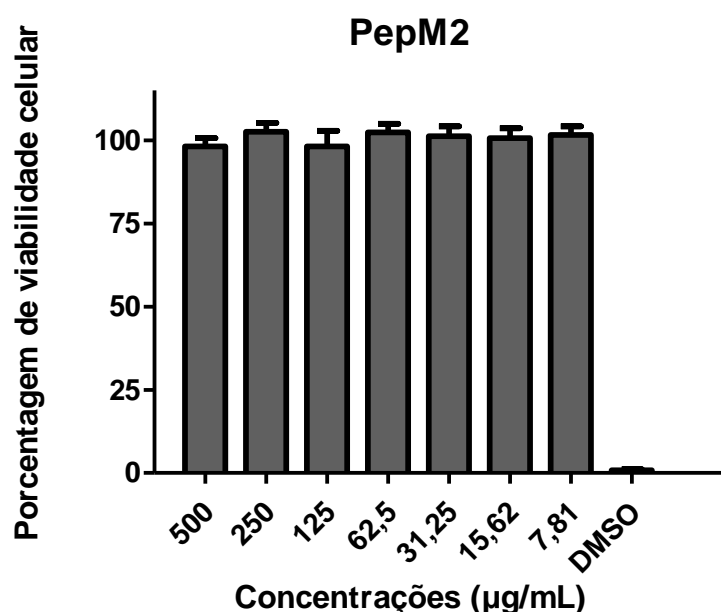
Figura 11. Porcentagem de sobrevivência dos embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações do peptídeo PepM1 (A) e PepM2 (B), até 72 horas pós fertilização (hpf).



3.1.3. Avaliação da citotoxicidade em cultura celular

Este ensaio foi realizado somente com PepM2, uma vez que apenas ele apresentou atividade contra *C. albicans*. O gráfico abaixo corresponde à porcentagem de viabilidade para linhagem celular HaCaT nas concentrações de 500 a 7,81 µg/mL (figura 12).

Figura 12. Porcentagem de viabilidade na linhagem celular HaCaT expostas a diferentes concentrações de PepM2, e Dimetil sulfóxido (DMSO) usado como controle positivo.



Além dos resultados apresentados no gráfico, a tabela abaixo corresponde a concentração inibitória 50% (CI50) e índice de seletividade (IS) frente ao PepM2 (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), concentração inibitória 50% (CI50) e índice de seletividade (IS) para linhagem celular HaCaT referente ao PepM2.

Peptídeo	CIM (µg/mL)	CI50-HaCaT	IS (CI50/CIM) HaCaT
PepM2	250	>500	>2

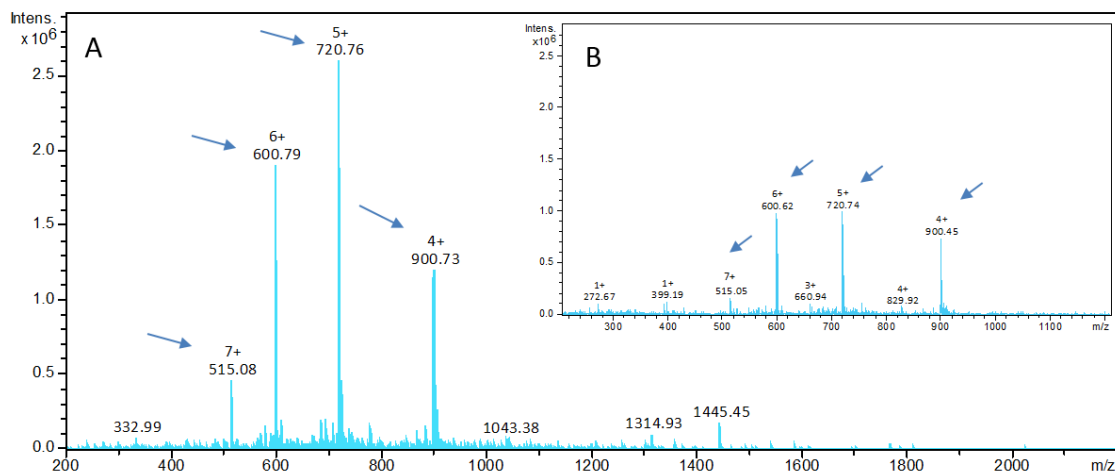
O índice de seletividade é um parâmetro no qual representa o grau de seletividade antimicrobiana, e quanto maior o seu valor, acredita-se ter um composto mais seletivo para membranas microbianas do que mamíferas (Xiang et al., 2017). Apesar de PepM2 ter apresentado um IS aparentemente baixo, porém

não determinante, a citotoxicidade foi destacável e importante, pois teve 100% de células viáveis em todas as concentrações, inclusive na maior testada (500 µg/mL) frente a linhagem celular HaCaT.

3.1.4. Análise qualitativa da permeação do córion em avaliação por espectrometria de massas

Como PepM2 apresentou atividade frente *C. albicans*, após ser realizado o ensaio de toxicidade em embriões de Zebrafish, alíquotas foram retiradas em 0 hora e 6 hpf, da concentração de CIM (250 µg/mL) para análise de permeação pelo córion (Figura 13).

Figura 13. Espectro MS¹ para o peptídeo PepM2 (250 µg/mL): A) Amostra padrão: mostrando os picos de m/z 515,08, 600,79, 720,76 e 900,73, correspondente aos íons moleculares [M+7H]⁷⁺, [M+6H]⁶⁺, [M+5H]⁵⁺e [M+4H]⁴⁺ respectivamente (setas azuis); B) Amostra 6 hpf: os íons m/z [M+7H]⁷⁺, [M+6H]⁶⁺, [M+5H]⁵⁺e [M+4H]⁴⁺ (m/z 515,05, 600,62, 720,74 e 900,45) com baixa intensidade (setas azuis).



Pelos espectros da figura 13, o PepM2 permeou aproximadamente 50% o córion em 6 hpf, sendo observado pela presença dos íons [M+7H]⁷⁺, [M+6H]⁶⁺, [M+5H]⁵⁺e [M+4H]⁴⁺ (m/z 515,05, 600,62, 720,74 e 900,45) em baixa intensidade.

Observando estes resultados, na concentração de CIM (250 µg/mL), PepM2 apresentou 100% de mortalidade dos embriões em 6 hpf, sendo parcialmente absorvido pela membrana do córion, indicando que estudos posteriores podem ser ainda realizados na tentativa de otimizar o efeito tóxico.

Por todos os resultados obtidos, pode-se observar que PepM2 apresentou uma atividade contra *C. albicans*, além de baixa toxicidade, citotoxicidade e não-teratogenicidade em embriões de Zebrafish, entretanto, mostrou-se mais seletivo para membranas de mamíferos com um IS relativamente baixo quando comparados aos MKs, mas ainda com uma viabilidade celular máxima. PepM1 apresentou valor de CIM > 250 µg/mL, sem toxicidade e teratogenicidade em Zebrafish. Isso indica que as modificações feitas em Moricin C3 para as estruturas de PepM1 e PepM2 foram capazes de alterar tanto a atividade anti-*C. albicans* quanto o efeito tóxico em embriões, mostrando que o estudo de estruturas de peptídeos é muito desafiador, visando otimizar suas funcionalidades.

