



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Caracterização do efeito antifúngico de  
peptídeos presentes na peçonha de escorpiões em  
linhagens de *Cryptococcus neoformans***

**Fernanda Guilhelmelli Costa**

**Orientadora: Prof. Dra. Ildinete Silva Pereira**

**Brasília**

**2014**

**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular**

**Caracterização do efeito antifúngico de peptídeos presentes na peçonha de  
escorpiões em linhagens de *Cryptococcus neoformans***

**Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Molecular  
do Instituto de Ciências Biológicas  
da Universidade de Brasília para  
obtenção do título de Mestre em  
Biologia Molecular.**

**Aluna: Fernanda Guilhelmelli Costa**  
**Orientadora: Prof. Dra Ildinete Silva Pereira**  
**Coorientadora: Prof. Dra Patrícia Albuquerque de Andrade**

**Brasília**  
**2014**

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico essa dissertação a todos aqueles que gastam suas forças e energias, e me inspiram a fazer o mesmo, na busca pelas respostas sobre a Vida, o Universo e Tudo Mais.**

## AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial meus pais, por todo amor, apoio incondicional e educação que me deram. Devo muito a vocês por sempre estarem ao meu lado, me dando a força e o suporte que eu precisava desde os meus primeiros passos e por sempre investirem na minha educação, mesmo que muitas vezes isso significasse um grande sacrifício.

À minha querida orientadora Ildinete por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse projeto, pela confiança, amizade, compreensão e por sempre acreditar no meu potencial mesmo quando eu não acreditava.

À minha coorientadora Patrícia, que muito além de ensinar e ajudar a solucionar problemas com seu grande conhecimento, foi uma grande companheira durante essa jornada e é uma das minhas maiores inspirações para continuar na carreira acadêmica e exemplo de profissionalismo, dedicação, competência e amor pelo que faz.

À Lorena por ter participado ativamente no projeto, sempre disposta a transmitir seus conhecimentos e nos ajudar na bancada e que também me inspira e motiva a continuar no caminho que escolhi.

Às professoras Elisabeth Schwartz e Márcia Mortari por toda ajuda e auxílio durante a execução desse projeto, sempre contribuindo com uma visão diferenciada e enriquecedora para os nossos questionamentos e dúvidas.

Aos professores Márcio e Cynthia que apesar de não terem participado diretamente desse projeto, sempre me acolheram durante as pequenas urgências.

À Calliandra por ter me orientado pacientemente quando ainda era aluna de iniciação científica, sempre muito bem disposta a ajudar a todos em tudo aquilo que estava ao seu alcance, e às vezes muito além e por ser uma das pessoas mais altruístas e alegres que eu já tive o prazer de conviver.

À minha grande amiga Nathália, que muito mais do que minha gêmula de projeto e bancada, foi minha companheira durante a iniciação científica e o mestrado, estando sempre presente nos momentos de angústia, desespero e desabafos tão comuns durante essa jornada. Por ter me ajudado em diversas etapas e contribuído com belas ideias e soluções de diversos problemas que encontramos ao longo do nosso percurso. Sem você eu não teria realizado metade de tudo que fiz, por isso serei eternamente grata pelos inóculos que você fez nos domingos! Mesmo que nossos caminhos se separem a partir de agora, sempre terei admiração e carinho por sua pessoa. E desculpe a bagunça!

À TODOS os meus amigos da graduação e colegas do Lab MOA que estiveram presentes durante todo esse tempo, sem vocês a jornada seria árdua e, sem dúvida, INFINAMENTE sem graça! Faço um agradecimento em especial ao Pedro, pois sem ele eu nunca teria vindo para o Lab MOA; ao meu querido afilhado Mene por ser um ótimo amigo e me ajudar com a bioinformática, à Fabiana “Cabra” pelos momentos de cabritagem e muita alegria, descontração e, claro, por contribuir com ótimas ideias para o projeto; ao Marco por tantos momentos e situações memoráveis que seria impossível colocar no papel, incluindo o GoM, e por sempre me ajudar nos CFUs; Ao Jovem Padawan Ricardo por também ter me auxiliado quando precisei. Enfim, agradeço a todos pelos bons momentos e pelos “Lancinhos Time”.

Àos colegas do Lab 4, Érika, Hugo, André, Tayná e outros pela boa convivência.

À Dona Fátima, Dona Ivonildes, Ivone, Ana e ao Thompson por sempre tornarem a vida de todos do Laboratório e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular infinitamente mais fácil.

Aos podcasters do JN, MRG, PdG, Monalisa e outros por tornarem meus momentos sozinha no laboratório menos solitários.

Aos professores que compõe a banca por terem disponibilizado seus tempos para avaliar esse trabalho.

Ao CNPq e FAP-DF pelo apoio financeiro.

À todos aqueles que acham que merecem meus agradecimentos. Sintam-se agradecidos, ou não.

À Sociedade Brasileira.

## RESUMO

O crescente número de indivíduos imunocomprometidos levou ao aumento da incidência de micoses sistêmicas. As infecções causadas pelo fungo *Cryptococcus neoformans* são a maior causa de morte relacionada a fungos em pacientes com AIDS. Este cenário se agrava com o advento de linhagens resistentes a antifúngicos disponíveis bem como a alta toxicidade desses tratamentos aos pacientes. Dessa forma, a busca por novos fármacos mais eficientes e menos tóxicos é de grande urgência. Nesse sentido, o estudo de peptídeos antimicrobianos (AMPs) é promissor, uma vez que essas moléculas possuem como um dos principais alvos a membrana citoplasmática de patógenos de forma que esses organismos estão menos propensos a desenvolver resistência. AMPs são moléculas multifuncionais, apresentando tanto atividade microbicida como imunomodulatória. São peptídeos evolutivamente conservados em diversos grupos de seres vivos e produzidos em diversos tecidos. Nos animais peçonhentos, a produção de diversos AMPs tem sido descrita nas glândulas de peçonha, sendo portanto uma interessante fonte para buscas por novas moléculas microbicidas. Neste trabalho foi caracterizado o efeito antifúngico tanto de AMPs inéditos e AMPs de já descritos na literatura presentes na peçonha de escorpiões contra duas linhagens de *C. neoformans*. Dos 11 peptídeos testados, sete inibiram o crescimento de *C. neoformans* das linhagens H99 e B3501, porém nenhum peptídeo mostrou-se mais potente que a anfotericina B. A linhagem B3501 foi mais suscetível à ação de todos os peptídeos com atividade antifúngica comparada à linhagem H99. Observou-se também que a carga residual positiva dos AMPs identificados na peçonha de escorpião pode ser um importante parâmetro para a inibição do crescimento do fungo. Foi mostrado que as células fúngicas com a cápsula mais desenvolvida são mais suscetíveis à atividade inibitória dos AMPs, assim como células melanizadas também apresentam maior suscetibilidade em comparação às células não melanizadas. É possível que a cápsula e a melanina exerçam um importante papel na atração eletrostática do peptídeo, resultando em uma maior suscetibilidade do fungo. Foi demonstrado também por meio de microscopia eletrônica de varredura que um dos peptídeos, denominado Peptídeo 6, foi capaz de causar danos na morfologia da célula.

## ABSTRACT

The rising number of immunocompromised individuals is leading to an increase in the incidence of systemic mycoses. Infections caused by *Cryptococcus neoformans* are the major cause of death related to fungi in patients with AIDS. This scenario is aggravated by the advent of resistant strains to available antifungal agents and the high toxicity of these treatments to patients. Thus, the search for new more efficient and less toxic drugs is of great urgency. In this sense, the study of antimicrobial peptides (AMPs) is promising, since the main target of these molecules is the cytoplasmic membrane of pathogens, so these organisms are less likely to develop resistance. AMPs are multifunctional molecules with both microbicidal activity and immunomodulatory properties. These peptides are evolutionarily conserved in diverse groups of organisms and are expressed in various tissues. In venomous animals, the expression of several AMPs have been described in the venom glands and is therefore an interesting source in the search for new microbicide molecules. In this work, the effect of antifungal AMPs present in the venom of scorpions was characterized against two strains of *C. neoformans*. Seven peptides inhibited the growth of *C. neoformans* H99 and *C. neoformans* B3501, although, amphotericin B was more potent than any of the tested peptides. B3501 strain was more susceptible to the inhibitory activity of the tested AMPs than H99 strain. It was observed that the residual positive charge of the scorpion's AMPs could be an important feature in their ability to induce fungal growth inhibition. It was also shown that yeast cells with larger capsule are more susceptible to the inhibitory activity of the tested AMPs. Fungal melanized cells also showed higher susceptibility compared to non-melanized cells. It is possible that the capsule and melanin play a role in electrostatic attraction of cationic peptide, enhancing the fungal susceptibility to these compounds. Scanning Electron Microscopy analysis revealed that one peptide, nominated Peptide 6, causes damage to cell morphology.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

- °C – Graus Celsius
- AMP** – Peptídeos Antimicrobianos
- cDNA** – Sequência DNA complementar
- CLSI** – Clinical and Laboratory Standards Institute
- CMI** – Concentração Mínima Inibitória
- CML** – Concentração Mínima Letal
- DBP** – Peptídeo com Ponte Dissulfeto
- DMSO** – Dimetil sulfóxido
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- g** – Gramas
- GalXM** – Galactoxilomanana
- GXM** – Glucuronoxilomanana
- h** – Hora
- HIV** – Vírus da imunodeficiência humana
- Hst-5** – Histatina-5
- HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- IL-1 $\beta$**  – Interleucina-1 $\beta$
- L-DOPA** - 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine
- LPS** – Lipopolissacarídeo
- M** – Molar
- min** - minutos
- mg** – Miligrama
- mL** – Mililitro
- mM** – Milimolar
- MOPS** – Ácido 3-Morfolinopropanosulfônico
- mRNA** – RNA mensageiro
- NDBP** – Peptídeo Sem Pontes Dissulfeto
- nm** - nanômetros
- OD** – Densidade óptica ou absorbância
- P3** – Peptídeo 3
- P4** – Peptídeo 4
- P6** – Peptídeo 6



**P7** – Peptídeo 7

**P11** – Peptídeo 11

**PBS** – Tampão de fosfato

**PAMP** – Padrões moleculares associados a patógenos

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**p/v** – peso/volume

**RNA** – Ácido ribonucléico

**ROS** – Espécie Reativa de Oxigênio

**rpm** – Rotações por minuto

**SDS** – Dodecil sulfato de sódio

**TLR** – Receptor do tipo Toll

**TNF** – Fator de Necrose Tumoral

**V** – Volume

**v/v** – volume/volume

**µg** – micrograma

**µL** – Microlitro

**µM** – Micromolar

**µm** – Micrômetros

**%** – Por cento

## Lista de Figuras

<b>Figura 1. O ciclo infeccioso de <i>C. neoformans</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 2. Classes estruturais de peptídeos antimicrobianos. ....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 3. Mecanismos de permeabilização da membrana por peptídeos antimicrobianos.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 4. Atividade antimicrobiana monitorada pela análise visual do crescimento de duas linhagens de <i>C. neoformans</i>. ....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 5. Curvas dose-resposta da inibição do crescimento de <i>C. neoformans</i> H99 e B3501. ....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 6. Efeito do Peptídeo 6 na morfologia de <i>C. neoformans</i> H99 avaliado por microscopia eletrônica de varredura.....</b>	<b>56</b>

## Lista de Tabelas

Tabela 1. A atividade antimicrobiana e hemolítica de NDBPs.....	31
Tabela 2. Sequência dos peptídeos desenhados a partir de análises transcritômicas de bibliotecas de cDNA de glândula de peçonha de diferentes espécies de escorpião .....	36
Tabela 3. Sequência dos peptídeos análogos aos Peptídeo 2, Peptídeo 6 e NDBP-4.3. ....	36
Tabela 4. Sequência primária, predição da estrutura secundária, tamanho, hidropaticidade e carga dos peptídeos de peçonha de escorpião.....	40
Tabela 5. Similaridades entre os peptídeos empregados neste estudo com aqueles descritos na literatura, incluindo dados de caracterização da respectivas atividades antimicrobianas já caracterizadas.....	41
Tabela 6. Concentração inibitória dos peptídeos de peçonha de escorpião .....	44
Tabela 7. Alinhamento múltiplo das sequências dos peptídeos 2, 3 e 4.....	45
Tabela 8. Alinhamento múltiplo das sequências dos peptídeos P6 e NDBP-4.3. ....	46
Tabela 9. Comparação entre as sequências, conteúdo de $\alpha$ -hélice, hidropatia e carga entre os peptídeo 2, 6 e NDBP-4.3 originais e os peptídeos modificados.....	47
Tabela 10. Concentração inibitória dos peptídeos de peçonha de escorpião originais e modificados para <i>C. neoformans</i> H99.....	47
Tabela 11. Determinação das CMI <sub>50</sub> e CMI <sub>90</sub> e seus intervalos de confiança* para os peptídeos de peçonha de escorpião para as linhagens H99 e B3501 de <i>C. neoformans</i> . ....	50
Tabela 12. Concentração Mínima Letal do Peptídeo 6 para as linhagens H99 e B3501 de <i>C. neoformans</i> . ....	51
Tabela 13. Concentrações inibitórias de peptídeos de peçonha e Anfotericina B para células de <i>C. neoformans</i> H99 não melanizadas (sem L-DOPA) e células melanizadas (com L-DOPA) .....	51

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1 Infecções fúngicas .....	14
1.2 <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	15
1.3 Peptídeos Antimicrobianos.....	17
1.4 Produção de Peptídeos Antimicrobianos .....	18
1.5 Classificação e Estrutura de Peptídeos Antimicrobianos.....	20
1.6 Especificidade a Patógenos.....	22
1.7 Mecanismo de Ação .....	23
1.8. Resistência a peptídeos antimicrobianos.....	27
1.9 Peptídeos Antimicrobianos presentes em peçonhas. ....	28
1.10 Peptídeos Antimicrobianos presentes em peçonhas de escorpiões.....	29
<b>2. OJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
3.1 Linhagens Celulares e Manutenção .....	34
3.2 Meios de cultura e Solução .....	34
3.3 Seleção, síntese e preparo das soluções estoque dos peptídeos testados. ....	35
3.4 Análise das propriedades físico-químicas e busca em banco de dados por peptídeos antimicrobianos similares já descritos na literatura. ....	36
3.6 Determinação da Concentração Mínima Letal (CML).....	38
3.7 Verificação do papel protetor da cápsula e melanina contra os peptídeos antimicrobianos.....	38
3.8 Efeito do peptídeo 6 na morfologia de <i>C. neoformans</i> H99 .....	39
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
4.1 Propriedades físico-químicas, estruturais e similaridades a outros AMPs já descritos. ....	40
4.2 Atividade Antifúngica dos peptídeos de peçonha de escorpião contra <i>Cryptococcus neoformans</i> . ....	42
4.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória e da Concentração Mínima Letal de peptídeos da peçonha de escorpião contra <i>C. neoformans</i> .....	48
4.4 Determinação do efeito protetor da cápsula e da melanina na inibição do crescimento de <i>C. neoformans</i> por peptídeos antimicrobianos de peçonha de escorpião. ....	51
4.5 Efeito do Peptídeo 6 na morfologia de <i>C. neoformans</i> H99 .....	54

<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>58</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>69</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Infecções fúngicas

Nas últimas décadas observa-se um crescimento significativo na incidência de infecções fúngicas sistêmicas relacionadas a altas taxas de mortalidade e morbidade, de forma que essas doenças são um problema de saúde pública mundial. O aumento dessas infecções está relacionado principalmente ao crescente número de indivíduos imunodeficientes, em especial pacientes com câncer e em tratamento quimioterápico, pacientes com órgãos recém-transplantados e principalmente pacientes portadores do vírus HIV (Venkatesan *et al.*, 2005; Romani, 2011; Armstrong-James *et al.*, 2014). Dentre os principais agente etiológicos de micoses sistêmicas podemos destacar *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.* e *Histoplasma spp* (Romani, 2011).

