

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA DEFENSINA DE SEMENTES DE
Phaseolus vulgaris (PvD₁) EM COMBINAÇÃO COM FLUCONAZOL
SOBRE AS LEVEDURAS *Candida tropicalis* E *Candida albicans*

EVILLYN JACINTO TOFANELLI

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL – 2018

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA DEFENSINA DE SEMENTES
DE *Phaseolus vulgaris* (PvD₁) EM COMBINAÇÃO COM
FLUCONAZOL SOBRE AS LEVEDURAS *Candida tropicalis* E
Candida albicans

EVILLYN JACINTO TOFANELLI

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

ORIENTADORA: PROF^a. VALDIRENE MOREIRA GOMES
CO-ORIENTADORA: DR^a ÉRICA DE OLIVEIRA MELLO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Biociências e Biotecnologia
da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

725 / 2018

Tofaneli, Evillyn Jacinto

Atividade antimicrobiana da defensina de sementes de *Phaseolus vulgaris* (PvD₁) em combinação com fluconazol sobre as leveduras *Candida tropicalis* e *Candida albicans* / Evillyn Jacinto Tofaneli. – Campos dos Goytacazes, 2018.

viii, 61 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Biociências e Biotecnologia. Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Gomes, Valdirene Moreira

Bibliografia: f. 48-61

1. Defensina 2. Antifúngico 3. Combinação 4. Leveduras
5. Resistência I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro II. Título

571.6

T644a

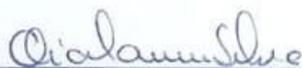
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA DEFENSINA DE SEMENTES DE
Phaseolus vulgaris (PvD₁) EM COMBINAÇÃO COM FLUCONAZOL
SOBRE AS LEVEDURAS *Candida tropicalis* E *Candida albicans*

EVILLYN JACINTO TOFANELLI

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

Aprovada em 26 de abril de 2018

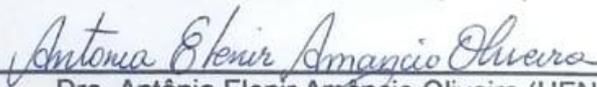
Comissão Examinadora



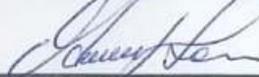
Dra. Luciana Berlamindo da Silva (IFF Campos)



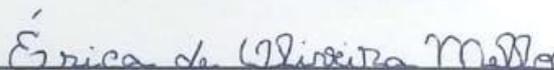
Dra. Maura Da Cunha (UENF)



Dra. Antônia Elenir Amâncio Oliveira (UENF)



Profª Valdirene Moreira Gomes (Drª em Ciências – UENF)
Orientadora



Drª Érica de Oliveira Mello (Drª em Biociências e Biotecnologia - UENF)
Co-orientadora

DEDICO....

À Deus em primeiro lugar, a minha mãe Maria Marlene, meu pai Jose Tofanelli, meus irmãos Leomar e Aline e ao amor da minha vida, meu namorado e companheiro Natan Ramos Cavalcante. Sem vocês eu jamais teria conseguido...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por ter me dado vida, saúde e coragem para encarar mais este desafio. Se hoje estou aqui, foi porque tuas mãos me guiaram...

Aos financiadores CAPES, CNPq e FAPERJ/UENF...

À prof^a Valdirene Moreira Gomes por ter acreditado em mim e me dado essa oportunidade. Por todo o aprendizado e experiência de vida que me proporcionou e por muitas vezes ter visto em mim um potencial que nem eu mesma conseguia ver, me dando ânimo e coragem para continuar essa jornada...

A minha co-orientadora (e anjo da guarda) Dr^a Érica de Oliveira Mello por ter sido meu pilar de sustentação durante esses dois anos. Por todo o carinho, paciência e dedicação com o qual me tratou, por me salvar sempre que eu me via perdida e por me dizer tantas vezes “Você vai conseguir” quando eu desacreditava de mim. Grande parte do crescimento profissional e pessoal que obtive, devo a você, ao seu apoio e aos seus ensinamentos. Sem sua ajuda eu não teria conseguido...

Aos professores membros da banca Dra. Maura Da Cunha, Dra. Luciana Berlamindo da Silva e Dra. Antônia Elenir Amâncio Oliveira, que gentilmente aceitaram participar desta defesa...

Um agradecimento especial ao Dr. Gabriel Taveira, que além de aceitar ser o revisor dessa dissertação, me ajudou em grande parte dos experimentos me ensinando com paciência e dedicação. Por ter me apadrinhado e ter me ajudado de bom grado em tantas coisas que não eram sua responsabilidade, por ter sido alguém com quem eu sempre pude contar se tornando parte essencial desse trabalho. Por ter sido junto com a Érica, meus “pais científicos” aos quais tenho grande carinho e admiração...

À Dr^a Gabriela Bard por ter me auxiliado e ensinado na etapa do HPLC...

Aos meus companheiros de bancada, Marcielle, Layrana, Rodrigo, Larissa pelos materiais e dias de HPLC cedidos, além de todas as conversas e risadas que fizeram meu dia-a-dia muito melhor.....

Ao Luiz e a Valéria pela dedicação em cuidar do nosso laboratório...

A todos os integrantes do grupo Val/André que me acolheram tão bem e me transmitiram sempre a sensação de estar trabalhando com uma grande família....

A todos os alunos, professores e funcionários do LFBM que fazem deste, um ambiente tão bom de se trabalhar...

Aos meus pais José e Marlene por todo o apoio emocional e financeiro, por sempre acreditarem na minha capacidade e sempre me apoiarem em meus projetos. Por todo o amor que me deram, e me dão, ao longo da vida e que fizeram de mim a pessoa que sou...

Aos meus irmãos Leomar e Aline, meus comparsas fieis de toda uma vida...

Ao melhor namorado com o qual Deus poderia ter me presenteado Natan Ramos Cavalcante, que me apoiou emocionalmente e financeiramente, cuidou de mim todo esse tempo, foi meu parceiro e amigo. Juntos, aprendemos tantas coisas e traçamos uma linda caminhada pela vida, sem você meu amor nada disso seria possível. Sou imensamente grata a Deus por ter me dado você para amar e ser amada, não há palavras para expressar o quanto sou feliz ao seu lado. Te amo...

A todos meu sincero e carinhoso Obrigada!!!!