Apesar de PepM2 ter apresentado valor de CIM = 250 µg/mL sem indícios de teratogenicidade, trata-se de um peptídeo que apresenta 35 resíduos de aminoácidos em sua estrutura, dificultando a síntese e mais propenso a ação de proteases. Já PepM1 pode ser considerado para estudos futuros pois se trata de um peptídeo pequeno com 14 resíduos de aminoácidos, o que pode viabilizar novos estudos com alterações estruturais para otimizar sua atividade antifúngica, considerando uma possível síntese para um futuro medicamento.

PARTE 3

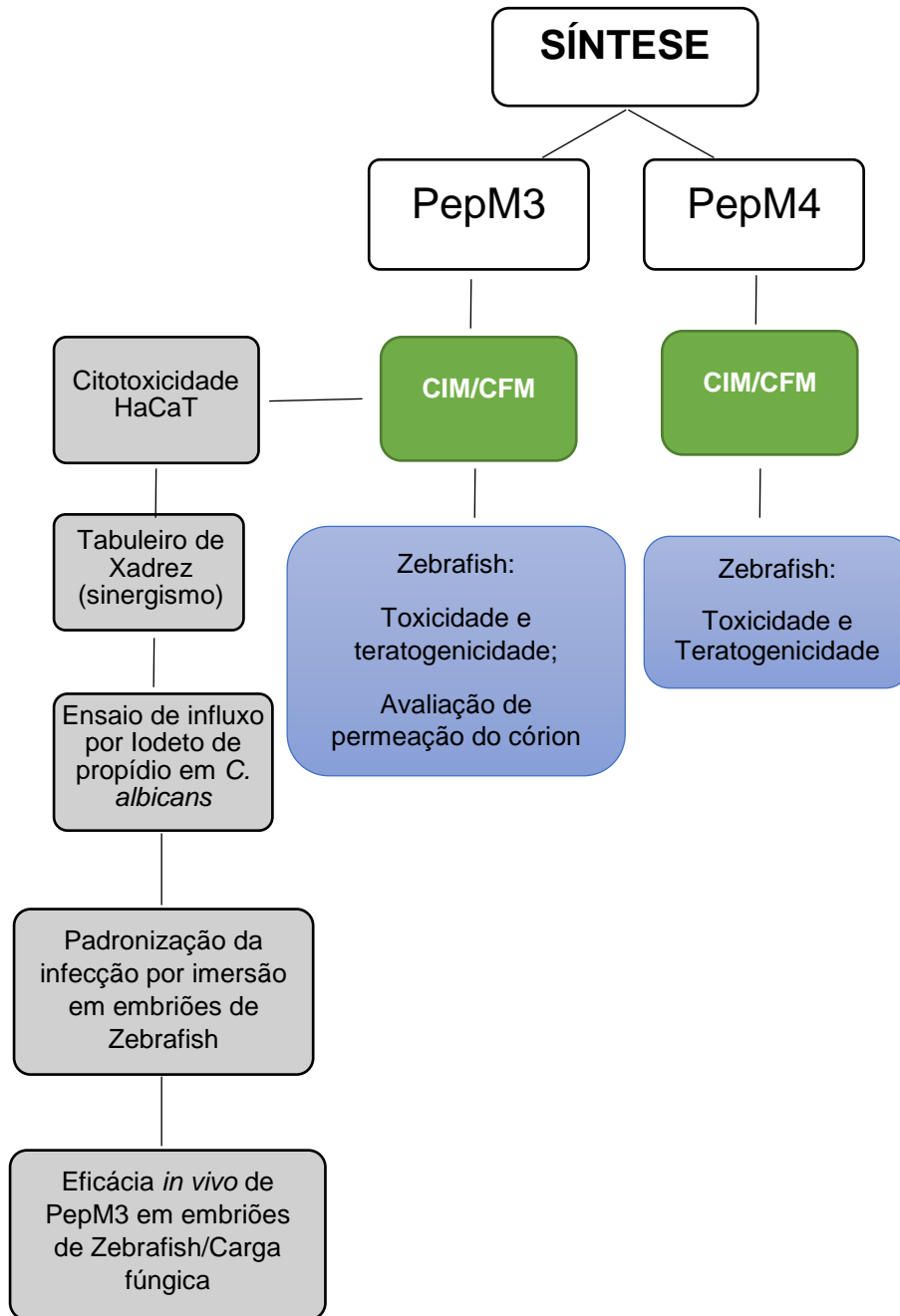
ESTUDO DOS PEPTÍDEOS ANÁLOGOS DE IsCT E PADRONIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR IMERSÃO EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Engenheirar dois peptídeos análogos de IsCT (PepM3, PepM4);
- Verificar a susceptibilidade de *C. albicans* aos peptídeos;
- Avaliar a toxicidade e teratogenicidade de PepM3 e PepM4 em embriões de Zebrafish;
- Verificar a citotoxicidade de PepM3 em linhagem celular HaCaT;
- Avaliar a permeação de PepM3 pelo córion de Zebrafish;
- Verificar o sinergismo de PepM3 com fluconazol e anfotericina B;
- Analisar o dano de membrana causado por PepM3 em *C. albicans*;
- Padronizar as condições do ensaio de infecção por imersão em embriões de Zebrafish;
- Testar a eficácia de PepM3 *in vivo* utilizando embriões de Zebrafish infectados com *C. albicans* e realizar a contagem de unidade formadora de colônia.

2. METODOLOGIA ESPECÍFICA

Figura 14. Fluxograma representando a metodologia específica da parte 3.



2.1. Peptídeos

Os peptídeos foram desenhados de acordo com os estudos das características estruturais dos MKs, PepM1, PepM2, e baseados em análogos de IsCT. A síntese foi realizada pela empresa Aminotech Pesquisa e Desenvolvimento Ltda. (São Paulo, BR), com grau de pureza 99%.

2.2. Microrganismos e condições de crescimento

Vide Metodologia Geral na página 41.

2.3. Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

2.3.1. Ensaio de susceptibilidade (concentração inibitória mínima - CIM)

Vide Metodologia Geral na página 41.

2.3.2. Teste para determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Vide Metodologia Geral na página 42.

2.4. Avaliação da citotoxicidade em cultura celular

Vide Metodologia Geral na página 42.

2.5. Avaliação de Segurança em modelo Zebrafish

Vide Metodologia Geral na página 43.

2.6. Análise qualitativa em avaliação por espectrometria de massas utilizando Zebrafish

Vide Metodologia Geral na página 44.

2.7. Avaliação do possível efeito sinérgico de PepM3 combinado a Fluconazol e Anfotericina B

Conforme resultado positivo contra *C. albicans* no teste de susceptibilidade (CIM/CFM), o peptídeo PepM3 foi analisado quanto a um possível efeito sinérgico entre PepM3 X Fluconazol e PepM3 X Anfotericina B frente a *C. albicans*, através do teste de tabuleiro de xadrez.

O inóculo foi o mesmo utilizado no teste de susceptibilidade ($2,5 \times 10^3$ células/mL), com as concentrações do PepM3 variando entre 1,95 a 250 µg/mL. Os antifúngicos padrões utilizados, Fluconazol (Flu) e Anfotericina B (Anfo) foram

testados em concentrações que variaram de 0,03125 a 16 µg/mL e 0,0078 a 4 µg/mL, respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas sob agitação, e o crescimento fúngico visual foi verificado para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Em seguida, o coeficiente de interação foi avaliado pela concentração fracional inibitória (CFI) de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{CFI} = \frac{\text{CIM PepM3 em combinação}}{\text{CIM PepM3 sozinho}} + \frac{\text{CIM Flu/Anfo em combinação}}{\text{CIM Flu/Anfo sozinho}}$$

A interação entre os agentes foi definida como: sinérgico se $\text{CFI} \leq 0,5$; indiferente se $0,5 < \text{CFI} \leq 4$; e antagonista se $\text{CFI} > 4$ (ZHANG et al., 2013).