Hoje, a epidemia global do vírus HIV é um dos principais fatores que levam à morte por infecções fúngicas no mundo (Brown *et al.*, 2012). Nesse cenário, as infecções causadas por *Cryptococcus. neoformans* são a maior causa de morte relacionada a fungos em pacientes com AIDS (Armstrong-James *et al.*, 2014). É estimado que ocorram aproximadamente 1 milhão de casos de meningoencefalite criptocócica por ano em pacientes com AIDS, levando a aproximadamente 625 mil mortes (Park *et al.*, 2009). Mais alarmante ainda são os recentes relatos de epidemias de criptococose causados por *C. gattii* em quase exclusivamente pacientes imunocompetentes, como revisado em Del Poeta & Casadervall, 2012 (Del Poeta and Casadevall, 2012).

Esse cenário ainda é agravado pelo surgimento de linhagens resistentes aos principais antifúngicos disponíveis atualmente (Li *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2012). *C. neoformans* é intrinsecamente resistente a equinocandinas, antifúngicos que afetam a síntese de glicanas, um importante componente da parede celular (Sable *et al.*, 2008). Já a resistência a azóis, cujo principal alvo é uma enzima da biossíntese do ergosterol, ocorre principalmente devido a mutações que impedem a ligação do antifúngico à enzima mutada e ao aumento da produção de transportadores envolvidos no efluxo de drogas (Kanafani and Perfect, 2008; Shapiro *et al.*, 2011). A resistência a polienos como a anfotericina B, que liga-se à esteroides e altera a permeabilidade das membranas fúngicas, é praticamente inexistente, porém esse antifúngico é bastante tóxico aos pacientes, principalmente para os rins e fígado (Ghannoum and Rice, 1999; Shapiro *et al.*, 2011).

Dessa forma, frente ao crescente impacto das doenças fúngicas, ao aumento de linhagens resistentes a antifúngicos convencionais e à elevada toxicidade dos tratamentos

convencionais, a busca por novos fármacos mais eficientes e menos tóxicos ao hospedeiro é de grande urgência.

É nesse contexto que integramos a **Rede INOVATOXIN – Inovação com Peçonha de Animais da Biodiversidade da Região Centro-Oeste: aplicações terapêuticas, toxicológicas e bioprospecção**, sob coordenação da Profa. Elisabeth Schwartz (Edital MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/PRO-CENTRO-OESTE Nº 031/2010). Um dos subprojetos dessa rede, sob coordenação da Profa. Ildinete Silva Pereira, tem como objetivo a prospecção de peptídeos de peçonha de animais com atividade antifúngica contra *C. albicans*, *P. brasiliensis* e *C. neoformans*, visando o desenvolvimento de novos princípios terapêuticos.

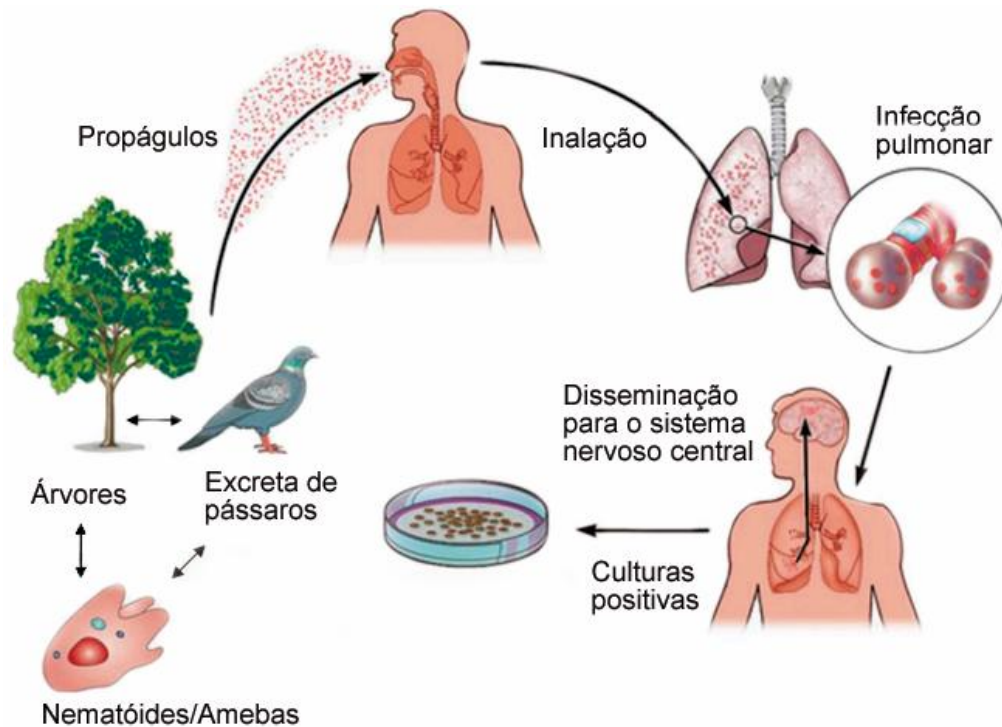
Este é o cenário onde insere-se o projeto desenvolvido no contexto desta dissertação, que visa a caracterizar peptídeos, a partir da peçonha de escorpiões, com atividade antifúngica contra *C. neoformans*.

## **1.2 *Cryptococcus neoformans***

*Cryptococcus neoformans*, agente etiológico da criptococose, é um fungo encapsulado que vive primariamente no meio ambiente na forma de levedura. É encontrado sobretudo em solos, troncos de árvores e nas excretas de aves, principalmente de pombos (Lin, 2009). Baseado em testes de aglutinação de componentes da cápsula, foram identificados três variedades e cinco sorotipos, sendo eles o sorotipo A, B, C, D e AD (Idnurm *et al.*, 2005). O sorotipo A corresponde a *C. neoformans* var. *grubii*, enquanto que o sorotipo D e AD corresponde a *C. neoformans* var. *neofomans*. Os sorotipos B e C correspondem a *C. gatti*. Os sorotipos A e D estão mais frequentemente relacionados à infecções de pacientes imunocomprometidos, sendo as infecções pelo sorotipo D mais restritas à Europa, enquanto que as infecções pelo sorotipo A tem distribuição mundial. Já *C. gatti* está mais relacionado a infecção em pacientes imunocompetentes, sendo bastante encontrado em regiões tropicais e subtropicais (Idnurm *et al.*, 2005).

A infecção ocorre por meio da inalação de propágulos ou leveduras dissecadas no ambiente, se instalando primeiramente no pulmão (**Figura 1**). Inicialmente o fungo coloniza o trato respiratório do hospedeiro, podendo permanecer sem causar grandes danos ao hospedeiro (Hull and Heitman, 2002; Lin and Heitman, 2006). Geralmente a infecção é assintomática e as células do fungo podem ser eliminadas do organismo ou permanecer dormentes. Uma vez que o sistema imune do hospedeiro esteja comprometido

as formas dormentes são reativadas e não são contidas, podendo evadir do pulmão e se espalhar pelo organismo, tendo como um dos principais destinos o sistema nervoso central levando a meningites e meningoencefalites, a forma mais grave da doença. (Lin and Heitman, 2006; Brizendine and Pappas, 2010).



**Figura 1. O ciclo infeccioso de *C. neoformans*.** O fungo *C. neoformans* é encontrado no ambiente, estando associado a árvores e a excretas de pombos. No solo, o fungo mantém interação com seus predadores, como amebas e nematóides. Propágulos ou leveduras do fungo podem ser inaladas, se instalando no pulmão e causando uma infecção local que pode se disseminar para o sistema nervoso central. Adaptado de Hull & Heitman, 2002.

Há três fatores de virulência bem estabelecidos para o fungo que são: a produção de cápsula, melanina e a capacidade de crescer a 37°C. A cápsula produzida pelo fungo é composta principalmente por polissacarídeos complexos, glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas, sendo a GXM o componente majoritário, correspondendo a 90% dos polissacarídeos da cápsula (McFadden *et al.*, 2006). A síntese desses polissacarídeos ocorre dentro da célula, sendo então transportados por meio de vesículas através da parede celular para então se ligarem à parede, seja por ligação direta ou via ancoramento por proteínas de forma não covalente. Por fim os polissacarídeos são ligados entre si formando os polímeros que darão forma à capsula (O'Meara and



Alspaugh, 2012). No meio ambiente, a cápsula protege o fungo contra predadores naturais, como amebas e nematoides, e protege contra a desidratação e radiação. Já nos hospedeiros, a cápsula dificulta a fagocitose por macrófagos e, uma vez dentro da célula, a cápsula serve como uma proteção contra as espécies reativas de oxigênio (O'Meara and Alspaugh, 2012). Além disso, a cápsula também é responsável pela modulação da resposta imune do hospedeiro desregulando a produção de citocinas inflamatórias entre outras funções, o que favorece a sua sobrevivência (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009).

A melanina é um pigmento escuro de alta massa molecular, hidrofóbica, com carga negativa, resistente a ácidos concentrados e susceptível ao branqueamento com agentes oxidantes (Casadevall *et al.*, 2000; Nosanchuk and Casadevall, 2003). Essas características dificultam o estudo da sua estrutura, porém acredita-se que ela seja formada via polimerização oxidativa de compostos fenólicos e indólicos (Casadevall *et al.*, 2000). A enzima envolvida na síntese da melanina a partir de substratos fenólicos é a lacase, que é uma enzima dependente de cobre para a sua atividade (Nosanchuk and Casadevall, 2003). A melanina se deposita na parede celular do fungo e o protege contra condições ambientais adversas, como radiação UV e altas temperaturas. No hospedeiro, as células fúngicas melanizadas são menos suscetíveis a peptídeos antimicrobianos e antifúngicos como a anfotericina B, a danos por espécies reativas de oxigênio, e à fagocitose pelas células do sistema imune (Doering *et al.*, 1999). O neurotropismo do fungo também pode estar associado à sua capacidade de converter catecolaminas em melanina (Casadevall *et al.*, 2000; Eisenman and Casadevall, 2012). *C. neoformans* também é capaz de formar biofilmes que, similarmente ao observado em outras espécies, estão associados à sua maior virulência e resistência aos antifúngicos mais utilizados (Martinez and Casadevall, 2006b).

### **1.3 Peptídeos Antimicrobianos**

A resposta imunitária de um indivíduo envolve a atuação de uma variedade de células e moléculas que precisam agir de uma maneira integrada para a manutenção da homeostase. Como resultante desse processo, podemos destacar a produção de diversos peptídeos antimicrobianos (AMPs) endógenos, cuja principal função é induzir uma atividade direta contra os patógenos bem como modular a resposta imune dos hospedeiros (Lai and Gallo, 2009).

Os AMPs são pequenos peptídeos que constituem um mecanismo de defesa antigo e evolutivamente conservado contra micro-organismos. Nos organismos multicelulares,

representam importantes efetores do sistema imune inato. Essas moléculas já foram identificadas e isoladas em diversos organismos, como bactérias, plantas, animais invertebrados e vertebrados, incluindo mamíferos e possuem atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de patógenos, como bactérias, fungos, vírus e protozoários (Jenssen et al., 2006; Nakatsuji and Gallo, 2012). A grande maioria dos AMPs apresentam algumas características em comum, como carga positiva e uma grande quantidade de aminoácidos hidrofóbicos. Essas propriedades permitem que o peptídeo assuma uma estrutura anfipática, possibilitando assim a interação com a membrana do patógeno (Hancock and Sahl, 2006).

A descoberta de AMPs remonta a 1939, quando Renè Dubos isolou uma substância antimicrobiana do sobrenadante de uma cultura da bactéria *Bacillus brevis*, a qual nomeou de gramicidina. Tal substância foi capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas *in vitro* (Dubos, 1939 a). Posteriormente, verificou-se que a gramicidina também foi capaz de proteger camundongos contra a infecção por *Pneumococcus* (Dubos, 1939 b). Já em plantas, o primeiro AMP foi isolado por Balls e Hale (Balls *et al.*, 1942) a partir de endosperma de trigo, o qual foi chamado posteriormente de tionina, e que possui atividade bactericida, fungicida e apresenta toxicidade a células de mamíferos (Garcia-Olmedo, et. al 1972). Em animais, o primeiro AMP foi isolado em 1981 da hemolinfa de uma mariposa (Steiner *et al.*, 1981), o qual foi nomeado de cecropina. Nesse estudo foi demonstrado que tanto a cecropina A e B possuem atividade antibacteriana contra Gram-negativas. Em mamíferos, a identificação do primeiro AMP remonta a 1956, quando a primeira defensina foi isolada de leucócitos de coelho (Hirsch, 1956). Em 1985, as primeiras defensinas isoladas de neutrófilos humanos foram identificadas e purificadas. Nesse estudo mostrou-se que essas moléculas tem a atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral (Ganz *et al.*, 1985). Hoje, mais de 5000 AMPs já foram descritos ou desenhados, sendo que cerca 4000 desses AMPs são de origem natural e para uma grande parte destes já há dados experimentais que evidenciam a sua existência em nível de proteômica (Zhao *et al.*, 2013).