Sumário

| | |
|--|------|
| LISTA DE FIGURAS E TABELAS | X |
| ABREVIATURAS..... | XIV |
| RESUMO | XVI |
| PALAVRAS CHAVE | XVI |
| ABSTRACT | XVII |
| KEY WORDS | XVII |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. <i>Candida</i> sp: Um Problema em Evidência | 1 |
| 1.2. Peptídeos Antimicrobianos de Plantas..... | 2 |
| 1.3. Defensinas de Plantas | 4 |
| 1.3.1. Atividades Biológicas..... | 7 |
| 1.3.2. Mecanismos de Ação..... | 8 |
| 1.4. A Defensina <i>PvD₁</i> | 10 |
| 2. OBJETIVOS | 15 |
| 2.1. Objetivo Geral | 15 |
| 2.2. Objetivos Específicos..... | 15 |
| 3. MATERIAIS..... | 16 |
| 3.1. Sementes..... | 16 |
| 3.2. Microrganismos | 16 |
| 4. MÉTODOS | 16 |
| 4.1. Extração e Purificação da Defensina <i>PvD₁</i> de Sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> | 16 |
| 4.1.1. Extração Proteica das Sementes | 16 |
| 4.1.2. Cromatografia de Troca Iônica em coluna de DEAE-Sepharose | 18 |
| 4.1.3. Cromatografia de Fase Reversa em Coluna C2/C18..... | 18 |
| 4.2. Quantificação de Proteínas | 19 |
| 4.3. Eletroforese em Gel de Tricina na Presença de SDS..... | 19 |
| 4.4. Coloração e Descoloração do Gel | 19 |
| 4.5. Curva de Crescimento das Leveduras <i>C. tropicalis</i> e <i>C. albicans</i> | 20 |
| 4.6. Determinação da Concentração de Defensina <i>PvD₁</i> e Fluconazol para Obtenção de 50 % de Inibição do Crescimento (IC ₅₀) sobre as Leveduras | 20 |
| 4.7. Análise da Atividade Antimicrobiana da Defensina <i>PvD₁</i> em Combinação com Fluconazol..... | 21 |
| 4.8. Efeitos da Defensina <i>PvD₁</i> em Combinação com Fluconazol sobre a Permeabilização de Membrana das Leveduras | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 4.9. Ensaio de Determinação da Indução de Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular (ROS) | 22 |
| 5. RESULTADOS | 23 |
| 5.1. Purificação da Defensina PvD ₁ de Sementes de <i>P. vulgaris</i> | 23 |
| 5.2. Eletroforese em Gel de Tricina na Presença de SDS | 24 |
| 5.3. Curva de Crescimento das Leveduras <i>Candida tropicalis</i> e <i>Candida albicans</i> | 25 |
| 5.4. Determinação da Concentração de Defensina PvD ₁ para obtenção 50 % de Inibição do Crescimento das Leveduras (IC ₅₀) | 26 |
| 5.5. Determinação da Concentração de Fluconazol para obtenção 50 % de Inibição do Crescimento das Leveduras..... | 28 |
| 5.6. Análise da Inibição do Crescimento das Leveduras pela Defensina PvD ₁ em Combinação com Fluconazol. | 29 |
| 5.7. Efeitos da Defensina PvD ₁ Sobre a Permeabilização de Membrana das Leveduras..... | 32 |
| 5.8. Efeitos da Defensina PvD ₁ em Combinação com Fluconazol Sobre a Indução da Produção Endógena de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) | 37 |
| 6. DISCUSSÃO | 42 |
| 7. CONCLUSÕES | 47 |
| 8. BIBLIOGRAFIA..... | 48 |

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1** – Representação esquemática das principais classes estruturais de peptídeos incluindo: α -hélices, folhas- β , α -hélices com folhas- β , cíclicos e lineares. As pontes dissulfeto, nos AMPs que as possuem, são representadas pelas bolas interligadas. (Adaptada de Silva *et al.* 2011).....3
- Figura 2** – Representação gráfica de estruturas terciárias elucidadas de diferentes defensinas de plantas com destaque (delimitadas por círculo) para as diferenças mais marcantes entre elas.....6
- Figura 3** – Representação esquemática da estrutura dos esfingolípídeos glicosilceramida e manosildifosfatidilceramida que são sítios de ligação das defensinas de plantas na membrana de fungos (Adaptado de Thevissen *et al.* 2004).....9
- Figura 4** – Representação esquemática do modo de ação mais complexo das defensinas de plantas (*PvD₁*; *Sd5*, *MsDef1*, *PsD1*, *RsAFP2*, *NaD1* e *HsAFP1*) contra fungos com indicação de seus alvos membranares e efeitos desencadeados pela interação. As cores correlacionam as defensinas com seus efeitos (Adaptado de De Coninck *et al.* 2013).....12
- Figura 5** – Representação esquemática do modo de ação dos azóis (adaptado de Cowen, 2008).....13
- Figura 6** – Esquema de fracionamento com sulfato de amônio do homogeneizado obtido a partir da extração da farinha de sementes de feijão comum (Games *et al.* 2008).....17
- Figura 7** – Cromatograma obtido após cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose da fração F/0-70. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0. O pico D1 foi eluído com tampão de equilíbrio da coluna (Tris-HCl 20 mM) e o pico D2 foi eluído com tampão Tris-HCl 20 mM + NaCl 1 M. Foram

coletadas frações de 3 mL por tubo, num total de 70 tubos, em um fluxo de 60 mL.h⁻¹.....23

Figura 8 – Cromatograma obtido após cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 em HPLC do pico D1 obtido após cromatografia em DEAE-Sepharose. A coluna foi equilibrada com uma solução de TFA 0,1% e a amostra foi eluída em um gradiente de acetonitrila 80%-TFA 0,1% de 0 a 100%, a um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹.....24

Figura 9 – Visualização eletroforética em gel de tricina na presença de SDS do pico D1 obtido após cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose e dos picos H1 e H2 obtidos por cromatografia em coluna de fase reversa C2/C18.....25

Figura 10 – Curva padrão de crescimento para determinação da fase LOG das células de *C. tropicalis* e *C. albicans*. O crescimento foi monitorado a cada h durante um período de 36 h através de leitura óptica a 620 nm.....26

Figura 11 – Curva de crescimento da levedura *C. tropicalis* e *C. albicans* em até 24 h na presença e na ausência da Defensina PvD₁ (A) para *C. tropicalis*, foram usadas as concentrações de: 25 µg/mL; 50 µg/mL; 100 µg/mL. (B) para *C. albicans*, foram usadas as concentrações de: 25 µg/mL; 50 µg/mL; 80 µg/mL ;100 µg/mL; 150 µg/mL.....28

Figura 12 – Curva de crescimento das células da levedura *C. albicans* em até 24 h na ausência e na presença de fluconazol nas seguintes concentrações: 0,1µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,3 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,5 µg/mL; 0,6 µg/mL; 0,7 µg/mL.....29