2.8. Ensaio de influxo por Iodeto de Propídio

Este ensaio foi realizado de acordo com CHOI & LEE, 2014 e SPADARI et al., 2018, porém com modificações. Uma suspensão fúngica de *C. albicans* (1×10^6 células/mL) foi preparada em meio RPMI e 100 µL desta foi tratada com 100 µL de PepM3 (250 e 125 µg/mL, sendo 2 x CIM e CIM, respectivamente). Apenas um controle foi utilizado, o Fluconazol (2 e 1 µg/mL, 2 x CIM e CIM, respectivamente). Além disso, um poço para controle positivo (avaliação do crescimento fúngico sem tratamento) foi utilizado. A placa foi incubada por 24 horas a 37 °C com rotação a 150 rpm. Em seguida, 20 µL de iodeto de propídio para atingir a concentração final de 10 µg/mL foram adicionados aos poços para análise de permeabilidade de membrana, e a placa incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, com proteção de luz. Logo, as células foram analisadas por citometria de fluxo (BD FACSCanto).

2.9. Padronização da infecção por imersão em embriões de Zebrafish

O ensaio de infecção por imersão foi feito de acordo com CHEN et al., (2015) com modificações. Para realizar esta metodologia, foram testadas condições essenciais no intuito de visualizar uma infecção estabelecida, tais como diferentes meios, temperatura, inóculo e tempo de infecção.

Os embriões de Zebrafish e o fungo *C. albicans* foram marcados com Isotiocianato de Fluoreceína Isomero I (FITC-Sigma F7250) e Calcofluor, respectivamente, com intuito de visualizar se a *Candida* foi capaz de penetrar no interior do embrião ou se apenas permanecia aderido ao córion. Desta forma, foram realizados testes com a solubilidade do FITC em água, uma vez que a diluição padrão é feita em acetona e a concentração exigida pela bula deste solvente é letal ao embrião. Finalmente após realizar estes testes, o FITC foi solubilizado em água (100 µg/mL, concentração ajustada previamente suficiente para marcar o embrião), e esta quantidade foi colocada em contato com os embriões com 24 hpf, em placa de petri pequena juntamente com 500 µL de PBS por 20 minutos a 28 °C. Após este período, foi realizado a lavagem com 1 mL de PBS (três vezes). Para a marcação com Calcofluor, foi solubilizado 50 µL (100 µg/mL) deste com 1000 µL de PBS juntamente com um inóculo de 1×10^8 células/mL do fungo (este inóculo utilizado somente para marcação), e mantido em repouso por 45 minutos; foi realizado lavagem em PBS por três vezes e diluído para obter a concentração desejada de inóculo. Em seguida, os embriões foram colocados em microplaca de 96 poços com o meio embriônico juntamente com o inóculo de 1×10^6 células/mL ou $2,5 \times 10^3$ células/mL do fungo, no intuito de testar e padronizar qual a quantidade de célula mais apropriada para estabelecer esta infecção. A placa foi incubada a 30 °C por 1 a 4 horas com agitação a 80 rpm. Depois, as células não aderidas do fungo foram removidas, ME foi substituído e os embriões incubados novamente por 24 horas até leitura. O microscópio Confocal de Fluorescência (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan) foi utilizado para aquisição de imagens. Três experimentos independentes foram realizados.

2.10. Eficácia de PepM3 em embriões de Zebrafish

Após a padronização do inóculo, meio utilizado, temperatura e tempo suficientes para estabelecer a infecção em embriões de Zebrafish, o objetivo foi testar a eficácia antifúngica do PepM3 *in vivo*. Para isso, 100 µL do inóculo padronizado de 1×10^6 células/mL foi colocado em cada poço, em contato com embriões com 24 hpf (n=2 por poço, totalizando uma média de n=10 por grupo) juntamente com 100 µL de meio embriônico, e a placa de 96 poços foi incubada por 24 horas a 30 °C a 80 rpm, para estabelecimento da infecção. Posteriormente, o meio contendo as células não aderidas de *Candida albicans* foi retirado, foi feito o

processo de lavagem com 200 µL de meio embrionário três vezes no intuito de retirar todos os resquícios de fungo não aderidos. Em seguida, 100 µL de ME e 100 µL de PepM3 na concentração de CIM (125 µg/mL) e fluconazol (1 µg/mL) foram adicionados na mesma placa de 96 poços, e, além disso, uma coluna contendo embriões apenas com ME foi utilizado para avaliação do controle (controle sem tratamento). Esta placa foi incubada novamente sob as mesmas condições e após 24 horas, os embriões foram anestesiados por congelamento (freezer, -20 °C), e macerados com auxílio de lâminas de vidro. Em seguida, os mesmos foram plaqueados em ágar Sabouraud Dextrose sem diluição (volume de 100 µL), incubados por mais 24 horas a 37 °C e as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas.

2.11. Análise estatística

Vide Metodologia Geral na página 45.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estudo dos análogos de IsCT

3.1.1. Teste de susceptibilidade (CIM)

Na busca de novas alternativas para tratamentos antifúngicos eficazes e com baixos efeitos adversos ao paciente, a literatura nos traz uma variedade de estudos de AMP's antibacterianos, sendo ainda muito escasso o estudo contra patógenos fúngicos.

Os AMP's estão presentes em todos os organismos, vertebrados e invertebrados e também em plantas e microrganismos. Uma classe estudada de peptídeos, conhecidos como IsCT, é originada do veneno de um invertebrado artrópode, o escorpião da espécie *Opisthacanthus madagascariensis*, que foi isolado por DAI et al., 2001.

Os IsCT encontrados no veneno são peptídeos antimicrobianos naturais alfa-hélice, compostos somente de 13 resíduos de aminoácidos. Estudos mostram que eles apresentam potente atividade citolítica contra células bacterianas e de mamíferos (LEE et al., 2004; DAI et al., 2001). Já é bem descrita a atividade deste

AMP contra bactérias, apresentando resultados bem satisfatórios para Gram-positivas e Gram-negativas (LEE et al., 2004; TRIPATHI et al., 2015). Entretanto, poucos estudos relatam a atividade anti-*C. albicans*, visto que DAI et al., 2002 evidenciou uma atividade dos IsCT original e IsCT2 com valor de CIM de aproximadamente 19 µg/mL para ambos, contudo também apresentou uma atividade hemolítica.

É pouco conhecido o modo de ação desta classe, não se sabe se eles são capazes de induzir canais mediadores de lipídios, baseados na tensão de curvatura da membrana lipídica ocasionada pela presença de peptídeos anfipáticos intercalados (modelo toroidal), como acontece com outras classes como os mastoparanos e cecropina (HIGASHIJIMA et al., 1988; KATSU et al., 1990; BECHINGER, 1999; DAI et al., 2001), ou se ocorre por outros mecanismos. O importante é que para tornar-se um agente antimicrobiano, os AMP's precisam agir seletivamente em membranas ou alvos intracelulares de microrganismos e não em células de mamíferos (TRIPATHI et al., 2015).

Para estudar a influência de alguns resíduos de aminoácidos modificados na sequência peptídica do IsCT frente à atividade antifúngica e seu efeito tóxico, foram feitas algumas modificações da estrutura peptídica, baseando-se no peptídeo inicial da classe de IsCT (DAI et al., 2001).