#### **1.4 Produção de Peptídeos Antimicrobianos**

A expressão de AMPs pode ocorrer tanto constitutivamente como pode ser induzida em resposta a um sinal desencadeado por um patógeno. Exemplos de AMPs expressos constitutivamente são as  $\beta$ -defensinas humanas 1 e 3, produzidas por neutrófilos e queratinócitos, que ficam acumuladas em grânulos, para então serem

liberadas na presença de algum sinal (Cowland and Borregaard, 1999; Selsted and Ouellette, 2005). A expressão constitutiva pode variar de acordo com o estágio de desenvolvimento do indivíduo, sexo ou idade. Por exemplo, a catelicidina CRAMP de camundongos não é normalmente expressa no epitélio intestinal de animais adultos, no entanto, em camundongos recém nascidos, há uma alta expressão constitutiva desse AMP, que desaparece gradualmente depois de algumas semanas (Menard *et al.*, 2008). É possível que essa alta expressão nessa fase seja necessária para a proteção do animal contra patógenos entéricos até que a sua microbiota intestinal esteja estabelecida.

A indução da expressão de AMPs por patógenos melhor descrita é a indução via sinalização de receptores Toll em *Drosophila melanogaster*. Ao contrário de receptores Toll-like de mamíferos que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), os receptores Toll de drosófila reconhecem a proteína Spatzler, que então dispara uma cascata de sinais culminando na expressão de AMPs, como revisado por Lemaitre & Hoffmann, 2007 (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

Em mamíferos a indução da expressão de AMPs em resposta a um patógeno se dá principalmente por sinais mediados por receptores Toll-like (TLR) ou em resposta a citocinas. Um exemplo é a  $\beta$ -defensina humana 2, cujos níveis de mRNA e acúmulo do peptídeo aumentam após ativação de TLR2 por LPS (Hertz *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003). Diversas outras defensinas são expressas mediante estímulo por TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e interferon- $\gamma$  (Harder *et al.*, 2001; Harder *et al.*, 2004).

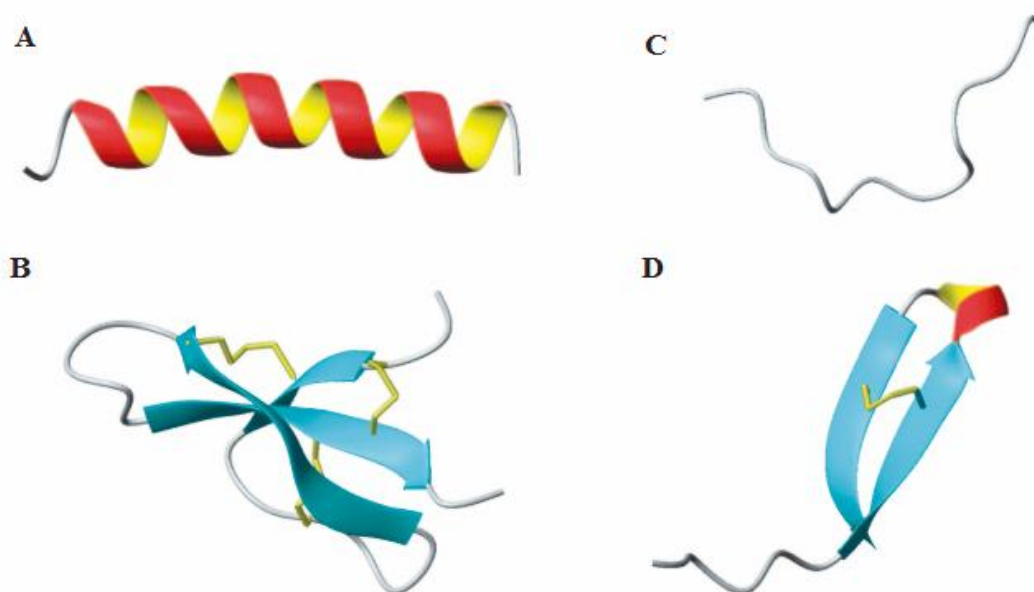
Esses peptídeos são sintetizados na forma de pre-pro-peptídeos que se tornam biologicamente ativos após clivagem proteolítica. Em neutrófilos humanos, o pro-peptídeo hCAP18 é clivado liberando um peptídeo de 37 resíduos de aminoácidos, a LL-37. Muitos peptídeos são originados da clivagem de outras moléculas não relacionadas à atividade antimicrobiana em si, como as castestatinas que são provenientes da clivagem do pró-hormônio cromogranina A (Radek *et al.*, 2008).

Essas moléculas são encontradas onde há mais suscetibilidade de invasão ou circulação do patógeno, podendo ser expressas sistemicamente, como na hemolinfa de insetos e em leucócitos de animais vertebrados, ou em tecidos específicos, como em mucosas dos tratos oral, gastrointestinal, genital, urinário e respiratório, bem como na pele (Jenssen *et al.*, 2006).

## 1.5 Classificação e Estrutura de Peptídeos Antimicrobianos

Devido à grande diversidade de moléculas, a categorização desses peptídeos se dá principalmente pela estrutura secundária, tamanho, e composição de aminoácidos (Zasloff, 2002). Como já descrito anteriormente, os AMPs possuem, no geral, carga global positiva, devido principalmente à presença de múltiplos resíduos de argininas e lisinas, e 30% ou mais de sua sequência constituída por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Essas características permitem que o peptídeo se organize formando regiões carregadas positivamente e regiões hidrofóbicas, conferindo assim uma propriedade anfipática à molécula (Hancock and Sahl, 2006).

Em relação à estrutura secundária, essas moléculas podem ser divididas em pelo menos quatro grupos: peptídeos que apresentam estruturas em  $\alpha$ -hélice, estruturas em folhas- $\beta$  estabilizadas por ligações dissulfeto, estruturas estendidas e estruturas em loop (**Figura 2**), sendo as duas primeiras as mais comumente encontradas na natureza (Epanand and Vogel, 1999; Brogden, 2005; Lai and Gallo, 2009).



**Figura 2. Classes estruturais de peptídeos antimicrobianos. A.**  $\alpha$ -hélice da magainina-2. **B.** folhas- $\beta$  da defensina-1 de rim de coelho. **C.** Estrutura estendida da indolicidina. **D.** Estrutura em loop da tanatina. Adaptado de Jessen *et al.* 2006

### 1.5.1 Peptídeos com estrutura em $\alpha$ -hélice

Os peptídeos dessa classe são caracterizados por sua conformação em  $\alpha$ -hélice quando interagem com a membrana plasmática, podendo haver uma pequena dobra no

centro de suas moléculas. Alguns representantes dessa classe são as cecropinas A e P1, essa última isolada de nematoides do gênero *Ascaris* (Andersson *et al.*, 2003), as magaininas, presentes nas secreções da pele de anfíbios (Zasloff, 1987), e a catelicidina humana LL-37, expressa em diversos tecidos e mantidas concentradas principalmente em grânulos de neutrófilos (Wang, 2008).

Estudos por dicroísmo circular revelaram que a maioria dos peptídeos dessa classe, quando em solução aquosa, apresentam uma estrutura randômica e sem ordem (Tossi *et al.*, 1994; Gennaro *et al.*, 1998; Skerlavaj *et al.*, 1999). No entanto, essas moléculas na presença de micelas de dodecil sulfato de sódio (SDS), lipossomos fosfolipídicos ou lipídeo A assumem totalmente ou em grande parte a conformação em  $\alpha$ -hélice (Chen *et al.*, 1995; Turner *et al.*, 1998). Excepcionalmente, a catelicidina LL-37 assume a forma de hélice em meio aquoso com 15 mM de  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  ou  $\text{CF}_3\text{CO}_2^-$  (Johansson, 1998). A hélice formada apresenta uma face polar catiônica e outra face composta por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, essa disposição é essencial para a interação do peptídeo com as membranas biológicas e para seu mecanismo efector. Estudos demonstram que o aumento do conteúdo de  $\alpha$ -hélice está correlacionado ao aumento da atividade antimicrobiana. Uma deleção na região de “random coil” na porção N-terminal do AMP buforina II, proporcionou o aumento da atividade antibacteriana em Gram-positivas e Gram-negativas, mas não houve aumento da atividade antifúngica (Park *et al.*, 2000). O peptídeo com a região deletada apresentou um maior conteúdo de  $\alpha$ -hélice do que o peptídeo íntegro. A deleção ou a substituição de resíduos de aminoácidos que não favorecem a estruturação da molécula em hélice, como resíduos de glicina e prolina, potencializam a atividade antimicrobiana dessas moléculas, porém também aumenta a toxicidade para as células do hospedeiro, como revisado por Dathe & Wieprecht, 1999 (Dathe and Wieprecht, 1999)

#### 1.5.2 Peptídeos estruturados em folhas- $\beta$

Os peptídeos dessa classe contém resíduos de cisteínas que formam ligações dissulfeto e se estruturam em folhas- $\beta$  antiparalelas além de, no geral, também possuem carga residual positiva. Alguns exemplos são as brevevinas, as protegrinas e as defensinas, cada uma com uma, duas e três ligações dissulfeto respectivamente (Kokryakov *et al.*, 1993; Basir *et al.*, 2000; Ganz, 2003). As defensinas são os membros mais estudados dessa classe. Esses AMPs apresentam um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos e vírus, e são divididas em duas principais subfamílias, as  $\alpha$ -defensinas e  $\beta$ -defensinas (Ganz, 2003). Ambos membros dessas subfamílias possuem

seis resíduos de cisteína, no entanto, a ordem de pareamento das cisteínas que são conectadas por ligação dissulfeto é diferente e específico para cada grupo (Selsted and Ouellette, 2005). São essas ligações que estabilizam a estrutura em folha- $\beta$  e reduzem a flexibilidade da molécula.

A estrutura em folha- $\beta$  pode não ser tão importante para a atividade antimicrobiana. Estudos com análogos linearizados da taquiplesina, um peptídeo isolado de *Tachypleus tridentatus* e estabilizado por duas pontes dissulfeto (Nakamura *et al.*, 1988), demonstraram que a linearização do peptídeo não abole ou diminui drasticamente a sua atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias (Rao, 1999). No entanto, a linearização impede a translocação do peptídeo através da membrana lipídica (Matsuzaki *et al.*, 1997).

### 1.5.3 Peptídeos estendidos.

O grupo dos peptídeos estendidos são compostos principalmente por AMPs com altas repetições de um resíduo de aminoácido, como as indolicidinas, peptídeo ricos em resíduos de triptofano, as histatinas, ricas em resíduos de histidina e as bactericinas, ricas em resíduos de prolina (Selsted *et al.*, 1992; Shamova *et al.*, 1999; Kavanagh and Dowd, 2004). A estrutura final desses peptídeos é estabilizada por ligações de hidrogênio e interação de Van der Waals quando essas moléculas interagem com a membrana do patógeno (Powers and Hancock, 2003).

## **1.6 Especificidade a Patógenos**

Classicamente, os AMPs possuem como principal alvo e atividade a permeabilização da membrana citoplasmática de patógenos. No entanto, é necessário que esses AMPs sejam seletivos para as membranas desses organismos e não sejam tóxicos à membranas das células do hospedeiro. Nesse sentido, as diferenças das propriedades físico-químicas entre as membranas de procaríotos e eucariotos é fundamental para a seletividade desses peptídeos (Dathe and Wieprecht, 1999; Matsuzaki, 1999). No geral, as membranas externas de eucariotos são compostas majoritariamente por fosfolipídeos zwitteriônicos e por esteroides, como o ergosterol e o colesterol, de forma que a membrana tenha carga neutra. Já as membranas de bactérias são compostas por fosfolipídeos negativamente carregados. Além disso, o lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas e os ácidos teicóicos de Gram-positivas, que também são negativamente carregados, contribuem para que a superfície desses organismos seja mais eletronegativa do que a superfície celular de eucariotos (Yeaman and Yount, 2003).

Como já descrito acima, a maioria dos AMPs são moléculas catiônicas, de forma que a diferença eletrostática entre as membranas do patógeno e do hospedeiro é fundamental para a seletividade desses antimicrobianos. Além disso, a eletronegatividade da membrana do microorganismo é importante para atração e interação inicial dos peptídeos catiônicos com a superfície do patógeno (Brogden, 2005). No geral, o aumento da carga positiva de AMPs aumenta a atividade microbicida desses peptídeos até um certo limite. A partir desse limite, não há aumento na atividade antimicrobiana e pode haver inclusive perda da atividade, uma vez que um peptídeo muito carregado interage fortemente com os grupos polares dos fosfolípidos e não consegue se inserir na membrana (Dathe *et al.*, 2001).

Apesar de fungos terem na composição da membrana citoplasmática fosfolípidos aniônicos, uma parcela considerável são de fosfolípidos zwitteriônicos (Theis and Stahl, 2004). Dessa forma, a diferenciação entre as membranas de fungos e do hospedeiro ocorre em parte devido à presença do ergosterol nas membranas fúngicas, ao invés do colesterol presente nas membranas de eucariotos complexos, e na possível diferença de fluidez das membranas do fungo e do hospedeiro (Jean-Francois *et al.*, 2009). A parede celular do fungo também ajuda na diferenciação entre o patógeno e a célula do hospedeiro por meio da ligação do peptídeo com os componentes da parede celular. A ligação de Histatina 5, um conhecido antimicrobiano com alta atividade fungicida para *Candida albicans*, a  $\beta$ -glicanas da parede celular é essencial para que ocorra a morte do fungo. As células que apresentam defeito na parede celular, com a perda de  $\beta$ -glicanas são menos suscetíveis ao AMPs (Jang *et al.*, 2010).