Tabela 1 – Porcentagem do efeito de inibição da PvD₁ e FLC sozinhos e em combinação mostrando o antagonismo em células de *C. tropicalis in vitro*.....30

Figura 13 - Curva de crescimento da levedura *C. tropicalis*, na ausência e na presença das seguintes concentrações: 50 µg/mL (*PvD*₁); 0,5 µg/mL (FLC); 50 µg/mL (*PvD*₁) + 0,5 µg/mL (FLC); 0,5 µg/mL (FLC) + 50 µg/mL (*PvD*₁).....30

Tabela 2 – Porcentagem de inibição da *PvD*₁ e FLC sozinhos e em combinação mostrando efeito aditivo contra células de *C. albicans in vitro*.....32

Figura 14 – Curva de crescimento da levedura *C. albicans* em até 24 h, na ausência e na presença das seguintes concentrações: 80 µg/mL (*PvD*₁); 0,25 µg/mL (FLC); 80 µg/mL (*PvD*₁) + 0,25 µg/mL (FLC); 0,25 µg/mL (FLC) + 80 µg/mL (*PvD*₁).....32

Figura 15 – Células de *C. tropicalis* tratadas com Sytox green após 24 h de incubação com as substâncias e visualizadas por microscopia de fluorescência. As células foram tratadas com: FLC – metade do IC₅₀; *PvD*₁ – IC₅₀ de *PvD*₁; *PvD*₁ + FLC; FLC+*PvD*₁. Células controle foram tratadas apenas com Sytox green. Barra = 20 µm.....34

Tabela 3 – Porcentagem de células de *Candida tropicalis* permeabilizadas após tratamento com *PvD*₁, FLC, *PvD*₁+FLC e FLC+*PvD*₁.....35

Figura 16 – Células de *C. albicans* tratadas com Sytox green após 24 h de incubação com as substâncias e visualizadas por microscopia de fluorescência. As células foram tratadas com: FLC – metade do IC₅₀; *PvD*₁ – IC₅₀ de *PvD*₁; *PvD*₁+FLC; FLC+*PvD*₁. As células controle foram tratadas apenas com Sytox green. Barras = 20 µm.....36

Tabela 4 – Porcentagem de células de *Candida albicans* permeabilizadas após tratamento com *PvD*₁, FLC, *PvD*₁+FLC e FLC+*PvD*₁.....37

Figura 17 – Imagens das células de *C. tropicalis* tratadas com sonda fluorescente 2', 7' diclorofluoresceínadiacetato (H₂DCFDA) para detecção de espécies reativas

de oxigênio e visualizadas por microscopia de fluorescência. As células foram tratadas com: FLC – metade do IC_{50} ; PvD_1 – IC_{50} de PvD_1 ; PvD_1+FLC ; $FLC+PvD_1$. As células controle foram tratadas apenas com sonda H_2DCFDA . Barras=20 μm38

Tabela 5 – Porcentagem de células *Candida tropicalis* fluorescentes após tratamento com PvD_1FLC , PvD_1+FLC e $FLC+PvD_1$39

Figura 18 – Imagens das células de *C. albicans* tratadas com sonda fluorescente 2', 7' diclorofluoresceínadiacetato (H_2DCFDA) para detecção de espécies reativas de oxigênio e visualizadas por microscopia de fluorescência. As células foram tratadas com: FLC – metade do IC_{50} ; PvD_1 – IC_{50} de PvD_1 ; PvD_1+FLC ; $FLC+PvD_1$. As células controle foram tratadas apenas com sonda H_2DCFDA . Barras=20 μm40

Tabela 6 – Porcentagem de células de *Candida albicans* fluorescentes após tratamento com PvD_1FLC , PvD_1+FLC e $FLC+PvD_1$41

ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

AMP – Peptídeo antimicrobiano

BSA – Albumina bovina sérica

D1 – Pico não retido na cromatografia em coluna DEAE- Sepharose

D2 – Pico retido na cromatografia em coluna DEAE- Sepharose

Da – Dalton

DAD – Detector de arranjo de diodo

DEAE – Dietilaminoetil

EDTA – Acido etilenodiaminotetracético

FITC – Isotiocianato fluoresceína

F/0-70 – Fração obtida após fracionamento com sulfato de amônio 0-70%

H1 – Pico 1 obtido em coluna de fase reversa

H2 – Pico 2 obtido em coluna de fase reversa

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance

IC50 – Concentração de proteína necessária para se obter 50% de inibição do crescimento da levedura

kDa – Quilodaltons

M – Marcador de massa molecular

nm – Nanômetro

PvD₁ – Defensina 1 de *Phaseolus vulgaris*

FLC – Fluconazol

TFA – Ácido trifluoroacético

Tris – Tris-hidroximetil-aminometano

SDS – Dodecil sulfato de sódio

VrD₁ – Defensina 1 de *Vigna radiata*

PhD₁ – Defensina 1 de *Petunia hybrida*,

PsD₁ – Defensina de *Pisum sativum*

Rs-AFP2 – Defensina 2 de *Raphanus sativus*

NaD₁ – Defensina 1 de *Nicotiana alata*

Hs-AFP1 – Defensina 1 de *Heuchera sanguinea*

Sd5 – Defensina 5 de *Saccharum officinarum*

ROS – Espécies reativas de oxigênio

Bisacrilamida – N,N'-metileno bisacrilamida

PBS – Tampão fosfato salino

RESUMO

Nosso grupo isolou e caracterizou uma defensina de sementes de *Phaseolus vulgaris* (L.), denominada PvD₁, que demonstrou ter ação antimicrobiana contra uma diversidade de leveduras e fungos filamentosos causando permeabilização de membrana, acidificação do meio e aumento na produção endógena de ROS. Também já foi demonstrado que o alvo de ligação da PvD₁ em *C. albicans* é o Glicosilceramida (GlcCer). O objetivo deste trabalho foi obter a defensina PvD₁ a partir de sementes de *Phaseolus vulgaris* e a avaliar sua atividade biológica em combinação com a droga fluconazol sobre o desenvolvimento das leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Inicialmente, proteínas foram extraídas da farinha da semente em tampão fosfato pH 5,4 por precipitação com sulfato de amônio (0-70%). A extração resultante foi dialisada, liofilizada e submetida à cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose resultando em dois diferentes picos denominados D1 e D2. O pico D1 contendo a PvD₁, foi submetido a uma cromatografia de fase reversa em coluna C2C18 em HPLC confirmando sua pureza. A PvD₁ purificada foi utilizada nos ensaios de combinação com o Fluconazol, utilizando a concentração de IC₅₀ da PvD₁ e metade do IC₅₀ de Fluconazol contra *C.tropicalis* e *C. albicans*. Foi possível observar que a PvD₁ em combinação com fluconazol não atuou de forma aditiva contra *C. tropicalis*, mas contra *C. albicans* a combinação teve uma ação aditiva levando a um aumento na permeabilização de membrana e na produção endógena de ROS. Esses resultados demonstram que os alvos de ligação para PvD₁ em *C. tropicalis* e *C. albicans* são diferentes e a ação da PvD₁ em combinação com outras substâncias está estritamente ligada ao microrganismo alvo.