Neste estudo, dois análogos de IsCT foram sintetizados com algumas modificações. Para o peptídeo nomeado de PepM3, foi realizada a alteração a partir do peptídeo original IsCT, cujo alinhamento pode ser observado na figura 15-A. Uma substituição do resíduo Triptofano da posição 6 por um resíduo de Alanina foi feita, e adicionado um resíduo de Lisina na porção C-terminal amidada, para aumentar a carga positiva nesta região. Estudos demonstram que o resíduo de Triptofano é um aminoácido de caráter hidrofóbico, que se for substituído por outros aminoácidos, podem reduzir a citotoxicidade contra células de mamíferos (KHARA, et al., 2015).

Já a incorporação de um resíduo de Lisina na porção C-terminal amidada foi realizada baseando-se na sequência de estudos dos MKs e PepM2, para manter esta porção carregada positivamente, no intuito de melhorar a afinidade pela membrana fúngica, que é carregada negativamente, e também diminuir a toxicidade hemolítica e citotoxicidade, como outros estudos têm mostrado com o acréscimo

deste resíduo em posições estratégicas da sequência peptídica (TRIPATHI et al., 2015).

O segundo peptídeo, baseado no estudo do escorpião, originado neste trabalho, foi denominado de PepM4 e sua estrutura foi feita com base em um análogo sintético de IsCT nomeado de [K7]-IsCT, de acordo com LEE et al., 2004, cujo alinhamento pode ser observado na figura 15-B. Nesta estrutura peptídica, foi retirada da porção N-terminal os resíduos Isoleucina, Leucina e Glicina, e foi adicionado um resíduo de Ácido Aspártico na porção C-terminal amidada, com a finalidade de manter o mesmo número de cargas entre PepM3 e PepM4 e fornecer uma porção polar C-terminal.

Figura 15. Alinhamento dos peptídeos com suas respectivas informações: IsCT com PepM3 (A); [K7]-IsCT com PepM4 (B).

A

IsCT 1 ILGKIWEGIKSLF-NH₂ 13

|||||.||||||

PepM3 1 ILGKIAEGIKSLFKNH₂ 14

■ Polar Básico ■ Polar Ácido ■ Polar sem carga ■ Não Polar

B

[K7]-IsCT 1 ILGKIWKGIKSLF-NH₂ 13

|||||||

PepM4 1 ---KIWKGIKSLFDNH₂ 11

■ Polar Básico ■ Polar Ácido ■ Polar sem carga ■ Não Polar

Com base nesses estudos, após a síntese dos análogos de IsCT, os peptídeos foram testados contra *C. albicans* e os resultados são apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Peptídeos análogos de IsCT com as respectivas estruturas, os valores de Massa Molecular (MM), número de Lisina (K), carga líquida (Q), Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).

Peptídeo	Sequência	MM (Da)	K	Q	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
PepM3	ILGKIAEGIKSLFK-NH ₂	1515,02	3	+3	125	125
PepM4	KIWKGIKSLFD-NH ₂	1333,60	3	+3	>250	-
Fluconazol	-	306,27	-	-	1	-
Anfotericina B	-	924,08	-	-	0,25	0,25

Levando em consideração os resultados dos MKs, PepM1 e PepM2, o peptídeo PepM3 apresentou uma atividade anti-*C. albicans* promissora com CIM e CFM de 125 µg/mL, sendo um análogo de IsCT com resultado inédito para atividade antifúngica. Por outro lado, PepM4 não apresentou atividade frente a este fungo.

3.1.2. Avaliação de segurança de PepM3 e PepM4 em embriões de Zebrafish

Neste estudo, um dos objetivos principais foi testar a toxicidade e teratogenicidade dos peptídeos. Sendo assim, após o teste de susceptibilidade (CIM), os dois análogos foram avaliados quanto a segurança utilizando embriões de Zebrafish. PepM3 e PepM4 foram testados em quatro concentrações (250 – 31,25 µg/mL), e os resultados podem ser observados na figura 16.

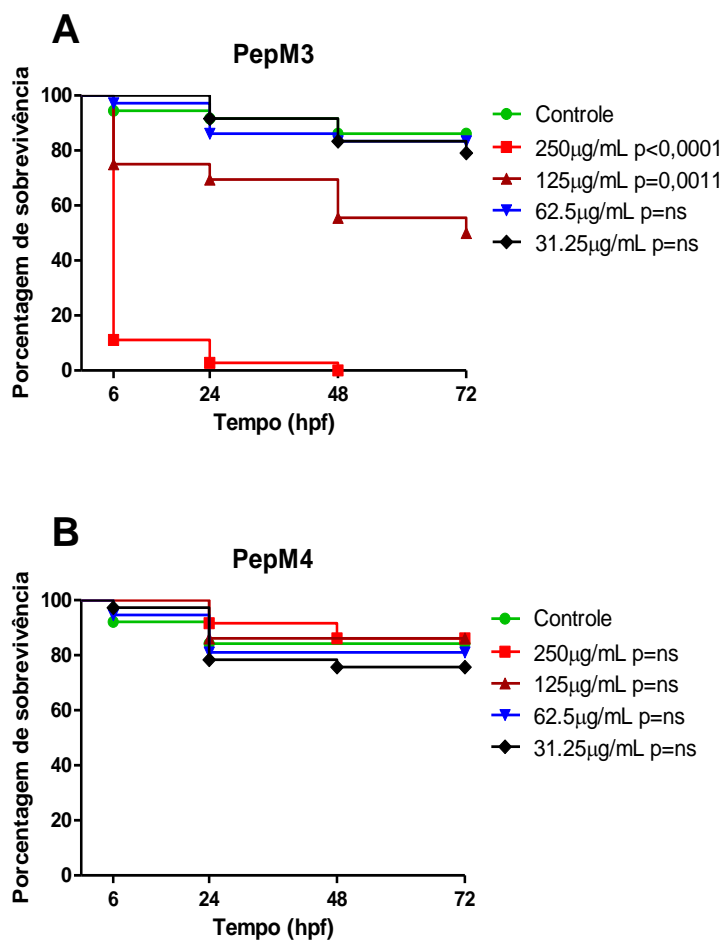
O peptídeo PepM4 não apresentou atividade anti-*C. albicans*, entretanto teve uma toxicidade expressivamente baixa e não-teratogenicidade, com uma CL₅₀ indeterminada nas concentrações testadas (CL₅₀ > 250 µg/mL), sendo que a menor concentração (31,25 µg/mL) apresentou sobrevivência de 75%. As curvas de sobrevivência dos grupos tratados com as diferentes concentrações de PepM4 não tiveram diferença estatística em relação ao grupo controle (não tratado).

Na maior concentração de PepM3, 250 µg/mL, houve 100% de mortalidade até 48 hpf, com uma CL₅₀ de 125 µg/mL (mesmo valor que inibiu o crescimento fúngico – CIM). Porém o peptídeo demonstrou uma baixa toxicidade e não-teratogenicidade, sugerindo que as modificações inéditas realizadas no PepM3 nos trazem informações relevantes sobre os aminoácidos substituídos e as

características que permaneceram na cadeia peptídica; entretanto, novas alterações podem ser necessárias para melhorar a atividade antifúngica e reduzir a toxicidade.

As concentrações de 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram diferença estatística nas curvas de sobrevivência em relação ao grupo não tratado (grupo controle), diferente das demais concentrações (62,5 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$) que além de apresentarem sobrevivência acima de 80%, as curvas de sobrevivência não tiveram diferença estatística relacionada ao grupo controle (não tratado). Este resultado também foi determinado como concentração dependente do peptídeo.