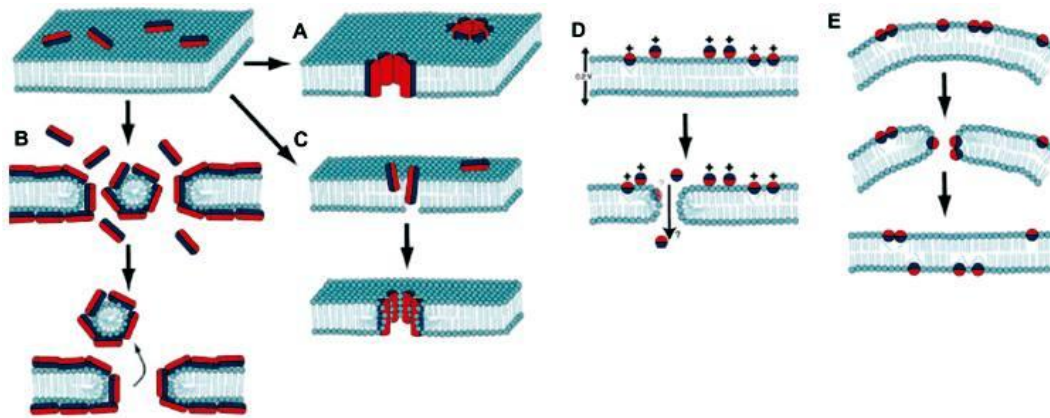
## **1.7 Mecanismo de Ação**

### **1.7.1 Peptídeos ativos em membranas**

Após a interação inicial, os AMPs geralmente se dispõem em orientação paralela em relação à membrana. Quando a concentração do peptídeo aumenta até atingir um limiar específico para cada antimicrobiano, as moléculas se orientam perpendicularmente à membrana e então se inserem na mesma formando os poros transmembrânicos, de maneira que a porção hidrofóbica do peptídeo interaja com o interior da bicamada lipídica (Yang *et al.*, 2001).

Alguns modelos de permeabilização da membrana são propostos, entre eles o modelo “barrel-stave”, o modelo de poro toroidal, o modelo “carpete”, eletroporação

molecular e o modelo “sinking-raft” (**Figura 3**). Nessa dissertação serão abordados apenas os três primeiros.



**Figura 3. Mecanismos de permeabilização da membrana por peptídeos antimicrobianos.**

Nessa figura, cinco dos principais modelos são propostos: **A.** Modelo “barrel-stave”, o peptídeo se insere na membrana de forma que a sua porção hidrofílica fique voltada para o lúmen do poro. **B.** Modelo “carpete”, os peptídeos se acumulam na superfície e rompem a membrana em uma ação semelhante à de detergentes. **C.** Poro toroidal, esse mecanismo difere do modelo “barrel-stave” uma vez que a porção hidrofílica do peptídeo está associada à cabeça polar dos fosfolípidos. **D.** Modelo da eletroporação molecular, a interação entre os peptídeos catiônicos e a superfície do patógeno promove uma diferença de potencial elétrico através da membrana, quando esse potencial atinge um limite um poro é formado por eletroporação molecular. **E.** Modelo “sinking-raft”, a ligação do peptídeo ao folheto externo provoca um desbalanço entre os dois folhetos até chegar em um ponto que o peptídeo se “afunda” na membrana, formando poros transientes. Adaptado de (Teixeira *et al.*, 2012)

No modelo “barrel-stave” os peptídeos se inserem na membrana na forma de monômeros, para então se oligomerizarem e formarem um poro em formato de barril, de maneira que a região hidrofóbica do peptídeo interaja com os lipídeos da membrana e a parte hidrofílica do peptídeo forme o lúmen do poro. Mais unidades monoméricas podem ser adicionadas, aumentando o tamanho do poro e permitindo o extravasamento do conteúdo citoplasmático do organismo, levando à morte da célula (Baumann and Mueller, 1974). Nesse mecanismo, a estrutura dos peptídeos em  $\alpha$  hélice e folha- $\beta$  são fundamentais para a formação do poro (Breukink and de Kruijff, 1999). A alameticina e possivelmente a Pandinina-2 formam esse tipo de poro (Yang *et al.*, 2001;Belokoneva *et al.*, 2004).



Já pelo modelo do poro toroidal, os peptídeos se inserem na membrana e forçam a formação de uma monocamada lipídica que se dobra continuamente através do poro, de forma que o seu interior é revestido tanto pelo peptídeo inserido quanto pelas cabeças polares dos fosfolípidos da membrana. Esse é o modelo de permeabilização dos AMPs magainina 2, protegrina -1, metilina e LL37 (Ludtke *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2001; Henzler Wildman *et al.*, 2003). Essas cabeças polares interagem com a região carregada positivamente do peptídeo (Matsuzaki *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2001).

No modelo “carpete”, os AMPs são atraídos eletrostaticamente à membrana e se acumulam na superfície da membrana, cobrindo-a como se fosse um carpete (Pouny *et al.*, 1992). Nesse modelo, não é necessária a inserção do peptídeo na região da membrana em si, ou a adoção de uma estrutura específica quando em contato com essa. Quando a concentração de peptídeos na superfície supera o limiar mínimo, a bicamada lipídica é desintegrada, similar à ação de um detergente, podendo inclusive gerar micelas. É possível que haja a formação de poros toroidais transientes momentos antes do colapso da membrana citoplasmática (Oren and Shai, 1998; Shai, 1999). Esse modelo é representado pelas cecropinas e a dermaseptina S. (Pouny *et al.*, 1992; Gazit *et al.*, 1995). Além da permeabilização, alguns peptídeos inserem-se em apenas um folheto da bicamada lipídica levando à redução da espessura nas regiões onde houve a ligação do peptídeo, desestabilizando a membrana (Mecke *et al.*, 2005).

### 1.7.2 Peptídeos não ativos em membranas.

A membrana do patógeno, no entanto, não é o único alvo para a ação de peptídeos antimicrobianos, bem como a sua permeabilização e ruptura não são os únicos mecanismos capazes de levar o patógeno à morte. Os AMPs também podem ter como alvo componentes intracelulares e podem interferir em processos de biossíntese da célula, como revisado recentemente por Guilhelmelli, *et al.*, 2003 (Guilhelmelli *et al.*, 2013).

Dentre esses outros mecanismos, pode ser destacados, por exemplo, a inibição da síntese de componentes da parede celular bacteriana. Já é descrito que a mersadina e a nisina são capazes de ligar e interferir na biossíntese de importantes precursores de peptidoglicanos, ácidos teicóicos e lipoteicóicos, resultando na inibição da síntese da parede celular (Brotz *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 2012). Muitos desses peptídeos são capazes de atravessar a membrana e de se acumularem no interior do citoplasma sem permeabilizar a bicamada lipídica, como é o caso da buforina II (Cho *et al.*, 2009). Esse peptídeo se liga ao DNA e ao RNA no interior da célula bacteriana inibindo a sua síntese (Park *et al.*, 1998). Outros peptídeos também são capazes de se ligarem a ácidos nucleicos

e bloquearem a sua síntese, como a indolicidina e a catelicidina PR-39 (Boman *et al.*, 1993; Nan *et al.*, 2009). O PR-39 também interfere na síntese protéica e atua como um inibidor do complexo proteossoma 20S (Anbanandam *et al.*, 2008). Enzimas também podem ser alvo da ação de AMPs, como a DNA girase que é inativada pela ligação do peptídeo bactericida microcidina B17 (del Castillo *et al.*, 2001; Collin *et al.*, 2013).

### 1.7.3 Mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos em fungos.

Os mecanismos acima descritos foram caracterizados essencialmente em modelos bacterianos. No entanto alguns outros mecanismos já foram reportados a peptídeos com ação antifúngica, antiparasitária e antiviral, no entanto será abordado apenas diferentes mecanismo para a atividade fungicida.

#### Peptídeos Antifúngicos

Peptídeos de diferentes origens são capazes de permeabilizar a membrana celular de fungos, dentre eles podem ser destacados os AMPs BMAP-27, BMAP-28 e SMAP-29, catelicidinas de origem bovina e ovina que possuem atividade antifúngica contra *C. albicans* e *C. neoformans* (Benincasa *et al.*, 2006), e os AMPs Parabutoporina e Opistoporina 1, isolados da peçonha de escorpião africano e que formam poros nas membranas de *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Neurospora crassa* e *Saccharomyces cerevisiae* (Moerman *et al.*, 2002). Alguns peptídeos precisam se ligar a componentes da parede celular e da membrana citoplasmática como uma etapa para a sua permeabilização. Cecropina B e dermaseptina precisam se ligar ao ergosterol como parte do mecanismo que leva à morte de espécies do gênero *Aspergillus* e *Fusarium* (De Lucca *et al.*, 1998). Já a defensina de planta NaD1 só é capaz de permeabilizar a membrana de *Fusarium oxysporum* por meio de sua ligação a proteínas glicosiladas da parede celular (van der Weerden *et al.*, 2010). Esses estudos evidenciam a importância do ergosterol e da parede celular na seletividade dos AMPs a fungos. Outros alvos que não a bicamada lipídica também já foram descritos para fungos. Alguns peptídeos isolados de sementes de amaranto se ligam à quitina, interferindo na síntese da parede celular, inibindo o crescimento do fungo (Broekaert *et al.*, 1992). Outro AMP de planta causa a despolarização da actina, impedindo o crescimento de fungos como *S. cerevisiae* e *C. albicans* (Koo *et al.*, 2004).

Outros peptídeos antifúngicos podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a apoptose. A defensina de planta PvD1 mata as células fúngicas de *C. albicans* e *F. oxysporum* tanto por permeabilização da membrana quanto por danos causados por estresse oxidativo via produção de ROS e óxido nítrico. Já a defensina

HsAFP1 induz diversos sinais pró-apoptóticos, entre eles acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), fragmentação do DNA e exposição na membrana externa de fosfatidilserina (Aerts *et al.*, 2011).

Dentre os AMPs que possuem alvos intracelulares podem ser destacados a Histatina-5 (Hst-5), apesar do seu mecanismo de ação ainda ser controverso. Histatina-5 é um potente antifúngico presente na saliva humana com atividade em diferentes espécies de fungos, sendo sua atividade antifúngica melhor descrita para o gênero *Candida* (Rayhan *et al.*, 1992). Como já descrito acima, a Hst-5 necessita da ligação a  $\beta$ -glicanas como seu mecanismo de ação microbicida. Uma vez ligado, o peptídeo é translocado para o citosol (Jang *et al.*, 2010) via transportadores de poliaminas Dur3 e Dur31 (Kumar *et al.*, 2011). Espécies resistentes a Hst-5, como *C. glabrata*, tem sua resistência revertida quando elas passam a expressar esses transportadores (Tati *et al.*, 2013). Uma vez dentro da célula, o peptídeo se associa à mitocôndria afetando a respiração celular e como consequência, aumentando a produção de ROS, o que acarretaria na morte celular por estresse oxidativo (Helmerhorst *et al.*, 1999; Helmerhorst *et al.*, 2001). Porém, Veerman *et al.*, 2004 mostraram que a produção de ROS não é preponderante na atividade fungicida de Hst-5 (Veerman *et al.*, 2004). O mecanismo atualmente mais aceito é por meio do efluxo de ATP, potássio e magnésio levando a um desbalanço iônico (Koshlukova *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999) mediado pelo transportador de potássio Trk1 (Baev *et al.*, 2004). É importante ressaltar que a Hst-5 causa esse efluxo sem alterar a integridade da membrana.

É importante ressaltar que AMPs podem ser multifuncionais e ter mecanismos de ação diferentes de acordo com o organismo alvo. A indolicidina mata tanto bactérias, quanto fungos e vírus, porém cada um de maneiras diferentes. Em bactérias, a indolicidina inibe a síntese de DNA (Nan *et al.*, 2009), porém em fungos o peptídeo permeabiliza a célula (Lee *et al.*, 2003). O peptídeo ainda é capaz de inibir a integrase do vírus HIV, mostrando assim a sua versatilidade de mecanismos frente a diferentes patógenos.

### **1.8. Resistência a peptídeos antimicrobianos**

Por terem como principal alvo a membrana citoplasmática de bactérias e fungos, o desenvolvimento de resistência a esses AMPs é difícil, tornando-os excelentes candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos. No entanto, uma vez que esses organismos estão em constante contato com AMPs, é de se esperar que algumas espécies tenham adquirido estratégias para sua defesa contra esses peptídeos.

Os mecanismos mais comuns de resistência a AMPs envolve remodelamento da superfície bacteriana, de forma que esta torne-se menos eletronegativa, a produção de cápsula polissacarídica que impede que os AMPs cheguem ao seu alvo, degradação proteolítica por proteases produzidas pelo patógeno, efluxo do peptídeo por meio de bombas ou transportadores e sequestro do peptídeo por moléculas produzidas pelo patógeno (Guilhelmelli *et al.*, 2013). Como parte de um mecanismo de resistência, alguns patógenos induzem a diminuição dos níveis de expressão de genes de AMPs do hospedeiro, como por exemplo a bactéria *Shigella flexneri* que inibe a expressão de LL-37 e da  $\beta$ -defensina 1 humana (Islam *et al.*, 2001; Sperandio *et al.*, 2008), e a cápsula de *Klebsiella pneumoniae* que também inibe a expressão d  $\beta$ -defensinas (Moranta *et al.*, 2010).

É importante ressaltar que os AMPs estão sujeitos a seleção positiva e são um dos grupos de proteínas que mais rapidamente evoluem em mamíferos (Patil *et al.*, 2004). É proposto que essa rápida evolução dos AMPs faça parte, na verdade, de um processo dinâmico de co-evolução em que o patógeno desenvolve mecanismos de resistência a esses AMPs, e o hospedeiro, em contrapartida, altera seu repertório de AMPs para combater de forma mais eficiente esses micro-organismos (Peschel and Sahl, 2006). Aparentemente, o processo evolutivo dos AMPs favoreceu aqueles peptídeos com múltiplos alvos ao invés de moléculas com alta afinidade a um alvo específico, essa estratégia permite que o hospedeiro controle a infecção sem criar uma pressão seletiva específica para determinado alvo, como ocorre para patógenos altamente resistentes a antibióticos que são muito específicos para apenas um único tipo de alvo (Peschel & Sahl, 2006).

Dessa forma, apesar dos relatos de surgimento de linhagens resistentes a alguns AMPs, estes ainda continuam sendo eficientes no controle e combate de infecções, sendo portanto moléculas promissoras para o estudo e desenvolvimento de novos fármacos.