PALAVRAS CHAVE: Defensina, Antifúngico, Combinação, Leveduras, Resistência

ABSTRACT

Our group isolated and characterized a seed defensin of *Phaseolus vulgaris* (L.), called *PvD*₁, that demonstrated antimicrobial action against a diversity of yeasts and filamentous fungi causing membrane permeabilization, acidification of the medium and induce the production of reactive oxygen species. It has also been shown that the binding target of *PvD*₁ in *C. albicans* is GlcCer. The objective of this work was to purify the *PvD*₁ defensin from seeds of *Phaseolus vulgaris* and to evaluate its biological activity in combination with the drug fluconazole against the yeasts *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Initially, proteins were extracted from the seed meal in phosphate buffer pH 5.4 by precipitation with ammonium sulfate (0-70%). The resulting extraction was dialyzed, lyophilized and subjected to ion exchange chromatography on a DEAE-Sepharose column resulting in two different peaks named D1 and D2. The D1 peak containing *PvD*₁ was subjected to reverse phase chromatography on a C2C18 column on HPLC confirming its purity. Purified *PvD*₁ was used with fluconazole combination assays using the IC₅₀ concentration of *PvD*₁ and half of the IC₅₀ of fluconazole against *C.tropicalis* and *C. albicans*. It was possible to observe that the *PvD*₁ in combination with fluconazole did not act additive against *C. tropicalis*, but against *C. albicans* the combination had an additive action leading to an increase in membrane permeabilization and the endogenous ROS production of this yeast. These results demonstrate that the binding targets for *PvD*₁ in *C. tropicalis* and *C. albicans* are different and the action of *PvD*₁ in combination with other substances is strictly linked to the target microorganism.

KEY WORDS: Defensins, Antifungal, Combination, Yeasts, Resistance

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Candida* sp: Um Problema em Evidência

O gênero *Candida* é constituído por aproximadamente 200 diferentes espécies de leveduras, algumas delas normalmente encontradas como parte da flora normal do corpo podendo ser isoladas de superfícies mucosas sadias da cavidade oral, vaginal, trato gastrintestinal e região retal. (Dignani *et al.* 2003; Murray, *et al.* 2006; Álvares *et al.* 2007).

As espécies do gênero *Candida* se apresentam na forma de levedura, momento no qual não são, em sua maioria invasivas. Mas ao serem expostas a condições adversas ou se estiverem em um ambiente propício ao seu desenvolvimento, produzem pseudo-hifas ou hifas septadas, tornando-se patogênicas (Álvares *et al.* 2007). Essa capacidade de transição, bem como a formação de biofilmes em *Candida* sp. são principalmente associados ao fenótipo altamente resistente às condições adversas (Chaffin *et al.* 1998; Braga *et al.* 2008; Ziccardi *et al.* 2015).

Nos últimos anos, vários autores ao redor do mundo mostraram que as doenças fúngicas têm atingido frequências superiores ao esperado. Estima-se que mais de 11 milhões de pessoas no mundo sejam acometidas por infecções fúngicas com cerca de 1,6 milhão de mortes por ano, mais que o total de óbitos decorrentes da malária e tuberculose (Cole *et al.* 2017). Dentro desses números, as espécies do gênero *Candida* tem sido as causadoras da maioria dos casos (Oladele *et al.* 2014; Dorgan *et al.* 2015; Rodriguez-Tudela *et al.* 2015).

Diversas espécies do gênero *Candida* estão envolvidas nas infecções humanas. No passado, a espécie *Candida albicans* representava a maior causa de infecções dentro do gênero, sendo que outras espécies eram descritas apenas como causadoras de infecções hospitalares ou em pacientes imunocomprometidos. Porém, essa realidade mudou nas duas últimas décadas e atualmente tem-se relado uma proporção considerável de pacientes fora dos fatores de risco infectados com espécies “não-albicans”, dentre estas a *C. tropicalis* (Colombo, *et al.* 2017).

Essa mudança na epidemiologia de *Candida* sp. se deve muito provavelmente à crescente resistência que essas leveduras têm selecionado aos antifúngicos mais comumente usados, especialmente o Fluconazol (Colombo, *et al.* 2017). Na ultima década, houve um aumento nos isolados descritos de

Candida sp resistentes ao fluconazol e, uma das prováveis causas, é o uso prolongado por pacientes imunocomprometidos com infecções fúngicas recidivas, ao uso indiscriminado desse fármaco como profilático. Uma vez que este medicamento atua como fungistático, sua exposição constante conseqüentemente levará ao desenvolvimento de resistência, fazendo com que o tratamento de infecções fúngicas subsequentes apresente resultados insatisfatórios (Loeffler & Stevens, 2003; Santos Jr. *et al.* 2005; Nett & Andes, 2016).

A susceptibilidade a drogas azólicas se apresenta de forma diferente para cada espécie do gênero *Candida*. Algumas espécies, como *C. albicans* não possuem resistência intrínseca. Entretanto alguns isolados podem apresentar sensibilidade diminuída ou até resistência adquirida após o contato. Nos últimos anos, o surgimento de cepas raras de *Candida* com resistência ao fluconazol tem sido cada vez maior (Pfaller *et al.* 2006; Sardi *et al.* 2013; Nett & Andes, 2016). São descritos inúmeros casos de cepas de leveduras do gênero *Candida* resistentes aos medicamentos antifúngicos disponíveis no mercado. Esse número cresce de forma alarmante, gerando gastos exorbitantes no tratamento de pacientes acometidos por essas infecções (Menzin *et al.* 2011; Neoh *et al.* 2014). Esses fatos trazem a luz para a necessidade de se buscar novas moléculas com atividade antifúngica, que possam atuar contra cepas resistentes ou ainda agindo em combinação com os medicamentos já existentes, sanando suas deficiências e fornecendo um tratamento de maior segurança e qualidade aos pacientes (Loeffler & Stevens, 2003; Santo Jr *et al.* 2005).