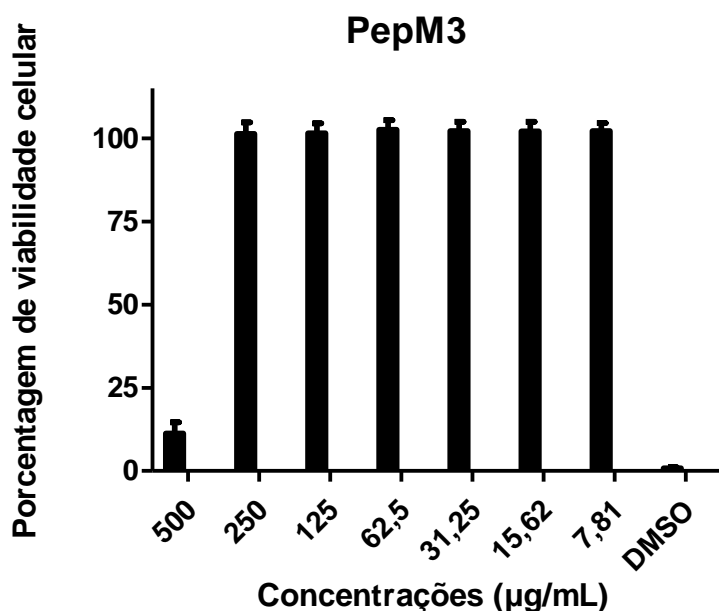
Figura 16. Porcentagem de sobrevivência dos embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações do peptídeo PepM3 (A) e PepM4 (B), até 72 horas pós fertilização (hpf).



3.1.3. Avaliação da citotoxicidade em cultura celular

Este ensaio foi realizado apenas com PepM3, uma vez que somente ele apresentou atividade frente *C. albicans*. O gráfico abaixo corresponde à porcentagem de viabilidade para linhagem celular HaCaT nas concentrações de 500 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 17).

Figura 17. Porcentagem de viabilidade na linhagem celular HaCaT expostas a diferentes concentrações de PepM3, e Dimetil sulfóxido (DMSO) usado como controle positivo.



Além dos resultados apresentados no gráfico, a tabela abaixo corresponde a concentração inibitória 50% (CI50) e índice de seletividade (IS) relacionado ao PepM3 (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), concentração inibitória 50% (CI50) e índice de seletividade (IS) para linhagem celular HaCaT referente ao PepM3.

Peptídeo	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CI50-HaCaT	IS (CI50/CIM) HaCaT
PepM3	125	250 – 500	2 - 4

Da mesma forma que o peptídeo PepM2, o índice de seletividade de PepM3 foi relativamente baixo, em contrapartida, obteve uma alta porcentagem de células viáveis considerando as concentrações de 250 $\mu\text{g/mL}$ até 7,81 $\mu\text{g/mL}$. Na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, houve uma porcentagem de viabilidade referente a 11,23%.

O peptídeo PepM3 apresentou uma boa atividade contra *C. albicans*, somado a baixa toxicidade e não sendo teratogênico em embriões de Zebrafish, além da alta porcentagem de células viáveis frente HaCaT; entretanto, apresentou uma CI50 próxima a concentração de CIM, com um índice de seletividade relativamente baixo, indicando que estudos posteriores podem ser realizados na tentativa de diminuir ainda mais o efeito tóxico deste peptídeo.

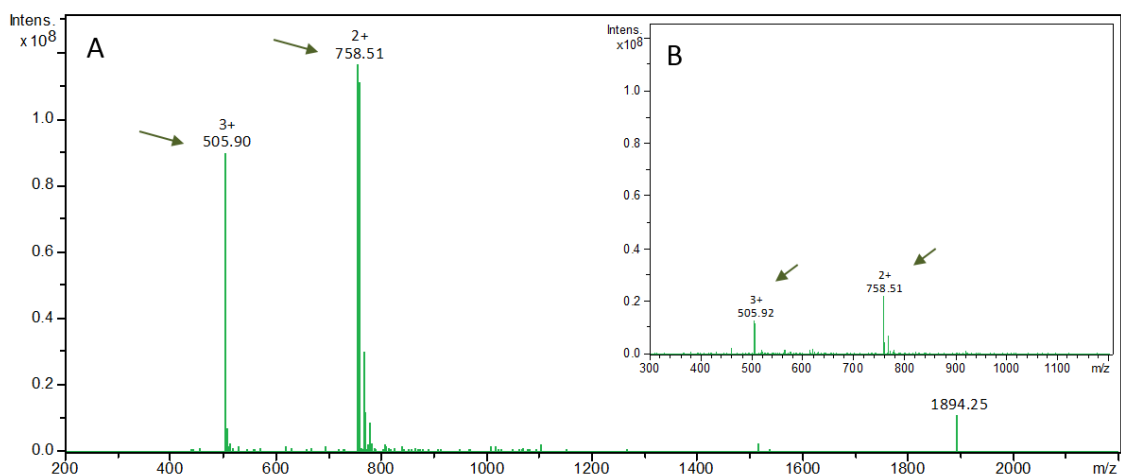
Levando em consideração a pouca toxicidade do PepM3, este estudo corrobora com LEE et al., (2004), uma vez que o peptídeo engenheirado por eles, denominado de [A⁶]-IsCT que apresentou também uma substituição de Triptofano por Alanina baseado no IsCT original, não indicou ter atividade hemolítica em células mamíferas, mostrando diminuir sua toxicidade, porém, apresentou uma atividade antibacteriana diminuída quando comparado ao IsCT original. Como na literatura não há estudos do análogo de IsCT abordado neste trabalho contra *C. albicans*, nosso resultado traz atividade antifúngica inédita, sobretudo com modificações estruturais a partir do peptídeo original.

3.1.4. Análise qualitativa da permeação do córion em avaliação por espectrometria de massas

Este estudo foi realizado com PepM3 para analisar o perfil qualitativo de permeação ao córion, uma vez que somente ele teve atividade anti-*C. albicans*.

Após ser realizado o ensaio de toxicidade em embriões de Zebrafish, alíquotas foram retiradas em 0 hora e 6 hpf, da concentração de 125 µg/mL para análise de permeação do córion (Figura 18).

Figura 18. Espectro MS¹ para o peptídeo PepM3 (125 µg/mL): A) Amostra padrão: mostrando os picos de m/z 505,90 e 758,51, correspondente aos íons moleculares [M+3H]³⁺ e [M+2H]²⁺, respectivamente (setas verdes); B) Amostra 6 hpf: o íon m/z [M+3H]³⁺ e [M+2H]²⁺ (m/z 505,92 e 758,51) com baixa intensidade (setas verdes).



Como pode ser observado no espectro acima (figura 18), PepM3 apresentou uma permeação parcial pela membrana do córion após 6 hpf, com intensidades significativamente reduzidas quando comparado ao espectro controle (amostra padrão), destacando que nesta concentração manteve-se sem efeitos tóxicos aos embriões.