### **1.9 Peptídeos Antimicrobianos presentes em peçonhas.**

Como visto acima, AMPs já foram identificados em praticamente todas as formas de vida existentes e, em organismos multicelulares, já foram identificados em diversos tecidos. A produção de AMPs também é comumente presente na peçonha tanto de animais vertebrados quanto de invertebrados. Dentre os animais vertebrados, podemos destacar a produção de AMPs pela glândula de peçonha de serpentes (de Oliveira Junior *et al.*, 2013). Wang *et al.*, 2008 isolou um AMP semelhante à catelicidinas da peçonha da

serpente *Bungarus fasciatus*, a qual foi nomeada catelicidina-BF (Wang *et al.*, 2008). Esse AMP é estruturado em hélice em contato com membranas e possui atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de organismos, sendo mais eficiente contra bactérias Gram-negativas e fungos (Wang *et al.*, 2008).

Em invertebrados, foi descrito a presença de AMPs na peçonha de insetos da ordem Hymenoptera. Um dos AMPs mais estudados é a melitina, um dos componentes mais abundantes na peçonha da abelha *Apis mellifera* (Raghuraman and Chattopadhyay, 2007). A melitina é um peptídeo formador de poros na membrana (Lee *et al.*, 2013) que se estrutura em  $\alpha$ -hélice e tem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, contra fungos, contra parasitas e atividade inseticida em *D. melanogaster* (Fennell *et al.*, 1967; Mitchell *et al.*, 1971; Carter *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013). Já foram identificados também AMPs com atividade antibacteriana e antifúngica em vespas (Mortari *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013) e em formigas (Orivel *et al.*, 2001).

Ainda no filo Arthropoda, os aracnídeos também possuem na composição de suas peçonhas uma vasta gama de AMPs. Em aranhas, o primeiro AMPs descoberto da peçonha foi uma lycotoxina que apresentou atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (Wu *et al.*, 1999). Os AMPs de peçonha de escorpiões serão detalhados a seguir.

### **1.10 Peptídeos Antimicrobianos presentes em peçonhas de escorpiões.**

Os peptídeos de peçonha de escorpião podem ser divididos em duas classes, os peptídeos com ligação dissulfeto (Disulfide-bridged peptides – DBPs), geralmente contendo três a quatro ligações e os peptídeos sem ligações dissulfeto (Non-disulfide-bridged peptides – NDBPs) (Zeng *et al.*, 2005). Os DBPs geralmente possuem como alvo os canais de íons presentes nas membranas das células, entre eles os canais de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (DeBin *et al.*, 1993; Possani *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 2013), sendo portanto uma interessante fonte de possíveis fármacos para tratamento de diversas doenças neurológicas, como esclerose múltipla, Doença de Parkinson e Alzheimer, epilepsia, esquizofrenia entre outras (Gati *et al.*, 2012). O grupo dos NDBPs representam mais de um terço dos peptídeos de peçonha de escorpião, e apesar disso eram pouco estudados até recentemente quando passaram a atrair a atenção dos grupos de pesquisa devido à diversas possíveis atividades biológicas que esses peptídeos podem desempenhar, incluindo a atividade antimicrobiana (Almaaytah and Albalas, 2014), nosso foco de interesse. A grande maioria dos NDBPs foram identificados e tiveram sua atividade caracterizada apenas na última década (Zeng *et al.*, 2005), muito em parte pela combinação de técnicas

como o fracionamento por HPLC, espectrometria de massa e construção de bibliotecas de cDNA derivadas do mRNA da glândula de peçonha que possibilitou a identificação de seqüências prováveis de NDBPs (Schwartz *et al.*, 2008;Silva *et al.*, 2009).

Os NDBPs de escorpião possuem entre 13 a 56 resíduos de aminoácidos e exibem uma grande diversidade de seqüências (Almaaytah and Albalas, 2014). A maioria dos peptídeos estruturam-se e em uma  $\alpha$ -hélice anfipática e são moléculas catiônicas. Dentre esses que se estruturam em hélice, alguns peptídeos possuem apenas um único domínio  $\alpha$ -hélicoidal flanqueado em ambas as extremidades terminais por regiões de “random coil”, sendo o caso dos NDBPs Pandinina2, BmKb1 e IsCT (Corzo *et al.*, 2001;Dai *et al.*, 2002;Zeng *et al.*, 2004). Outros peptídeos se estruturam de forma a apresentar duas regiões  $\alpha$ -hélicoidais separadas por uma região de “random coil”, organização essa observada nos peptídeos Hadrurina, Pandinina 1, Opistoporina 1 e Parabutoporina (Corzo *et al.*, 2001;Moerman *et al.*, 2002). Assim como AMPs helicoidais, esses NDBPs em solução aquosa tendem a se apresentar em conformação randômica, se estruturando em hélice na presença de solventes e micelas que mimetizam o ambiente da membrana citoplasmática (Corzo *et al.*, 2001;Dai *et al.*, 2002). Dessa forma, as características físico-químicas desses peptídeos se assemelham a muitas características de AMPs já caracterizados, de forma que essa classe de toxinas de escorpião pode ser uma fonte interessante na busca de novas moléculas antimicrobianas.

De fato, a maioria dos NDBPs são AMPs que inibem o crescimento de um amplo espectro de organismos, como bactérias, fungos (**Tabela 1**), protozoários (Gao *et al.*, 2010) e vírus (Chen *et al.*, 2012), e tendo como mecanismo de atividade principal a permeabilização da membrana por meio da formação de poros (Belokoneva *et al.*, 2004).

**Tabela 1.** A atividade antimicrobiana e hemolítica de NDBPs.

NDBP	Atividade Antimicrobiana			Atividade hemolítica
	Gram+	Gram-	Fungo	
Hadrurina	+	+	ND	+
Pandinina 1	+	+	-	+
Pandinina 2	+	+	+	+
Opistoporina 1	+	+	+	ND
BmKb1	+	+	ND	ND
BmKb2	+	+	ND	ND
IsCT	+	+	ND	+
IsCT2	+	+	ND	+
Parabutoporina	+	+	ND	+
Mucroporina	+	+	ND	ND
Meucina-13	+	+	+	+
Meucina-18	+	+	+	+
Imcroporina	+	+	ND	+
StCT1	+	+	ND	+
StCT2	+	-	ND	+
Im-1	+	+	ND	ND
Vejovina	-	+	ND	+
Ctriporina	+	+	ND	ND
BmKbpp	+	+	+	+
VmCT1	+	+	ND	+
VmCT2	+	+	ND	+
AamAP1	+	+	+	+
AamAP2	+	+	+	+
HsAP	+	+	+	+
UyCT1	+	+	ND	+
Pantinina-1	+	+	+	+
Pantinina2	+	+	+	+
Pantinina-3	+	+	+	+
TsAP-1	+	+	+	+
TsAP-2	+	+	+	+

Gram+, Gram-positiva; Gram-, Gram-negativa; ND, não determinado: + presença de atividade; - ausência de atividade. Adaptado de Almaaytah & Albalas, 2013

Alguns AMPs desse grupo também possuem atividade imunomodulatória. Os NDBPs Opistoporina 1, Opistoporina 2 e Parabutoporina podem estimular ou inibir a

atividade de neutrófilos humanos (Willems *et al.*, 2002). Esses peptídeos também induzem a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e o aumento do influxo desse cátion para a célula, processo pelo qual medeia a desgranulação de granulócitos humanos (Moerman *et al.*, 2003). Além disso alguns NDBPs também possuem atividade antitumoral (Guo *et al.*, 2013). No entanto, muitos desses peptídeos também apresentam uma alta atividade hemolítica (**Tabela 1**), limitando o potencial desses AMPs no uso terapêutico, mas podendo servir como um poderoso arsenal voltado tanto para uso tópico como também em etapas da confecção de biomateriais que possam ser utilizados na fabricação de dispositivos e instrumentos utilizados na prática médica, como catéteres, próteses, válvulas mecânicas, entre outros. A utilização de superfícies antimicrobianas evitaria, por exemplo, que bactérias e fungos se aderissem na superfície desses dispositivos, impedindo assim a formação e maturação de biofilmes, um dos maiores responsáveis por infecções hospitalares associadas a biomateriais e de difícil tratamento dado a sua resistência intrínseca (Etienne *et al.*, 2005; Alves and Olivia Pereira, 2014).

De fato, apesar das diversas evidências mostrando que AMPs são promissoras moléculas como um novo conceito na concepção de novos fármacos, o número de drogas desenvolvidas com base em AMPs no mercado ou em ensaios clínicos é bastante limitado (Fox, 2013). Os principais entraves para utilização pela indústria farmacêutica está na grande suscetibilidade desses peptídeos a degradação por enzimas proteolíticas e também à toxicidade dos AMPs ao hospedeiro. Até o presente momento apenas foram desenvolvidos fármacos de uso tópico, que superam, em parte, esses entraves (Hancock and Sahl, 2006). Porém, a indústria farmacêutica tem maior interesse em drogas que possam atuar de forma sistêmica no organismo, seja por administração por via oral ou parenteral, uma vez que essas drogas são mais *lucrativas*. Outro grande entrave é o alto custo de produção desses peptídeos para a indústria, uma vez que a sua síntese química é ainda muito cara (Hancock & Sahl, 2006).

Ainda são necessários mais estudos para superar essas dificuldades, envolvendo tanto o desenho racional desses AMPs para que se tornem menos tóxicos e mais resistentes à proteólise, como otimização da produção de peptídeos utilizando sistemas biológicos de expressão (Hancock & Sahl, 2006).

Também pode ser observado na **Tabela 1** que os estudos desses AMPs em modelos fúngicos ainda são bastante insipientes. Dessa forma, essa dissertação é mais um esforço na caracterização de NDBPs com atividade antifúngica e que possam originar um novo produto biotecnológico.



## **2. OJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Caracterizar o efeito antifúngico de peptídeos presentes na peçonha de escorpiões em linhagens de *Cryptococcus neoformans*.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima letal (CML) de peptídeos da peçonha de escorpião com atividade antifúngica para linhagens da espécie *C. neoformans*;
2. Verificar o efeito protetor da cápsula e da melanina produzidas pelo fungo quando tratado com os peptídeos;
3. Identificar possíveis alterações na morfologia e ultraestrutura de *C. neoformans* após tratamento com o peptídeo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Linhagens Celulares e Manutenção

A linhagem H99 de *C. neoformans var. grubii* (sorotipo A) e a linhagem B3501 de *C. neoformans var. neoformans* (sorotipo D) foram crescidas por 48 horas em meio líquido Sabouraud pH 7,2 (Sabouraud Dextrose Broth, Difco) a 30°C, 150 rpm para posterior preparo de estoques da cultura em glicerol 35%, os quais foram mantidos e armazenados a -80°C. Esses estoques foram usados para a semeadura por esgotamento em placas de Sabouraud sólido (Sabouraud + ágar 1,6%, pH 7,2) a cada 14 dias. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 48h e armazenadas posteriormente a 4°C. Antes de cada um dos experimentos realizados, uma colônia isolada do fungo foi inoculada em meio Sabouraud líquido e crescida por 24h a 30°C, 150 rpm. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 2000g/25°C/5 min e lavadas 3 vezes em tampão fosfato (PBS). Essas linhagens foram escolhidas por serem as mais

#### 3.2 Meios de cultura e Soluções

##### Sabouraud

Sabouraud caldo 3% (p/v)

pH = 7,2 esterilização por autoclavagem a 120°C por 15 minutos.

Para o meio sólido, adição de 1,6% de ágar.

##### Tampão Fosfato Salina (PBS)

NaCl 137 mM

KCl 2,7 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM

pH = 7,4 esterilização por autoclavagem a 120°C por 20 minutos.

##### RPMI

RPMI-1640 1,04 % (p/v)

MOPS 0,165 M

pH = 7,2 esterilização por filtração em membranas do tipo milipore 0,22 µm.

### Meio Mínimo

Glicose	15 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	29,4 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glicina	13 mM
Tiamina	3 μM

pH = 5,5 esterilização por autoclavagem a 120°C por 20 minutos. A tiamina deve ser esterilizada por filtração (em membranas de 0,22 μm) e acrescentada ao meio após a autoclavagem e resfriamento.

### **3.3 Seleção, síntese e preparo das soluções estoque dos peptídeos testados.**

#### **CONFIDENCIAL**

Uma alíquota de cada peptídeo foi analisada em espectrômetro de massa (MALDI-TOF/TOF UltraFlex III Bruker Daltonics®, Alemanha) para a confirmação da massa molecular de cada peptídeo e avaliação da pureza da síntese (**Apêndice A**). Os peptídeos foram misturados a uma matriz de ácido α-cyano-4-hidroxi-cinâmico, volume a volume (1:1), sendo posteriormente aplicados em triplicada em uma placa Bruker MTP Massive 384. Após a cristalização, as amostras foram analisadas. Os espectros de massa foram obtidos com o equipamento sendo operado no modo refletido positivo. A interpretação dos espectros obtidos foi realizada manualmente e com o auxílio do software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics®, Alemanha).

**3.4 Análise das propriedades físico-químicas e busca em banco de dados por peptídeos antimicrobianos semelhante já descritos na literatura.**

Para cada peptídeo foi avaliada por softwares de predição a estrutura secundária, porcentagem de  $\alpha$ -hélice, hidropaticidade e carga global em pH neutro. A predição da estrutura secundária e porcentagem de  $\alpha$ -hélice foram feitas utilizando-se o método PHD na ferramenta disponível no site [http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_secons.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_secons.html). Já a hidropaticidade e a carga

total foram determinadas pela ferramenta "Feature Calculator", disponível no site <http://www.camp.bicnirrh.res.in/featcalc/> e pela ferramenta "Innovagen peptide property calculator", encontrada no site <http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp> respectivamente.

A busca por sequências de peptídeos similares descritos na literatura foi realizada por meio de análises comparativas contra o banco de dados CAMP (Collection of Anti-Microbial Peptides – Database; <http://www.camp.bicnirrh.res.in/index.php/>). Buscou-se peptídeos que já estivessem validados experimentalmente e que já tivessem sua atividade antimicrobiana caracterizada. O alinhamento múltiplo das sequências de interesse foi realizado com a ferramenta ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>), utilizando-se a configuração padrão.