1.2. Peptídeos Antimicrobianos de Plantas

Dentre as diversas moléculas com potencial antimicrobiano existentes na natureza, estão os peptídeos antimicrobianos de plantas (AMPs). Essas moléculas fazem parte de um grupo de proteínas que participam da imunidade inata, atuando como uma das primeiras linhas de defesa mediante ao ataque de patógenos (Brogden, 2005; Stangarlin *et al.* 2010). São moléculas ricas em cisteínas (4, 6 e 8), que se ligam formando pontes dissulfeto, o que lhes confere alta estabilidade. Em geral, apresentam de 12 a 100 resíduos de aminoácidos, massa molecular em torno de 10 kDa, são anfipáticos, ou seja, contém uma porção elevada de resíduos hidrofóbicos (cerca de 30%), possuem carga líquida

positiva em pH fisiológico. Além disso, AMPs também são resistentes à ação de solventes ácidos e orgânicos (Mahlpuu *et al.* 2016). Todas essas características são de extrema importância para sua interação inicial com a membrana dos micro-organismos e sua ação antimicrobiana (Van't Hof *et al.* 2001; Teixeira *et al.* 2012).

Apesar de possuírem propriedades físicas semelhantes, AMPs diferem quanto a sua sequência de aminoácidos, estrutura secundária e terciária, o que confere a esses peptídeos uma extensa variedade de atividades biológicas (Dang *et al.* 2015). Com base na sua composição de aminoácidos e estruturas secundária e terciária, estes podem ser classificados como peptídeos em α -hélices, folhas β , cíclicos ou lineares, ou ainda peptídeos contendo as estruturas anteriores com adição de loops (Figura 1) (Giuliani *et al.* 2007; Shabir *et al.* 2018).

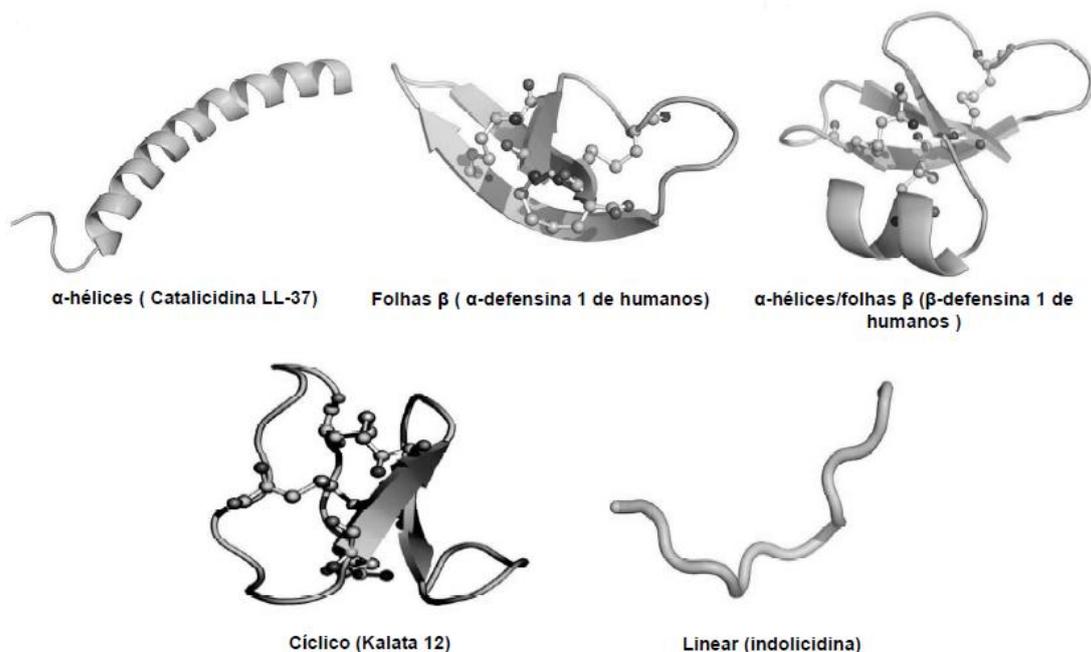


Figura 1 - Representação esquemática das principais classes estruturais de peptídeos incluindo: α -hélices, folhas- β , α -hélices com folhas- β , cíclicos e lineares. As pontes dissulfeto, nos AMPs que as possuem, são representadas pelas bolas interligadas. (Adaptada de Silva *et al.* 2011).

A atividade antimicrobiana dos AMPs ocorre através de uma interação direta com a parede ou membrana celular dos fungos fitopatogênicos e bactérias, seguido pela perturbação da integridade da membrana. Porém os eventos que se relacionam a esta interação não estão totalmente elucidados (Van't Hof *et al.* 2001; Mello *et al.* 2014). Evidências indicam que a permeabilização da membrana dos microrganismos pode ser muitas vezes um evento secundário. Em alguns casos o peptídeo atravessa a membrana sem afetar sua integridade e interage com alvos intracelulares. Este fato interfere em processos celulares como a síntese de DNA, RNA e proteínas, inibindo a atividade enzimática, afetando a síntese da parede celular ou ainda causando danos à membrana mitocondrial e aumento da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS). Pode ainda ocorrer ação em alvo específico ou desencadear uma cascata de eventos que podem levar à morte celular (Teixeira *et al.* 2012; Zhu *et al.* 2017).

Como parte do arsenal de defesa das plantas, esses peptídeos são produzidos por vários diferentes órgãos e tecidos, especialmente sementes, local onde se encontram em níveis mais elevados, se comparado a outros órgãos das plantas (Broekaert *et al.* 1997; Benko-Iseppon *et al.* 2010). Além disso, sua produção pode ser induzida nos tecidos após infecção ou injúria, sendo sintetizados de um modo rápido e flexível, com um gasto mínimo de energia e biomassa (Broekaert *et al.* 1995).

Os AMPs de plantas podem ser separados em famílias, de acordo com as características estruturais que compartilham, principalmente os resíduos conservados de cisteínas e o arranjo estrutural em folhas β e α -hélices estabilizadas por pontes de dissulfeto (Noonan *et al.* 2017). Dentre os principais peptídeos antimicrobianos de plantas estudados encontramos os peptídeos pertencentes às famílias das tioninas, heveínas, knotinas, proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs) e as defensinas (Broekaert *et al.* 1997; Tam *et al.* 2015).

1.3. Defensinas de Plantas

As defensinas das plantas incluem mais de 100 membros provenientes de uma ampla gama de plantas (Tam *et al.* 2015). Foram descritas pela primeira vez em 1990, por Mendez e colaboradores, em sementes de trigo e cevada, e classificadas como um subgrupo de tioninas (γ tioninas). Em 1995, essas

moléculas foram então reclassificadas como defensinas de plantas devido a sua conformação estrutural muito semelhante às defensinas de insetos (Espitia *et al.* 2010; De Coonick *et al.* 2013).