3.2. Avaliação do possível efeito sinérgico de PepM3 combinado à Fluconazol e Anfotericina B

Para os resultados de interação entre PepM3 X Fluconazol e PepM3 X Anfotericina B, foram encontrados valores de CFI $> 0,5 \leq 4$ (CFI = 1,0156) e CFI ≤ 5 (CFI = 0,266), respectivamente. Sendo assim, considera-se a interação indiferente para Fluconazol e a interação sinérgica para Anfotericina B, com nenhum antagonismo observado. Este resultado pode indicar uma possível utilização deste peptídeo em combinação com os antifúngicos convencionais, possibilitando além de

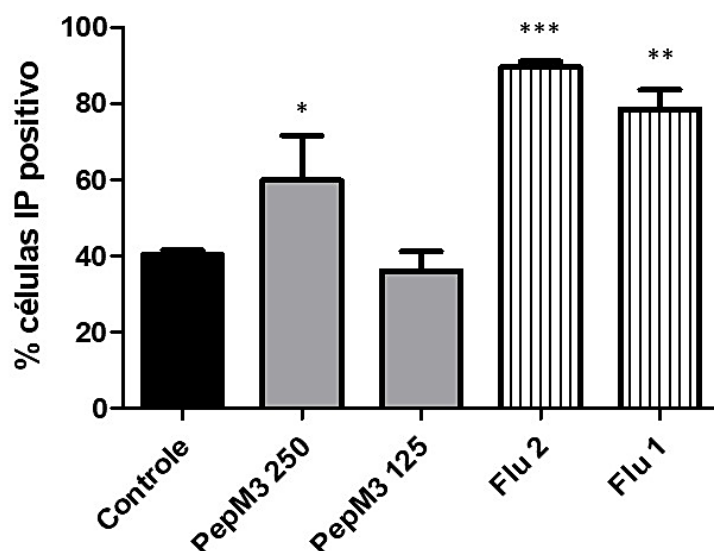
uma diminuição na toxicidade dos tratamentos, uma melhora na eficácia dos compostos.

3.3. Ensaio de influxo por Iodeto de Propídio

O efeito do PepM3 na integridade da membrana celular fúngica foi avaliado pelo monitoramento do influxo de iodeto de propídio, o qual é um fluoróforo que somente é capaz de penetrar na célula pelo comprometimento desta (VEERMAN et al., 2007; CHOI & LEE, 2014). Uma vez interno, ele intercala entre os pares de bases de guanina e citosina, e depois desta ligação aos ácidos nucleicos, a fluorescência do iodeto de propídio é aumentada (SUZUKI et al., 1997; CHOI & LEE, 2014).

PepM3 foi capaz de internalizar o fluoróforo de uma forma concentração dependente, igualmente ao controle fluconazol (figura 19), mostrando uma significativa diferença estatística em relação ao grupo controle (não tratado) para PepM3 250 µg/mL e fluconazol, diferente de PepM3 125 µg/mL que não apresentou uma diferença significativa ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que o influxo do iodeto de propídio em *C. albicans* ocorreu devido a um dano na membrana fúngica causado pelo peptídeo, aumentando sua permeabilidade.

Figura 19. Porcentagem de células de *C. albicans* positivas ao iodeto de propídio (IP) em 24h de exposição a duas concentrações de PepM3 (250 e 125 µg/mL) e Fluconazol (Flu 2 e 1 µg/mL). * $p < 0,05$; ** = $p < 0,0022$; *** = $p < 0,0002$ comparado ao grupo controle.



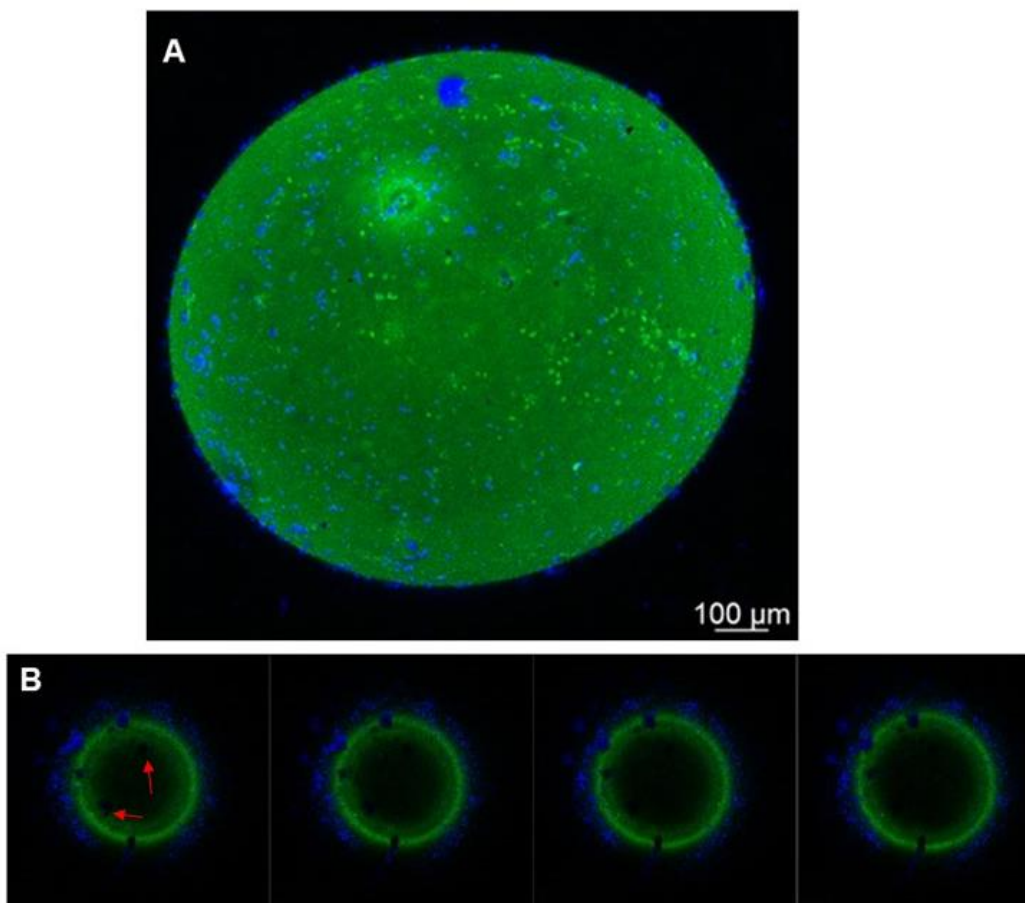
3.4. Padronização da infecção por imersão em embriões de Zebrafish

Embora a maioria dos animais mamíferos sejam ainda bem utilizados em estudos por serem muito similares aos humanos, a identidade completa com o sistema imunológico humano e o pouco acesso visual para eventos de patogênese a nível celular são algumas limitações para este tipo de modelo. Uma outra abordagem amplamente utilizada e que responde muitos questionamentos é a metodologia de cultura de tecidos, a qual possibilita a observação direta de células humanas com os microrganismos patogênicos. Entretanto, este método é desafiador para estudar a interação de vários tipos de células e tecidos, além de que uma cultura de células se mantém um pouco artificial no uso de preparações de linhagens padronizadas, resultando em um grande número de células que podem ou não refletir verdadeiramente a biologia das que são desenvolvidas naturalmente *in vivo*. Desta forma, o uso do modelo Zebrafish em pesquisas tem crescido por muitas vantagens, inclusive a capacidade de preencher algumas faltas entre os modelos mamíferos e a cultura celular. Este animal alternativo foi notado depois que foi estabelecido como um modelo geneticamente tratável a nível de desenvolvimento embrionário de vertebrados. A partir disso, vantagens singulares como alta fecundidade, maturação embrionária rápida, permeabilidade para pequenas moléculas, tamanho pequeno, transparência e compatibilidade com a microscopia ao vivo lhe proporcionaram ser um hospedeiro único no estudo das interações patógeno-hospedeiro (ROSOWSKI et al., 2018; MORASH et al., 2011; HENN, 2011). O Zebrafish, em 36 hpf, conta com o sistema circulatório funcional e que auxilia vários tipos de tecidos diferentes, inclusive o sistema imune inato, como macrófagos e neutrófilos, juntamente com um sistema complemento (BOSHRA et al., 2006; ROSOWSKI et al., 2018; HENN, 2011). Muitos estudos utilizam o modelo para uma variedade de doenças infecciosas, que vão desde bacterianas, até virais e fúngicas (SULLIVAN et al., 2017; AKLE et al., 2017; GRATACAP & WHEELER, 2014; ROSOWSKI et al., 2018). No entanto, a maioria das pesquisas são realizadas pela metodologia de microinjeção, a qual permite injetar os microrganismos e os tratamentos diretamente no interior do peixe por muitas rotas de infecção (ROSOWSKI et al., 2018), o que implica em várias vantagens quando comparado ao método de infecção por imersão.