### **3.5 Teste de microdiluição em caldo para a determinação da possível atividade antifúngica e da Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos peptídeos.**

A determinação da possível atividade antifúngica dos peptídeos foi realizada de acordo com a norma M27-A2 estabelecida pelo Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, (antigo NCCLS) com modificações. Foi feita uma diluição seriada em razão de 2 das soluções dos peptídeos diluídos em água e do antifúngico anfotericina B (Sigma, A2942). A diluição seriada foi feita em placas estéreis descartáveis de 96 poços de fundo chato e em água estéril, de forma que ao final os poços tivessem 50 µL de uma solução 2X da concentração de peptídeo final desejada. Para os peptídeos diluídos em DMSO foram preparadas alíquotas 10X de cada concentração testada para posterior diluição em razão de 1:5 em água estéril a fim de que em cada poço houvesse uma solução 2X da concentração desejada. Uma colônia isolada do fungo *C. neoformans* H99 ou B3501 foi inoculada em meio Sabouraud líquido e crescida por 24h a 30°C, 150 rpm. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 2000g/25°C/5 min e lavadas 3 vezes em tampão fóstato (PBS) e ressuspensas em meio RPMI 2X. As células foram contadas em Câmara de Neubauer e a concentração do inóculo ajustada para  $2 \times 10^4$  células/mL. Foi acrescentado aos poços 50 µL desse inóculo, de forma o volume final fosse 100 µL.

A concentração final inoculada foi de  $10^4$  células/mL, as concentrações de peptídeo variaram de 100 µM a 0,78 µM e de anfotericina B variou de 16 a 0,003 µg/mL. Para os peptídeos 3 e NDBP-5.5 diluídos em 20% e 60% de DMSO, as concentrações finais do solvente foram de 0,4% e 0,8% respectivamente. Em cada placa foi feito controle de crescimento (inóculo de leveduras + água estéril), um controle de crescimento

contendo apenas DMSO, concentração final de 0,4% e 0,8%, e um branco (RPMI + água estéril). As placas foram seladas com filme estéril e incubadas a 37°C, 200 rpm e após 48 horas de incubação a avaliação do crescimento do fungo foi feita por meio de análise visual e fotografias digitais.

A partir dos resultados obtidos pelo ensaio acima descrito, selecionou-se os peptídeos com atividade antimicrobiana e determinou-se as suas faixas de atividade antifúngica. Para a determinação da CMI, o ensaio acima foi realizado em triplicata biológica com algumas modificações. As leveduras foram cultivadas na presença de concentrações crescentes dos peptídeos em intervalos regulares de concentração, dentro da faixa de atividade antimicrobiana obtida pela análise visual, de cada peptídeo ao invés de uma diluição seriada. Após 48 horas de incubação, a avaliação do crescimento do fungo foi obtida por densitometria óptica a 630 nm utilizando espectrofotômetro de placa. Os CMI<sub>50</sub> e CMI<sub>90</sub> foram calculados por meio de regressão não linear usando-se o software GraphPad Prism versão 5.00.

### **3.6 Determinação da Concentração Mínima Letal (CML)**

A determinação do CML foi realizada de acordo com Torre-Rodriguez *et al.*, 2008 mas com modificações (Torres-Rodriguez *et al.*, 2008). Brevemente, após a realização do ensaio acima descrito, foram semeados 10 µL dos poços sem crescimento visível em placas de Sabouraud sólido, bem como dos poços do controle de crescimento e do branco. As placas foram incubadas em estufa a 30° C por 48 horas. O CML foi definido como a menor concentração em que não houve crescimento visível de nenhuma colônia.

### **3.7 Verificação do papel protetor da cápsula e melanina contra os peptídeos antimicrobianos.**

Para a indução tanto de cápsula como de melanina, leveduras de *C. neoformans* H99 foram inoculadas em meio mínimo a uma concentração final de 10<sup>7</sup> células/mL, volume final de 10 mL, e incubadas a 30°C, 150 rpm, protegidas da luz. Após 72 horas de crescimento, foi adicionado L-DOPA a apenas uma das culturas em concentração final de 1 mM para a produção de melanina. Depois de 48 horas, as culturas não-melanizada (sem adição de L-DOPA) e melanizada (com adição de L-DOPA) foram utilizadas em testes de microdiluição em caldo na presença ou ausência dos AMPs como descrito no item 3.5. Não foi adicionado L-DOPA no meio RPMI-1640 das culturas previamente melanizadas uma vez que o L-DOPA oxida nesse meio.

### **3.8 Efeito do peptídeo 6 na morfologia de *C. neoformans* H99**

A avaliação do efeito no peptídeo 6 na morfologia de *C. neoformans* H99 foi realizada utilizando-se a metodologia de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Células do fungo ( $10^6$  células/mL) foram incubadas com 10X da concentração do CMI<sub>90</sub> do peptídeo 6 em meio RPMI por 2 horas, à 37°C. As células do controle foram incubadas apenas em meio RPMI por 2 horas, à 37°C. Após o tratamento, as células foram coletadas por centrifugação (10 minutos, 3000 g) e lavadas em tampão PBS por 3 vezes. Depois da última lavagem, as células foram fixadas em solução de Karnovsky (2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 3% sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2) durante 1 hora a temperatura ambiente e 24 horas a 4°C. Após esse período, as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e aderidas em lamínulas com poli-L-lisina para então serem pós-fixadas com tetróxido de ósmio (2%), por 1 hora, com as amostras sendo protegidas da luz. Feita a pós-fixação, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% - 20 minutos cada; 100% - três incubações de 20 minutos cada). Imediatamente após a desidratação, as amostras foram submetidas à secagem ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> (BAL-TEC CPD-030 – Electron Microscopy Sciences, USA) e revestidas com paládio (Balzers Union SCD-040 – Electron Microscopy Sciences, USA). O material foi observado no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-7001F operado a 15 kV.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

**CONFIDENCIAL**



**CONFIDENTIAL**

**CONFIDENTIAL**

**CONFIDENTIAL**

**CONFIDENTIAL**

**CONFIDENTIAL**

**CONFIDENTIAL**

**CONFIDENTIAL**

**CONFIDENTIAL**



**CONFIDENTIAL**

**CONFIDENTIAL**

**CONFIDENTIAL**

**CONFIDENTIAL**

**CONFIDENTIAL**

**CONFIDENTIAL**

**CONFIDENTIAL**

**CONFIDENTIAL**



## 5. CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi caracterizado o efeito antifúngico de peptídeos inéditos e peptídeos já descritos na literatura, de peçonha de escorpião em duas linhagens de *C. neoformans*. A carga residual positiva dos AMPs de escorpião parece ser um importante parâmetro para a sua eficiência na inibição do crescimento do fungo. Além disso, foi mostrado que a cápsula do fungo pode exercer um importante papel na atração eletrostática do peptídeo, havendo indicações de um efeito atrator que poderia ser dependente do tamanho da capsula o que resultaria em uma maior suscetibilidade fúngica. A melanina também parece exercer um efeito aditivo na atração dos AMPs para as proximidades da membrana. Por fim, foi demonstrado que o Peptídeo 6 é capaz de causar danos na morfologia do fungo.

É importante ressaltar que a busca na literatura não revelou dados de estudos com peptídeos antimicrobianos de escorpião, apresentando efeito antifúngico contra *C. neoformans*, de forma que esse trabalho será pioneiro nesse sentido.

## 6. PERSPECTIVAS

Esse trabalho foi um passo inicial na caracterização de AMPs de peçonha de escorpião com atividade contra *C. neoformans*, porém, ainda restam diversas perguntas a serem respondidas.

Ensaio de dicroísmo circular estão sendo realizados para a determinação da estrutura secundária dos AMPs de peçonha empregados neste estudo, de modo a corroborar a potencial importância da estrutura em  $\alpha$ -hélice nas atividades antimicrobianas descritas.

Para a determinação do provável mecanismo efetor dos peptídeos, ensaios de citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de transmissão estão sendo realizados para melhor avaliar se os peptídeos são capazes de permeabilizar as leveduras de *C. neoformans*. Outras metodologias também poderão ser empregadas visando a corroborar e melhor fundamentar o mecanismo de ação destes peptídeos.

Estudos com linhagens acapsulares também serão realizados para determinação do papel da cápsula na suscetibilidade do fungo frente aos AMPs. Nesse sentido, já estão programados ensaios com mutantes sem cápsula da linhagem cap67 para avaliação do efeito antifúngico dos AMPs em comparação à linhagem parental. Serão realizados também novos estudos para confirmar a inibição da produção da cápsula pelo Peptídeo 6.

Estão sendo realizados estudos desses peptídeos no processo de adesão e formação de biofilmes, bem como na suscetibilidade dos biofilmes maduros ao tratamento com os AMPs.

É também de interesse do grupo estudos com outras linhagens do fungo, como isolados clínicos e também com a espécie *C. gatti* que vem ganhando destaque uma vez que é capaz de infectar pacientes imunocompetentes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerts, A.M., Bammens, L., Govaert, G., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., Cammue, B.P., and Thevissen, K. (2011). The Antifungal Plant Defensin HsAFP1 from *Heuchera sanguinea* Induces Apoptosis in *Candida albicans*. *Front Microbiol* 2, 47.
- Alcouloumre, M.S., Ghannoum, M.A., Ibrahim, A.S., Selsted, M.E., and Edwards, J.E. (1993). Fungicidal properties of defensin NP-1 and activity against *Cryptococcus neoformans* in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37, 2628-2632.
- Almaaytah, A., and Albalas, Q. (2014). Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review. *Peptides* 51, 35-45.
- Almaaytah, A., Zhou, M., Wang, L., Chen, T., Walker, B., and Shaw, C. (2012). Antimicrobial/cytolytic peptides from the venom of the North African scorpion, *Androctonus amoreuxi*: biochemical and functional characterization of natural peptides and a single site-substituted analog. *Peptides* 35, 291-299.
- Alves, D., and Olivia Pereira, M. (2014). Mini-review: Antimicrobial peptides and enzymes as promising candidates to functionalize biomaterial surfaces. *Biofouling*.
- Anbanandam, A., Albarado, D.C., Tirziu, D.C., Simons, M., and Veeraraghavan, S. (2008). Molecular basis for proline- and arginine-rich peptide inhibition of proteasome. *J Mol Biol* 384, 219-227.
- Andersson, M., Boman, A., and Boman, H.G. (2003). *Ascaris* nematodes from pig and human make three antibacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides. *Cell Mol Life Sci* 60, 599-606.
- Armstrong-James, D., Meintjes, G., and Brown, G.D. (2014). A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends Microbiol* 22, 120-127.
- Baev, D., Rivetta, A., Vylkova, S., Sun, J.N., Zeng, G.F., Slayman, C.L., and Edgerton, M. (2004). The TRK1 potassium transporter is the critical effector for killing of *Candida albicans* by the cationic protein, Histatin 5. *J Biol Chem* 279, 55060-55072.
- Barbosa, F.M., Daffre, S., Maldonado, R.A., Miranda, A., Nimrichter, L., and Rodrigues, M.L. (2007). Gomesin, a peptide produced by the spider *Acanthoscurria gomesiana*, is a potent anticryptococcal agent that acts in synergism with fluconazole. *FEMS Microbiol Lett* 274, 279-286.
- Barona, J., Batista, C. V.F., Zamudio, F.Z., Gomez-Laguna, F., Wanke, E., Otero, R., and Possani, L.D. (2006). Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na<sup>+</sup>- and K<sup>+</sup>-channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *Biochim Biophys Acta* 1764, 76-84.
- Basir, Y.J., Knoop, F.C., Dulka, J., and Conlon, J.M. (2000). Multiple antimicrobial peptides and peptides related to bradykinin and neuromedin N isolated from skin secretions of the pickerel frog, *Rana palustris*. *Biochim Biophys Acta* 1543, 95-105.
- Baumann, G., and Mueller, P. (1974). A molecular model of membrane excitability. *J Supramol Struct* 2, 538-557.
- Belokoneva, O.S., Satake, H., Mal'tseva, E.L., Pal'mina, N.P., Villegas, E., Nakajima, T., and Corzo, G. (2004). Pore formation of phospholipid membranes by the action of two hemolytic arachnid peptides of different size. *Biochim Biophys Acta* 1664, 182-188.
- Benincasa, M., Scocchi, M., Pacor, S., Tossi, A., Nobili, D., Basaglia, G., Busetto, M., and Gennaro, R. (2006). Fungicidal activity of five cathelicidin peptides against clinically isolated yeasts. *J Antimicrob Chemother* 58, 950-959.
- Benincasa, M., Scocchi, M., Podda, E., Skerlavaj, B., Dolzani, L., and Gennaro, R. (2004). Antimicrobial activity of Bac7 fragments against drug-resistant clinical isolates. *Peptides* 25, 2055-2061.
- Boman, H.G., Agerberth, B., and Boman, A. (1993). Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun* 61, 2978-2984.