O nome defensina, deriva do latim “defendo”, que significa repelir, nome muito apropriado para essa classe de moléculas que desempenha um importante papel na imunidade inata de todas as espécies de plantas. São expressas constitutivamente ao longo do desenvolvimento da planta. Nas sementes, em especial, se apresentam em maior variedade e quantidade, onde tem o importante papel de defender o embrião contra possíveis predadores e patógenos. Também apresentam características de ter sua produção induzida em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, seja por ataque de patógenos, insetos, fatores ambientais ou por hormônios vegetais (Ng *et al.* 2011; Vriens *et al.* 2014). Apesar das defensinas, em sua maioria, estarem presentes em sementes e raízes, estas são produzidas por todos os tecidos das plantas, já tendo sido identificadas em tubérculos, folhas, vagens, flores e endosperma, e podem ser encontradas em todos os estágios de desenvolvimento (Moreno *et al.* 1994; Terras *et al.* 1995; Park *et al.* 2002; Lay *et al.* 2003).

As defensinas são peptídeos catiônicos com um domínio característico de oito resíduos de cisteínas formando quatro pontes dissulfeto (Shirakawa *et al.* 2014), possuem massa molecular de ~6 kDa, apresentando de 45 a 54 resíduos de aminoácidos, tem uma carga líquida positiva em pH fisiológico, e mostram clara, embora relativamente limitada, conservação de sequência (Broekaert *et al.* 1995; Carvalho & Gomes, 2011). Apresentam uma estrutura tridimensional muito conservada, composta, de modo geral, por três folhas β antiparalelas e uma α -hélice, elementos estes da estrutura secundária, conectados através de três alças e estabilizados pelas pontes dissulfeto (Fant *et al.* 1998; Almeida *et al.* 2002). Duas dessas pontes formam um “*motif*” típico, denominado “*cysteine-stabilized α -helix*” (CS α / β). Esta consiste em duas pontes dissulfeto formadas entre duas cisteínas da α -hélice e duas cisteínas do C-terminal da folha- β , característico de peptídeos com atividade antimicrobiana (Kobayashi *et al.* 1991; Zhu *et al.* 2005).

Apesar de possuir uma estrutura altamente conservada, já foram identificadas algumas defensinas de plantas com estruturas alternativas, como a defensina 1 de feijão (*Vigna radiata*), VrD₁ (Liu *et al.* 2006), que possui em sua estrutura uma hélice extra denominada hélice 3-10, a defensina isolada de flores

de *Petunia hybrida*, *PhD*₁ que apresenta em sua estrutura 5 pontes dissulfeto (Janssen *et al.* 2003) e a defensina *Sd5* (defensina 5 de *Saccharum officinarum*) que possui uma extensão C-terminal não-estruturada (de Paula *et al.* 2011). A figura 2 mostra as estruturas descritas para essas defensinas.

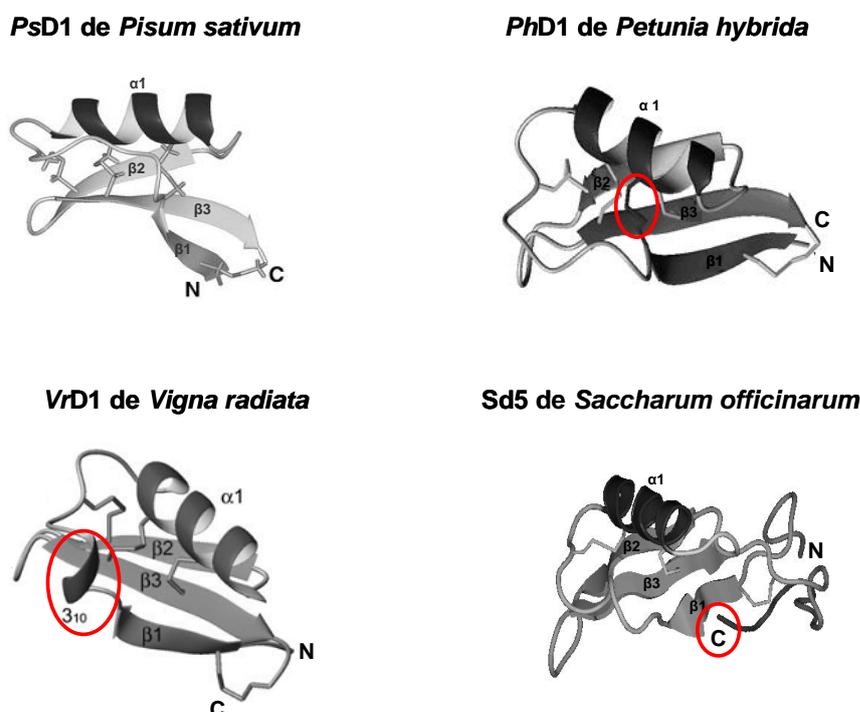


Figura 2 - Representação gráfica de estruturas terciárias elucidadas de diferentes defensinas de plantas com destaque (delimitadas por círculo) para as diferenças mais marcantes entre elas. Estrutura tradicional representada pela defensina *PsD1* de *Pisum sativum* (ervilha) (Almeida *et al.* 2002); Estrutura da defensina *PhD1* de *Petunia hybrida* com a quinta ponte dissulfeto (Janssen *et al.* 2003); Estrutura da defensina *VrD1* de *Vigna radiata* (feijão) com uma hélice 3₁₀ (Liu *et al.* 2006); Estrutura da defensina *Sd5* de *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar) com uma extensão C-terminal não-estruturada (de Paula *et al.* 2011). (N) região N-terminal; (C) região C-terminal; (α1) α-hélice; (β1) folha β 1; (β2) folha β 2; (β3) folha β 3; (3₁₀) α-hélice 3₁₀.

Com exceção de seus resíduos de cisteínas, invariáveis em suas posições, as sequências de aminoácidos das defensinas de plantas são altamente variáveis. Uma vez que todas as defensinas de plantas cujas estruturas 3-D foram determinadas, tendo uma estrutura principal semelhante, quaisquer diferenças em suas atividades biológicas e especificidades são muito provavelmente devido a

diferenças na composição de aminoácidos e de distribuição de cargas expostas em sua estrutura (Kobayashi *et al.* 1991; Zhu *et al.* 2005; Sagaram *et al.* 2011).