Uma das abordagens deste trabalho foi a padronização da infecção por imersão em embriões de Zebrafish. A metodologia foi realizada com inóculos

específicos de *C. albicans* em embriões com 24 hpf, imersos em meio embriônico (ME), para certificar-se que o fungo é capaz de não somente promover e estabelecer uma infecção superficial no córion, mas também ocorrer a internalização do patógeno por esta membrana. Sendo assim, a técnica de Microscopia Confocal confirmou que a *C. albicans* estabeleceu uma infecção no córion e que houve uma penetração do fungo para o embrião de Zebrafish, podendo ser visto pela foto abaixo (figura 20).

Figura 20. Localização de células de *C. albicans* (marcado com Calcofluor – azul) em infecção por imersão em embriões de Zebrafish (marcado com FITC – verde):
A) Visualização do embrião e da *C. albicans* aderida no córion, ou seja, com a infecção estabelecida; B) Cortes entre as camadas do embrião, os quais comprovam que o fungo foi capaz de penetrar o córion (indicado por setas vermelhas). As imagens são representativas de imageamento por microscopia confocal a 405 nm de leitura com uma objetiva de 10x. Barra de escala = 100 μm .



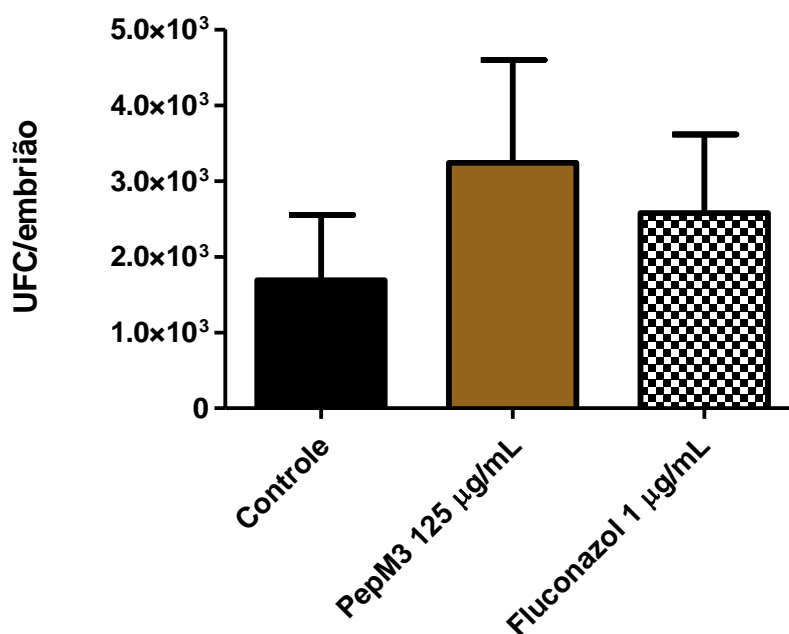
Quando testamos os meios para a melhor escolha no teste, observamos que em RPMI e RPMI + soro fetal bovino (SFB), a taxa de mortalidade dos embriões foi 100%, o que para nós não era viável. Desta forma, testamos apenas o ME e também ME + SFB, e percebemos que as células de *C. albicans* foram capazes de crescer igualmente e os embriões mantiveram-se vivos. Desta forma, os ensaios foram todos realizados com ME. Nosso resultado corrobora com CHEN et al., 2015, em que eles observaram que *C. albicans* cresceu em meio denominado “egg water” (água salina) a 30 °C e que o fungo foi capaz de aderir ao córion formando hifas, o que sugere que este patógeno pode crescer em meio e temperatura que não são usuais (RPMI, SFB ou em temperatura a 37 °C). A rotação a 80 rpm foi utilizada para facilitar a aderência e estabelecimento da infecção. Estudos indicam que uma apropriada velocidade de rotação pode assemelhar-se com a condição do fluxo sanguíneo, e também possibilitar a mistura dos embriões uniformemente com as células de *C. albicans* (CHEN et al., 2015; GRATACAP et al., 2013). Os inóculos testados foram 1×10^6 e $2,5 \times 10^3$ células/mL, e foi observado que a maior quantidade de células teve a melhor aderência ao córion.

O ensaio foi eficiente e possibilita muitas vantagens, por exemplo, não foi necessário o uso de equipamentos especiais de laboratório, a metodologia não foi invasiva e foi de fácil manuseio após a padronização de todas as condições. No entanto, após esta padronização, pudemos observar que uma infecção poderia ser mais eficaz utilizando um aparelho de microinjetor, ao invés de utilizar apenas o banho de imersão.

3.5. Eficácia de PepM3 utilizando embriões de Zebrafish e carga fúngica

Uma vez realizada e estabelecida esta metodologia, o objetivo foi realizar o tratamento dos embriões infectados com *C. albicans* utilizando o peptídeo de escolha PepM3, na concentração que inibiu o crescimento do fungo *in vitro* (125 µg/mL - CIM). O controle utilizado foi o fluconazol a 1 µg/mL (também na sua concentração inibitória mínima), para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) (figura 21).

Figura 21. Efeito de PepM3 (125 µg/mL) e fluconazol (1 µg/mL) na carga fúngica de embriões de Zebrafish infectados com 1×10^6 células/mL.



Após a contagem da UFC, houve uma tendência dos grupos infectados tratados apresentarem valores superiores de células fúngicas ao grupo infectado não tratado, com média de PepM3 $3,24 \times 10^3$ UFC/embrião, fluconazol $2,58 \times 10^3$ UFC/embrião e o controle $1,70 \times 10^3$ UFC/mL. Entretanto, pelo gráfico observamos que não houve diferença estatística entre os grupos tratados e não tratados, o que pode sugerir ser decorrente da concentração do peptídeo e do fluconazol utilizada, uma vez que modelos *in vivo* exigem concentrações maiores de tratamento, pois os compostos atravessam membranas e podem sofrer metabolização.

Neste contexto, outra hipótese é que tanto o peptídeo PepM3, quanto o fluconazol podem ter causado algum dano à integridade da membrana do córion do Zebrafish, possibilitando uma infecção mais estabelecida e uma maior internalização de *C. albicans* em comparação com os embriões não tratados. Visto que PepM3 apresentou resultado positivo para dano de membrana fúngica, e o mecanismo de ação do fluconazol já é bem descrito por ocasionar dano de membrana pela inibição da biossíntese do ergosterol, estas características podem ter influenciado também a integridade da membrana do córion.