- Breukink, E., and De Kruijff, B. (1999). The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochim Biophys Acta* 1462, 223-234.
- Brizendine, K.D., and Pappas, P.G. (2010). Cryptococcal meningitis: current approaches to management in patients with and without AIDS. *Curr Infect Dis Rep* 12, 299-305.
- Broekaert, W.F., Marien, W., Terras, F.R., De Bolle, M.F., Proost, P., Van Damme, J., Dillen, L., Claeys, M., Rees, S.B., Vanderleyden, J., and Et Al. (1992). Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry* 31, 4308-4314.
- Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3, 238-250.
- Brotz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P.E., and Sahl, H.G. (1998). The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 154-160.
- Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A., Levitz, S.M., Netea, M.G., and White, T.C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 4, 165rv113.
- Cao, L., Li, Z., Zhang, R., Wu, Y., Li, W., and Cao, Z. (2012). StCT2, a new antibacterial peptide characterized from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus*. *Peptides* 36, 213-220.
- Carter, V., Underhill, A., Baber, I., Sylla, L., Baby, M., Larget-Thiery, I., Zettor, A., Bourgouin, C., Langel, U., Faye, I., Otvos, L., Wade, J.D., Coulibaly, M.B., Traore, S.F., Tripet, F., Eggleston, P., and Hurd, H. (2013). Killer bee molecules: antimicrobial peptides as effector molecules to target sporogonic stages of *Plasmodium*. *PLoS Pathog* 9, e1003790.
- Casadevall, A., Rosas, A.L., and Nosanchuk, J.D. (2000). Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology* 3, 354-358.
- Chen, C., Brock, R., Luh, F., Chou, P.J., Larrick, J.W., Huang, R.F., and Huang, T.H. (1995). The solution structure of the active domain of CAP18--a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. *FEBS Lett* 370, 46-52.
- Chen, Y., Cao, L., Zhong, M., Zhang, Y., Han, C., Li, Q., Yang, J., Zhou, D., Shi, W., He, B., Liu, F., Yu, J., Sun, Y., Cao, Y., Li, Y., Li, W., Guo, D., Cao, Z., and Yan, H. (2012). Anti-HIV-1 activity of a new scorpion venom peptide derivative Kn2-7. *PLoS One* 7, e34947.
- Cho, J.H., Sung, B.H., and Kim, S.C. (2009). Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochim Biophys Acta* 1788, 1564-1569.
- Cleare, W., and Casadevall, A. (1999). Scanning electron microscopy of encapsulated and non-encapsulated *Cryptococcus neoformans* and the effect of glucose on capsular polysaccharide release. *Med Mycol* 37, 235-243.
- Collin, F., Thompson, R.E., Jolliffe, K.A., Payne, R.J., and Maxwell, A. (2013). Fragments of the bacterial toxin microcin B17 as gyrase poisons. *PLoS One* 8, e61459.
- Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K.J., He, W., Norton, R.S., and Nakajima, T. (2001). Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem J* 359, 35-45.
- Cowland, J.B., and Borregaard, N. (1999). The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J Leukoc Biol* 66, 989-995.
- Dai, C., Ma, Y., Zhao, Z., Zhao, R., Wang, Q., Wu, Y., Cao, Z., and Li, W. (2008). Mucroporin, the first cationic host defense peptide from the venom of *Lychas mucronatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 3967-3972.
- Dai, L., Corzo, G., Naoki, H., Andriantsiferana, M., and Nakajima, T. (2002). Purification, structure-function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 1514-1522.
- Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., and Bienert, M. (2001). Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett* 501, 146-150.

- Dathe, M., and Wieprecht, T. (1999). Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta* 1462, 71-87.
- De Fatima Lisboa Fernandes, O., Costa, C.R., De Souza Lino Junior, R., Vinaud, M.C., Hasimoto, E.S.L.K., De Paula, J.A., and Do Rosario Rodrigues Silva, M. (2012). Effects of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum, on melanized and non-melanized *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 174, 421-428.
- De Lucca, A.J., Bland, J.M., Jacks, T.J., Grimm, C., and Walsh, T.J. (1998). Fungicidal and binding properties of the natural peptides cecropin B and dermaseptin. *Med Mycol* 36, 291-298.
- De Oliveira Junior, N.G., E Silva Cardoso, M.H., and Franco, O.L. (2013). Snake venoms: attractive antimicrobial proteinaceous compounds for therapeutic purposes. *Cell Mol Life Sci* 70, 4645-4658.
- Debin, J.A., Maggio, J.E., and Strichartz, G.R. (1993). Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am J Physiol* 264, C361-369.
- Del Castillo, F.J., Del Castillo, I., and Moreno, F. (2001). Construction and characterization of mutations at codon 751 of the *Escherichia coli* gyrB gene that confer resistance to the antimicrobial peptide microcin B17 and alter the activity of DNA gyrase. *J Bacteriol* 183, 2137-2140.
- Del Poeta, M., and Casadevall, A. (2012). Ten Challenges on *Cryptococcus* and Cryptococcosis. *Mycopathologia* 173, 303-310.
- Doering, T.L., Nosanchuk, J.D., Roberts, W.K., and Casadevall, A. (1999). Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. *Med Mycol* 37, 175-181.
- Eisenman, H.C., and Casadevall, A. (2012). Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol* 93, 931-940.
- Epand, R.M., and Vogel, H.J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* 1462, 11-28.
- Etienne, O., Gasnier, C., Taddei, C., Voegel, J.C., Aunis, D., Schaaf, P., Metz-Boutigue, M.H., Bolcato-Bellemin, A.L., and Egles, C. (2005). Antifungal coating by biofunctionalized polyelectrolyte multilayered films. *Biomaterials* 26, 6704-6712.
- Fennell, J.F., Shipman, W.H., and Cole, L.J. (1967). Antibacterial action of a bee venom fraction (melittin) against a penicillin-resistant staphylococcus and other microorganisms. USNRDL-TR-67-101. *Res Dev Tech Rep*, 1-13.
- Fernandez-Vidal, M., Jayasinghe, S., Ladokhin, A.S., and White, S.H. (2007). Folding amphipathic helices into membranes: amphiphilicity trumps hydrophobicity. *J Mol Biol* 370, 459-470.
- Fox, J.L. (2013). Antimicrobial peptides stage a comeback. *Nat Biotechnol* 31, 379-382.
- Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 710-720.
- Ganz, T., Selsted, M.E., Szklarek, D., Harwig, S.S., Daher, K., Bainton, D.F., and Lehrer, R.I. (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76, 1427-1435.
- Gao, B., Sherman, P., Luo, L., Bowie, J., and Zhu, S. (2009). Structural and functional characterization of two genetically related meucic peptides highlights evolutionary divergence and convergence in antimicrobial peptides. *FASEB J* 23, 1230-1245.
- Gao, B., Xu, J., Rodriguez Mdel, C., Lanz-Mendoza, H., Hernandez-Rivas, R., Du, W., and Zhu, S. (2010). Characterization of two linear cationic antimalarial peptides in the scorpion *Mesobuthus eupeus*. *Biochimie* 92, 350-359.
- Garcia, F., Villegas, E., Espino-Solis, G.P., Rodriguez, A., Paniagua-Solis, J.F., Sandoval-Lopez, G., Possani, L.D., and Corzo, G. (2013). Antimicrobial peptides from arachnid venoms and their microbicidal activity in the presence of commercial antibiotics. *J Antibiot (Tokyo)* 66, 3-10.

- Gati, C.D., Mortari, M.R., and Schwartz, E.F. (2012). Towards therapeutic applications of arthropod venom k(+)-channel blockers in CNS neurologic diseases involving memory acquisition and storage. *J Toxicol* 2012, 756358.
- Gazit, E., Boman, A., Boman, H.G., and Shai, Y. (1995). Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry* 34, 11479-11488.
- Gennaro, R., Scocchi, M., Merluzzi, L., and Zanetti, M. (1998). Biological characterization of a novel mammalian antimicrobial peptide. *Biochim Biophys Acta* 1425, 361-368.
- Ghannoum, M.A., and Rice, L.B. (1999). Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 501-+.
- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L.D., Silva-Pereira, I., and Kyaw, C.M. (2013). Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol* 4, 353.
- Guo, X., Ma, C., Du, Q., Wei, R., Wang, L., Zhou, M., Chen, T., and Shaw, C. (2013). Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. *Biochimie* 95, 1784-1794.
- Hancock, R.E., and Sahl, H.G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* 24, 1551-1557.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schroder, J.M. (2001). Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276, 5707-5713.
- Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Wehkamp, K., Schwichtenberg, L., and Schroder, J.M. (2004). Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol* 123, 522-529.
- Helmerhorst, E.J., Breeuwer, P., Van't Hof, W., Walgreen-Weterings, E., Oomen, L.C., Veerman, E.C., Amerongen, A.V., and Abee, T. (1999). The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *J Biol Chem* 274, 7286-7291.
- Helmerhorst, E.J., Troxler, R.F., and Oppenheim, F.G. (2001). The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14637-14642.
- Helmerhorst, E.J., Van't Hof, W., Veerman, E.C., Simoons-Smit, I., and Nieuw Amerongen, A.V. (1997). Synthetic histatin analogues with broad-spectrum antimicrobial activity. *Biochem J* 326 ( Pt 1), 39-45.
- Henzler Wildman, K.A., Lee, D.K., and Ramamoorthy, A. (2003). Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry* 42, 6545-6558.
- Hertz, C.J., Wu, Q., Porter, E.M., Zhang, Y.J., Weismuller, K.H., Godowski, P.J., Ganz, T., Randell, S.H., and Modlin, R.L. (2003). Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol* 171, 6820-6826.
- Hirsch, J.G. (1956). Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 103, 589-611.
- Hull, C.M., and Heitman, J. (2002). Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Genet* 36, 557-615.
- Idnurm, A., Bahn, Y.S., Nielsen, K., Lin, X., Fraser, J.A., and Heitman, J. (2005). Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol* 3, 753-764.
- Islam, D., Bandholtz, L., Nilsson, J., Wigzell, H., Christensson, B., Agerberth, B., and Gudmundsson, G. (2001). Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat Med* 7, 180-185.
- Jang, W.S., Bajwa, J.S., Sun, J.N., and Edgerton, M. (2010). Salivary histatin 5 internalization by translocation, but not endocytosis, is required for fungicidal activity in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 77, 354-370.

- Jean-Francois, F., Desbat, B., and Dufourc, E.J. (2009). Selectivity of cateslytin for fungi: the role of acidic lipid-ergosterol membrane fluidity in antimicrobial action. *FASEB J* 23, 3692-3701.
- Jenssen, H., Hamill, P., and Hancock, R.E.W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 19, 491-+.
- Johansson, J. (1998). Conformation-dependent Antibacterial Activity of the Naturally Occurring Human Peptide LL-37. *Journal of Biological Chemistry* 273, 3718-3724.
- Kanafani, Z.A., and Perfect, J.R. (2008). Resistance to antifungal agents: Mechanisms and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases* 46, 120-128.
- Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., and Kozik, A. (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica* 56, 211-224.
- Kavanagh, K., and Dowd, S. (2004). Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J Pharm Pharmacol* 56, 285-289.
- Kokryakov, V.N., Harwig, S.S., Panyutich, E.A., Shevchenko, A.A., Aleshina, G.M., Shamova, O.V., Korneva, H.A., and Lehrer, R.I. (1993). Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett* 327, 231-236.
- Koo, J.C., Lee, B., Young, M.E., Koo, S.C., Cooper, J.A., Baek, D., Lim, C.O., Lee, S.Y., Yun, D.J., and Cho, M.J. (2004). Pn-AMP1, a plant defense protein, induces actin depolarization in yeasts. *Plant Cell Physiol* 45, 1669-1680.
- Koshlukova, S.E., Lloyd, T.L., Araujo, M.W., and Edgerton, M. (1999). Salivary histatin 5 induces non-lytic release of ATP from *Candida albicans* leading to cell death. *J Biol Chem* 274, 18872-18879.
- Kumar, R., Chadha, S., Saraswat, D., Bajwa, J.S., Li, R.A., Conti, H.R., and Edgerton, M. (2011). Histatin 5 uptake by *Candida albicans* utilizes polyamine transporters Dur3 and Dur31 proteins. *J Biol Chem* 286, 43748-43758.
- Lai, Y.P., and Gallo, R.L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology* 30, 131-141.
- Lee, D.G., Kim, H.K., Kim, S.A., Park, Y., Park, S.-C., Jang, S.-H., and Hahm, K.-S. (2003). Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phospholipid membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305, 305-310.
- Lee, M.T., Sun, T.L., Hung, W.C., and Huang, H.W. (2013). Process of inducing pores in membranes by melittin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 14243-14248.
- Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 25, 697-743.
- Li, M., Liao, Y., Chen, M., Pan, W.H., and Weng, L.X. (2012). Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus* species complex isolates from AIDS and non-AIDS patients in Southeast China. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 16, 175-179.
- Lin, X. (2009). *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infect Genet Evol* 9, 401-416.
- Lin, X., and Heitman, J. (2006). The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol* 60, 69-105.
- Ludtke, S.J., He, K., Heller, W.T., Harroun, T.A., Yang, L., and Huang, H.W. (1996). Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* 35, 13723-13728.
- Luna-Ramirez, K., Quintero-Hernandez, V., Vargas-Jaimes, L., Batista, C.V., Winkel, K.D., and Possani, L.D. (2013). Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoi*: Molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity. *Toxicon* 63, 44-54.
- Martinez, L.R., and Casadevall, A. (2006a). *Cryptococcus neoformans* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. *Infect Immun* 74, 6118-6123.
- Martinez, L.R., and Casadevall, A. (2006b). Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1021-1033.

- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* 1462, 1-10.
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., and Miyajima, K. (1996). An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* 35, 11361-11368.
- Matsuzaki, K., Yoneyama, S., Fujii, N., Miyajima, K., Yamada, K., Kirino, Y., and Anzai, K. (1997). Membrane permeabilization mechanisms of a cyclic antimicrobial peptide, tachyplesin I, and its linear analog. *Biochemistry* 36, 9799-9806.
- Maurya, I.K., Thota, C.K., Sharma, J., Tupe, S.G., Chaudhary, P., Singh, M.K., Thakur, I.S., Deshpande, M., Prasad, R., and Chauhan, V.S. (2013). Mechanism of action of novel synthetic dodecapeptides against *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 1830, 5193-5203.
- Mcfadden, D.C., De Jesus, M., and Casadevall, A. (2006). The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. *Journal of Biological Chemistry* 281, 1868-1875.
- Mecke, A., Lee, D.K., Ramamoorthy, A., Orr, B.G., and Banaszak Holl, M.M. (2005). Membrane thinning due to antimicrobial peptide binding: an atomic force microscopy study of MSI-78 in lipid bilayers. *Biophys J* 89, 4043-4050.
- Menard, S., Forster, V., Lotz, M., Gutle, D., Duerr, C.U., Gallo, R.L., Henriques-Normark, B., Putsep, K., Andersson, M., Glocker, E.O., and Hornef, M.W. (2008). Developmental switch of intestinal antimicrobial peptide expression. *J Exp Med* 205, 183-193.
- Mitchell, H.K., Lowy, P.H., Sarmiento, L., and Dickson, L. (1971). Melittin: toxicity to *Drosophila* and inhibition of acetylcholinesterase. *Arch Biochem Biophys* 145, 344-348.
- Moerman, L., Bosteels, S., Noppe, W., Willems, J., Clynen, E., Schoofs, L., Thevissen, K., Tytgat, J., Van Eldere, J., Van Der Walt, J., and Verdonck, F. (2002). Antibacterial and antifungal properties of  $\alpha$ -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *European Journal of Biochemistry* 269, 4799-4810.
- Moerman, L., Verdonck, F., Willems, J., Tytgat, J., and Bosteels, S. (2003). Antimicrobial peptides from scorpion venom induce  $Ca^{2+}$  signaling in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 90-97.
- Moranta, D., Regueiro, V., March, C., Llobet, E., Margareto, J., Larrarte, E., Garmendia, J., and Bengoechea, J.A. (2010). *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of beta-defensins by airway epithelial cells. *Infect Immun* 78, 1135-1146.
- Mortari, M.R., Do Couto, L.L., Dos Anjos, L.C., Mourao, C.B., Camargos, T.S., Vargas, J.A., Oliveira, F.N., Gati Cdel, C., Schwartz, C.A., and Schwartz, E.F. (2012). Pharmacological characterization of *Synoeca cyanea* venom: an aggressive social wasp widely distributed in the Neotropical region. *Toxicon* 59, 163-170.
- Muller, A., Ulm, H., Reder-Christ, K., Sahl, H.G., and Schneider, T. (2012). Interaction of type A lantibiotics with undecaprenol-bound cell envelope precursors. *Microb Drug Resist* 18, 261-270.
- Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., and Shimonishi, Y. (1988). Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). Isolation and chemical structure. *J Biol Chem* 263, 16709-16713.
- Nakatsuji, T., and Gallo, R.L. (2012). Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *J Invest Dermatol* 132, 887-895.
- Nan, Y.H., Park, K.H., Park, Y., Jeon, Y.J., Kim, Y., Park, I.S., Hahm, K.S., and Shin, S.Y. (2009). Investigating the effects of positive charge and hydrophobicity on the cell selectivity, mechanism of action and anti-inflammatory activity of a Trp-rich antimicrobial peptide indolicidin. *FEMS Microbiol Lett* 292, 134-140.
- Nikawa, H., Fukushima, H., Makihira, S., Hamada, T., and Samaranayake, L.P. (2004). Fungicidal effect of three new synthetic cationic peptides against *Candida albicans*. *Oral Dis* 10, 221-228.