1.3.1. Atividades Biológicas

A primeira atividade biológica descrita para defensinas de plantas foi a habilidade de inibir a tradução proteica em mamíferos e procariontos, porém sem qualquer função endógena em plantas (Mendez *et al.* 1990; 1996). A partir daí, já foram descritas diversas atividades biológicas para as diferentes defensinas de plantas, dentre estas, estão a atividade antibacteriana, antifúngica, inibidora de proteinase e α -amilase, inibição da tripsina, tolerância de zinco e bloqueadora de canais de íons. Além de estarem envolvidas na resposta ao estresse biótico, bem como no crescimento e desenvolvimento da planta (Bloch & Richardson, 1991; Fant *et al.* 1998; Gao *et al.* 2000; Fujimura *et al.* 2004; Sitaram, 2006; Sagaram *et al.* 2011; Nawrot *et al.* 2014; Hayes *et al.* 2018). Além das atividades acima descritas, as defensinas de plantas demonstraram ter ação inibitória contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (Souza *et al.* 2013) e inibir *in vitro* a transcriptase reversa do vírus HIV-1 (Ye & Ng, 2001; 2002; Wong & Ng, 2005) além de apresentar atividade sobre células cancerígenas (Wong & Ng, 2005; Wang *et al.* 2009; Hegedüs & Marx, 2013).

Dentre as atividades biológicas demonstradas pelas defensinas de plantas, a mais estudada e melhor caracterizada é a atividade antifúngica. Vários estudos mostraram o potente efeito inibidor de crescimento que esses AMPs exercem, mesmo em baixas concentrações, tanto contra fungos fitopatogênicos, quanto patógenos humanos. Além de ser capaz de inibir o crescimento de uma ampla diversidade de espécies de fungos. (Terras *et al.* 1992; Osborn *et al.* 1995; Park *et al.* 2002; Wisniewski *et al.* 2003; Chen *et al.* 2005; Solis *et al.* 2007; Finkina *et al.* 2008; Odintsova & Egorov, 2012; Islam *et al.* 2017; Hayes *et al.* 2018).

As atividades antifúngicas das defensinas de plantas, bem como a concentração necessária para promover a inibição de crescimento, dependerão diretamente do fungo testado e da defensina em questão (Carvalho & Gomes, 2011; Thevissen *et al.* 2012; Mello *et al.* 2014). As defensinas RsAFP-2, isolada do rabanete (*Raphanus sativus*) e DmAMP₁, isolada de dahlia (*Dahlia merckii*) demonstraram ser capazes de inibir o crescimento de *C. albicans* nas concentrações de 2,5 μ M e 5 μ M, respectivamente (Thevissen *et al.* 2003; Aerts

et al. 2009). Assim como a defensina *NaD*₁, extraída das flores de *Nicotiana glauca*, que além de inibir o crescimento de *C. albicans* em baixas concentrações, também foi capaz de inibir o crescimento dos patógenos de plantas *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum* (Lay *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2013; 2018). *Ms-Def*₁ uma defensina isolada de sementes de *Medicago sativa*, inibiu fortemente o crescimento fúngico de *F. graminearum* (Spelbrink, 2004). As defensinas *PhD*₁ e *PhD*₂, isolada de flores de *Petunia hybrida*, também demonstraram forte atividade antifúngica contra *B. cinerea* e *F. oxysporum* (Lay *et al.* 2003). A defensina recombinante de ervilha *Drr*_{230a} demonstrou ser ativa contra fungos fitopatogênicos de soja e algodão dos gêneros *Fusarium*, *Colletotrichum* e *Phakopsora* (Lacerda, 2014).

Diversos estudos já foram realizados demonstrando a capacidade das defensinas em inibir o crescimento fúngico. Com base no aparente modo como o crescimento é inibido, as defensinas podem ainda ser separadas de acordo com sua capacidade de causar alterações morfológicas no fungo, sendo classificadas em dois grupos. O grupo I, ou morfogênico, o qual inibe o crescimento fúngico causando alterações morfológicas e conseqüentemente a redução do alongamento e ramificação das hifas do grupo II, ou não morfogênico, que exercem sua atividade antifúngica sem causar alterações morfológicas (Osborn *et al.* 1995; Segura *et al.* 1998; Almeida *et al.* 2002).

1.3.2. Mecanismos de Ação

Os primeiros experimentos para tentar elucidar o mecanismo de ação das defensinas de plantas foram feitos no final da década de 90. Thevissen *et al.* (1999) verificaram que ocorria permeabilização da membrana do fungo na presença desses peptídeos. Este fato sugeriu que as defensinas estariam se ligando a um sítio específico nestas membranas. A partir daí, vários autores vêm investigando mecanismo de ação das defensinas na inibição de fungos e os resultados têm demonstrado que as defensinas podem se ligar especialmente na membrana plasmática, mas também em alvos intracelulares (Carvalho e Gomes, 2011; Cools *et al.* 2017). O grande número de aminoácidos com carga positiva presente nas defensinas, parece corroborar com sua propriedade antifúngica (Bleackley *et al.* 2014).

Foi demonstrado também que os receptores para as defensinas na membrana seriam esfingolípídios de membrana. Para *Saccharomyces cerevisiae* foi identificado o esfingolípideo manosildifosfatidilceramida e para *Candida albicans* o esfingolípideo Glicosilceramida, ambos demonstraram ser alvo de ligação de defensinas (Figura 3) (Thevissen *et al.* 1999; Thevissen *et al.* 2003; Thevissen *et al.* 2004). Duas defensinas, AFP_1 de *Brassica juncea* (Oguro *et al.* 2014) e $Rs-AFP_2$ (Thevissen *et al.* 2012) que possuem 94% de homologia de sequência de aminoácidos, demonstraram a capacidade de interagir com moléculas de glicosilceramida (GlcCer) da membrana de *C. albicans* e inibir o crescimento fúngico.