PepM3 foi o análogo escolhido para os posteriores ensaios realizados, mostrando ser um possível candidato para estudos futuros, tendo uma atividade sinérgica com Anfotericina B e possível causador de dano de membrana fúngica. A infecção por imersão bem como eficácia de PepM3 utilizando embriões de Zebrafish foram padronizados no laboratório.

4. 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	IGAIKKGGKIIKKGLGVIGAA 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.

5. 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.; RICHTMANN, 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.; JURCZYSAK, 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.; RUISSSEN, 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.

CAPÍTULO 2 – ARTIGOS

1. Artigos publicados durante o Doutorado

1.1. Study of mastoparan analogues peptides against *Candida albicans* and safety in zebrafish embryos (*Danio rerio*) – Future Microbiology.

Preliminary Communication

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Future
MICROBIOLOGY

Study of mastoparan analog peptides against *Candida albicans* and safety in zebrafish embryos (*Danio rerio*)

Mariana C Galeane¹, Paulo C Gomes¹, Junya de L Singulani¹, Bibiana M de Souza², Mario S Palma², Maria JS Mendes-Giannini¹ & Ana MF Almeida^{*-1}

¹Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University-UNESP, Araraquara, 14800-903 SP, Brazil

²Department of Biology, CEIS / LS8Z, Institute of Biosciences, São Paulo State University-UNESP, Rio Claro, 13506-900 SP, Brazil

*Author for correspondence: Tel.: +55 (16) 3301 4640; Fax: +55 (16) 3322 0073; ana.maria@uol.com.br

Aim: In this work, mastoparan analog peptides from wasp venom were tested against *Candida albicans* and safety assays were performed using cell culture and model zebrafish. **Materials & methods:** Minimal inhibitory concentration was determined and toxicity was performed using human skin keratinocyte and embryo zebrafish. Also, permeation of peptides through embryo chorion was performed. **Results:** The peptides demonstrated anti-*C. albicans* activity, with low cytotoxicity and nonteratogenicity in *Danio rerio*. The compounds had different permeation through chorion, suggesting that this occurs due to modifications in their amino acid sequence. **Conclusion:** The results showed that the studied peptides can be used as structural study models for novel potential antifungal agents.

First draft submitted: 27 February 2019; Accepted for publication: 4 July 2019; Published online: 12 September 2019

Keywords: antimicrobial peptides • candidiasis • chorion • mass spectrometry • mastoparans • toxicity

Ativar
Acesse C

1.2. Fungal biofilms and polymicrobial diseases – Journal of Fungi (coautoria)



Review

Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases

Caroline B. Costa-Orlandi¹, Janaina C. O. Sardi², Nayla S. Pitangui¹, Haroldo C. de Oliveira¹, Lilliana Scorzoni¹, Mariana C. Galeane¹, Kaila P. Medina-Alarcón¹, Wanessa C. M. A. Melo¹, Mônica Y. Marcelino¹, Jaqueline D. Braz¹, Ana Marisa Fusco-Almeida¹ and Maria José S. Mendes-Giannini^{1,*}

¹ Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara SP 14800-903, Brazil; carolbarceloscosta@gmail.com (C.B.C.-O.); napitangui@hotmail.com (N.S.P.); haroldocoliveira@gmail.com (H.C.d.O.); liliscorzoni@yahoo.com.br (L.S.); magaleane@hotmail.com (M.C.G.); kaylabiotech@gmail.com (K.P.M.-A.); wanessamelobio@yahoo.com.br (W.C.M.A.M.); monicayonashiro@yahoo.com.br (M.Y.M.); jaqderissi@hotmail.com (J.D.B.); almeida@fcar.unesp.br (A.M.F.-A.)

² Department of Physiological Sciences, Piracicaba Dental School, University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba SP 13414-018, Brazil; janasardi@gmail.com

* Correspondence: giannini@fcar.unesp.br; Tel: +55-16-3301-4641

Academic Editor: Mahmoud A. Ghannoum

Received: 22 February 2017; Accepted: 4 May 2017; Published: 10 May 2017

Abstract: Biofilm formation is an important virulence factor for pathogenic fungi. Both yeasts and filamentous fungi can adhere to biotic and abiotic surfaces, developing into highly organized communities that are resistant to antimicrobials and environmental conditions. In recent years, new genera of fungi have been correlated with biofilm formation. However, *Candida* biofilms remain the most widely studied from the morphological and molecular perspectives. Biofilms formed by yeast and filamentous fungi present differences, and studies of polymicrobial communities have become increasingly important. A key feature of resistance is the extracellular matrix, which covers and protects biofilm cells from the surrounding environment. Furthermore, to achieve cell–cell communication, microorganisms secrete quorum-sensing molecules that control their biological activities and behaviors and play a role in fungal resistance and pathogenicity. Several in vitro techniques have been developed to study fungal biofilms, from colorimetric methods to omics approaches that aim to identify new therapeutic strategies by developing new compounds to combat these microbial communities as well as new diagnostic tools to identify these complex formations in vivo. In this review, recent advances related to pathogenic fungal biofilms are addressed.

Keywords: fungal biofilms; polymicrobial biofilms; resistance; omics approaches; drug discovery; drug combination; in vitro techniques; in vivo techniques

2. Artigo submetido durante o Doutorado (coautoria)

2.1. Antifungal activity, toxicity and mechanism of action of a mastoparan analog peptide – Frontiers Pharmacology

Frontiers: Your manuscript submission - 500582

Frontiers Cellular and Infection Microbiology Editorial Office
<cellandinfect.editorial.office@frontiersin.org>

Qua, 25/09/2019 18:59

Para: magaleane@hotmail.com <magaleane@hotmail.com>

Dear Dr Galeane,

Frontiers Cellular and Infection Microbiology Editorial Office has sent you a message. Please click 'Reply' to send a direct response

We are pleased to inform you that we have received the manuscript ""Antifungal activity, toxicity, and mechanism of action of a mastoparan analog peptide"" to be considered for publication in Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, section Fungal Pathogenesis.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:
<http://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

If you have already created a Frontiers account using a different email address, please add this one as a secondary email to your Frontiers profile following this link:

<http://loop.frontiersin.org/settings/email>

For any questions on the above, you can contact support@frontiersin.org

CAPÍTULO 3 – PREMIAÇÃO

1. Premiação IV Simpósio Zebrafish como modelo animal de pesquisa

1.1 Trabalho intitulado “Structure-function relationship of modified synthetic peptides of the wasp (*Apoica pallens*) against *Candida albicans* and safety in Zebrafish embryos (*Danio rerio*)” foi classificado em 1º lugar.



IV simpósio ZEBRAFISH
como modelo animal de pesquisa

Certificamos para os devidos fins que o trabalho intitulado: “STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIP OF MODIFIED SYNTHETIC PEPTIDES OF THE WASP (*Apoica pallens*) AGAINST CANDIDA ALBICANS AND SAFETY IN ZEBRAFISH EMBRYOS (*Danio rerio*)”, apresentado por Mariana Cristina Galeane, foi merecedor do 1º lugar na categoria pós-graduação, durante o IV SIMPÓSIO O ZEBRAFISH COMO MODELO ANIMAL DE PESQUISA, realizado de 26 a 28 de outubro de 2017, no Instituto de Biociências- UNESP/Botucatu - SP


Prof Dr Danillo Pinhal
Lider da Comissão Organizadora


Ms Arthur Casulli de Oliveira
Discente da Comissão Organizadora