- Nosanchuk, J.D., and Casadevall, A. (1997). Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin, and monoclonal antibody binding. *Infect Immun* 65, 1836-1841.
- Nosanchuk, J.D., and Casadevall, A. (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology* 5, 203-223.
- Nosanchuk, J.D., Cleare, W., Franzot, S.P., and Casadevall, A. (1999). Amphotericin B and fluconazole affect cellular charge, macrophage phagocytosis, and cellular morphology of *Cryptococcus neoformans* at subinhibitory concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 233-239.
- O'meara, T.R., and Alspaugh, J.A. (2012). The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. *Clin Microbiol Rev* 25, 387-408.
- Okuda, D., Yomogida, S., Kuwahara-Arai, K., Hitamatsu, K., Tamura, H., and Nagaoka, I. (2009). Augmentation of the antimicrobial activities of guinea pig cathelicidin CAP11-derived peptides by amino acid substitutions. *Int J Mol Med* 23, 501-508.
- Oren, Z., and Shai, Y. (1998). Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47, 451-463.
- Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J.P., Krier, F., Revol-Junelles, A.M., Longeon, A., Chaffotte, A., Dejean, A., and Rossier, J. (2001). Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. *J Biol Chem* 276, 17823-17829.
- Pan, W.H., Khayhan, K., Hagen, F., Wahyuningsih, R., Chakrabarti, A., Chowdhary, A., Ikeda, R., Taj-Aldeen, S.J., Khan, Z., Imran, D., Sjam, R., Sriburee, P., Liao, W.Q., Chaicumpar, K., Ingviya, N., Mouton, J.W., Curfs-Breuker, I., Boekhout, T., Meis, J.F., and Klaassen, C.H.W. (2012). Resistance of Asian *Cryptococcus neoformans* Serotype A Is Confined to Few Microsatellite Genotypes. *Plos One* 7.
- Park, B.J., Wannemuehler, K.A., Marston, B.J., Govender, N., Pappas, P.G., and Chiller, T.M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23, 525-530.
- Park, C.B., Kim, H.S., and Kim, S.C. (1998). Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 244, 253-257.
- Park, C.B., Yi, K.S., Matsuzaki, K., Kim, M.S., and Kim, S.C. (2000). Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8245-8250.
- Patil, A., Hughes, A.L., and Zhang, G. (2004). Rapid evolution and diversification of mammalian alpha-defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes. *Physiol Genomics* 20, 1-11.
- Peschel, A., and Sahl, H.G. (2006). The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* 4, 529-536.
- Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M., and Tytgat, J. (1999). Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup>-channels. *Eur J Biochem* 264, 287-300.
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P., and Shai, Y. (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 31, 12416-12423.
- Powers, J.P., and Hancock, R.E. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24, 1681-1691.
- Radek, K.A., Lopez-Garcia, B., Hupe, M., Niesman, I.R., Elias, P.M., Taupenot, L., Mahata, S.K., O'connor, D.T., and Gallo, R.L. (2008). The neuroendocrine peptide catestatin is a cutaneous antimicrobial and induced in the skin after injury. *J Invest Dermatol* 128, 1525-1534.
- Raghuraman, H., and Chattopadhyay, A. (2007). Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Biosci Rep* 27, 189-223.
- Rao, A.G. (1999). Conformation and antimicrobial activity of linear derivatives of tachyplesin lacking disulfide bonds. *Arch Biochem Biophys* 361, 127-134.

- Rayhan, R., Xu, L., Santarpia, R.P., 3rd, Tylenda, C.A., and Pollock, J.J. (1992). Antifungal activities of salivary histidine-rich polypeptides against *Candida albicans* and other oral yeast isolates. *Oral Microbiol Immunol* 7, 51-52.
- Romani, L. (2011). Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 11, 275-288.
- Rothstein, D.M., Spacciapoli, P., Tran, L.T., Xu, T., Roberts, F.D., Dalla Serra, M., Buxton, D.K., Oppenheim, F.G., and Friden, P. (2001). Anticandida activity is retained in P-113, a 12-amino-acid fragment of histatin 5. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 1367-1373.
- Sable, C.A., Strohmaier, K.M., and Chodakewitz, J.A. (2008). Advances in antifungal therapy. *Annual Review of Medicine* 59, 361-379.
- Schwartz, E.F., Bartok, A., Schwartz, C.A., Papp, F., Gomez-Lagunas, F., Panyi, G., and Possani, L.D. (2013). OcyKTx2, a new K(+)-channel toxin characterized from the venom of the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Peptides* 46, 40-46.
- Schwartz, E.F., Camargos, T.S., Zamudio, F.Z., Silva, L.P., Bloch, C., Jr., Caixeta, F., Schwartz, C.A., and Possani, L.D. (2008). Mass spectrometry analysis, amino acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon* 51, 1499-1508.
- Selsted, M.E., Novotny, M.J., Morris, W.L., Tang, Y.Q., Smith, W., and Cullor, J.S. (1992). Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J Biol Chem* 267, 4292-4295.
- Selsted, M.E., and Ouellette, A.J. (2005). Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 6, 551-557.
- Shai, Y. (1999). 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* 1462, 55-70.
- Shamova, O., Brogden, K.A., Zhao, C., Nguyen, T., Kokryakov, V.N., and Lehrer, R.I. (1999). Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes. *Infect Immun* 67, 4106-4111.
- Shapiro, R.S., Robbins, N., and Cowen, L.E. (2011). Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 213-267.
- Sharma, A., and Srivastava, S. (2014). Anti-*Candida* activity of two-peptide bacteriocins, plantaricins (Pln E/F and J/K) and their mode of action. *Fungal Biol* 118, 264-275.
- Silva, E.C., Camargos, T.S., Maranhao, A.Q., Silva-Pereira, I., Silva, L.P., Possani, L.D., and Schwartz, E.F. (2009). Cloning and characterization of cDNA sequences encoding for new venom peptides of the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon* 54, 252-261.
- Skerlavaj, B., Benincasa, M., Risso, A., Zanetti, M., and Gennaro, R. (1999). SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes. *FEBS Lett* 463, 58-62.
- Skerlavaj, B., Scocchi, M., Gennaro, R., Risso, A., and Zanetti, M. (2001). Structural and functional analysis of horse cathelicidin peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 715-722.
- Sperandio, B., Regnault, B., Guo, J., Zhang, Z., Stanley, S.L., Jr., Sansonetti, P.J., and Pedron, T. (2008). Virulent *Shigella flexneri* subverts the host innate immune response through manipulation of antimicrobial peptide gene expression. *J Exp Med* 205, 1121-1132.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., and Boman, H.G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292, 246-248.
- Supaphon, P., Phongpaichit, S., Rukachaisirikul, V., and Sakayaroj, J. (2013). Antimicrobial potential of endophytic fungi derived from three seagrass species: *Cymodocea serrulata*, *Halophila ovalis* and *Thalassia hemprichii*. *PLoS One* 8, e72520.
- Tati, S., Jang, W.S., Li, R., Kumar, R., Puri, S., and Edgerton, M. (2013). Histatin 5 resistance of *Candida glabrata* can be reversed by insertion of *Candida albicans* polyamine transporter-encoding genes DUR3 and DUR31. *PLoS One* 8, e61480.
- Teixeira, V., Feio, M.J., and Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog Lipid Res* 51, 149-177.

- Theis, T., and Stahl, U. (2004). Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cell Mol Life Sci* 61, 437-455.
- Thompson, G.R., 3rd, Wiederhold, N.P., Fothergill, A.W., Vallor, A.C., Wickes, B.L., and Patterson, T.F. (2009). Antifungal susceptibilities among different serotypes of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 309-311.
- Torres-Rodriguez, J.M., Alvarado-Ramirez, E., Murciano, F., and Sellart, M. (2008). MICs and minimum fungicidal concentrations of posaconazole, voriconazole and fluconazole for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J Antimicrob Chemother* 62, 205-206.
- Tossi, A., Scocchi, M., Skerlavaj, B., and Gennaro, R. (1994). Identification and characterization of a primary antibacterial domain in CAP18, a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. *FEBS Lett* 339, 108-112.
- Turner, J., Cho, Y., Dinh, N.N., Waring, A.J., and Lehrer, R.I. (1998). Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 2206-2214.
- Van Der Weerden, N.L., Hancock, R.E., and Anderson, M.A. (2010). Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process. *J Biol Chem* 285, 37513-37520.
- Van Duin, D., Casadevall, A., and Nosanchuk, J.D. (2002). Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 3394-3400.
- Veerman, E.C., Nazmi, K., Van't Hof, W., Bolscher, J.G., Den Hertog, A.L., and Nieuw Amerongen, A.V. (2004). Reactive oxygen species play no role in the candidacidal activity of the salivary antimicrobial peptide histatin 5. *Biochem J* 381, 447-452.
- Venkatesan, P., Perfect, J.R., and Myers, S.A. (2005). Evaluation and management of fungal infections in immunocompromised patients. *Dermatol Ther* 18, 44-57.
- Wang, G. (2008). Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *J Biol Chem* 283, 32637-32643.
- Wang, X., Zhang, Z., Louboutin, J.P., Moser, C., Weiner, D.J., and Wilson, J.M. (2003). Airway epithelia regulate expression of human beta-defensin 2 through Toll-like receptor 2. *FASEB J* 17, 1727-1729.
- Wang, Y., Hong, J., Liu, X., Yang, H., Liu, R., Wu, J., Wang, A., Lin, D., and Lai, R. (2008). Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. *PLoS One* 3, e3217.
- Willems, J., Noppe, W., Moerman, L., Van Der Walt, J., and Verdonck, F. (2002). Cationic peptides from scorpion venom can stimulate and inhibit polymorphonuclear granulocytes. *Toxicon* 40, 1679-1683.
- Wu, M., Maier, E., Benz, R., and Hancock, R.E. (1999). Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38, 7235-7242.
- Xu, Y., Ambudkar, I., Yamagishi, H., Swaim, W., Walsh, T.J., and O'Connell, B.C. (1999). Histatin 3-mediated killing of *Candida albicans*: effect of extracellular salt concentration on binding and internalization. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 2256-2262.
- Yan, R., Zhao, Z., He, Y., Wu, L., Cai, D., Hong, W., Wu, Y., Cao, Z., Zheng, C., and Li, W. (2011). A new natural alpha-helical peptide from the venom of the scorpion *Heterometrus petersii* kills HCV. *Peptides* 32, 11-19.
- Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L., and Huang, H.W. (2001). Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J* 81, 1475-1485.
- Yang, X., Wang, Y., Lee, W.H., and Zhang, Y. (2013). Antimicrobial peptides from the venom gland of the social wasp *Vespa tropica*. *Toxicon* 74, 151-157.
- Yeaman, M.R., and Yount, N.Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 55, 27-55.
- Zaragoza, O., Chrisman, C.J., Castelli, M.V., Frases, S., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J.L., and Casadevall, A. (2008). Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans*

- confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol* 10, 2043-2057.
- Zaslloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5449-5453.
- Zaslloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.
- Zeng, X.C., Corzo, G., and Hahin, R. (2005). Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB Life* 57, 13-21.
- Zeng, X.C., Wang, S.X., Zhu, Y., Zhu, S.Y., and Li, W.X. (2004). Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. *Peptides* 25, 143-150.
- Zeng, X.C., Zhou, L., Shi, W., Luo, X., Zhang, L., Nie, Y., Wang, J., Wu, S., Cao, B., and Cao, H. (2013). Three new antimicrobial peptides from the scorpion *Pandinus imperator*. *Peptides* 45, 28-34.
- Zhai, B., and Lin, X. (2013). Evaluation of the anticryptococcal activity of the antibiotic polymyxin B in vitro and in vivo. *Int J Antimicrob Agents* 41, 250-254.
- Zhao, X., Wu, H., Lu, H., Li, G., and Huang, Q. (2013). LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides. *PLoS One* 8, e66557.
- Zhao, Z., Ma, Y., Dai, C., Zhao, R., Li, S., Wu, Y., Cao, Z., and Li, W. (2009). Imcroporin, a new cationic antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 3472-3477.

**APÊNDICE A**

**CONFIDENCIAL**

**CONFIDENTIAL**

**CONFIDENTIAL**

**CONFIDENTIAL**



**CONFIDENTIAL**

**CONFIDENTIAL**

**CONFIDENTIAL**

**APÊNDICE B**

**CONFIDENCIAL**