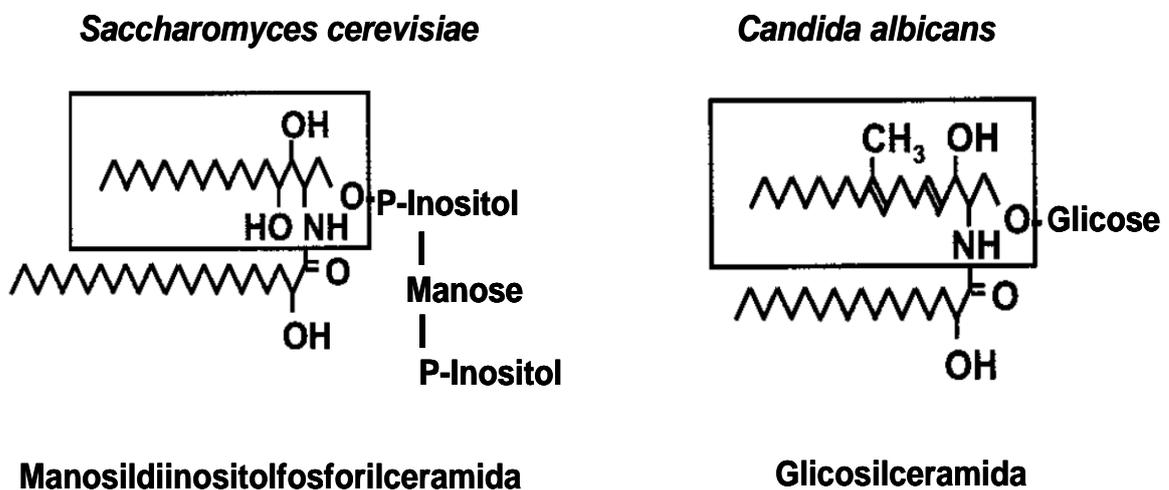


Figura 3 - Representação esquemática da estrutura dos esfingolípídios glicosilceramida e manosildifosfatidilceramida que são sítios de ligação das defensinas de plantas na membrana de fungos (Adaptado de Thevissen *et al.* 2004).

Até pouco tempo acreditava-se que a permeabilização, consequência da interação da defensina com a membrana fúngica, seria o principal evento responsável pela inibição do crescimento (Thevissen *et al.* 1999), porém, evidências mostram que algumas defensinas possuem possíveis alvos intracelulares e a permeabilização da membrana pode ser um evento secundário. A defensina de planta $HsAFP_1$, isolada de *Heuchera sanguinea* demonstrou interagir reversivelmente com o ácido fosfolípídico fosfatídico da membrana (PA) e penetrar na célula sem causar ruptura da membrana, sendo que a

permeabilização de membrana provavelmente ocorrera após a internalização de *HsAFP₁* e sua interação com um alvo intracelular (Cools *et al.* 2017).

Lobo *et al.* (2007) também investigaram um novo mecanismo de ação intracelular das defensinas, usando a defensina *Psd1* de ervilha. Como resultado viram que o mecanismo de ação da defensina de planta *Psd1*, pode envolver também alvos nucleares. Esse mecanismo também foi observado para as defensinas *NaD₁* (Van Der Weerden *et al.* 2008; 2010) e *MtDef₄* de *Medicago truncatula* (Sagaram *et al.* 2011). A defensina *VrD₁*, isolada do grão de *Vigna radiata* também demonstrou possuir ação antimicrobiana (Janssen *et al.* 2003; Chen *et al.* 2004).

Existem dois principais mecanismos de ação propostos para as defensinas antimicrobianas: (i) o modelo do tapete e (ii) o modelo dos poros. Ambos os modelos descrevem a interação das defensinas com as moléculas carregadas negativamente presentes na membrana celular de agentes patogênicos, causando um aumento de sua permeabilização, levando a um extravasamento do conteúdo celular e morte por necrose. Enquanto o modelo de tapete enfatiza a formação de poros de vários peptídeos na membrana, o modelo de poro mostra que os peptídeos formam oligômeros que, então, formam poros múltiplos na membrana celular, o modelo dos poros diz que as defensinas não danificam a membrana celular, mas interagem com os fosfolípidios, levando a um aumento da permeabilidade iônica, ao mesmo tempo em que parte desses peptídeos são transportados para o meio intracelular. Desta forma, eles aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativam a morte celular programada (Wilmes *et al.* 2011; Hegedus & Marx, 2013).

1.4. A Defensina *PvD₁*

No ano de 2008, Games e colaboradores isolaram um peptídeo a partir de sementes do feijão comum, *Phaseolus vulgaris*, cultivar Perola, e posteriormente obtendo-se sua sequência N-terminal concluíram ser um peptídeo, pertencente à família das defensinas de plantas, o qual foi denominado *PvD₁*.

Ensaio posteriores mostraram que a defensina *PvD₁* inibia o crescimento de diferentes leveduras e fungos filamentosos. Esse peptídeo causava a permeabilização da membrana em vários fungos filamentosos e leveduras na concentração de 100 µg/mL. Análises ultraestruturais de *C. albicans* e *C. tropicalis*

tratadas com essa defensina revelaram alterações em componentes celulares, mostrando desorganização do núcleo e de outras organelas, além da desorganização da membrana plasmática. *PvD₁* também inibia a acidificação do meio estimulada por glicose pelas células de leveduras e fungos filamentosos, e induzia a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em *C. albicans* e *F. oxysporum* (Mello *et al.* 2011).

Em 2014, Mello e colaboradores superexpressaram a defensina *PvD₁* em *E. coli*, para verificar se *PvD₁* recombinante (*PvD₁r*), mantinha sua função biológica comparando a atividade antimicrobiana de *PvD₁r* com a defensina natural, *PvD₁*. Após a superexpressão ter sido induzida, *PvD₁r* foi purificada e a funcionalidade biológica de *PvD₁r* foi confirmada comparando sua atividade com a atividade de *PvD₁* contra *C. albicans* do tipo selvagem, ambos os peptídeos apresentaram atividade biológica muito similar, com uma inibição de crescimento de 75,9 e 89,7%, respectivamente. Também foi demonstrado nesse estudo, que o alvo de *PvD₁* em células de *C. albicans* é o esfingolípido glicosilceramida. Utilizando uma cepa mutante de *C. albicans*, que não possuía o gene da biossíntese deste esfingolípido, ambas as defensinas não mais apresentaram atividade inibitória quando testadas contra a cepa mutante.

Posteriormente, Nascimento *et al.* (2015) mostraram que, além de inibir uma diversidade de fungos, a defensina *PvD₁* também atua contra *L. amazonensis* inibindo a proliferação das promastigotas. Além disso, *PvD₁* foi capaz de provocar a fragmentação citoplasmática, formação de múltiplos vacúolos citoplasmáticos e permeabilização da membrana nas células desse organismo. Foi demonstrado ainda, pela primeira vez, que a *PvD₁* foi localizada dentro das células de *L. amazonensis*, sugerindo a existência de um possível alvo intracelular.

Diante dos resultados já obtidos pelo nosso grupo, nós propomos um modelo de mecanismo de ação para a defensina *PvD₁* em relação a sua atividade antifúngica. A figura 4 mostra representação esquemática atualizada do mecanismo de ação das defensinas de plantas já estudadas, com a incorporação do mecanismo de ação da defensina *PvD₁*. A elucidação desses mecanismos é mais um passo dado para a utilização dessas moléculas como fármaco no controle de doenças fúngicas (Mello *et al.* 2014).

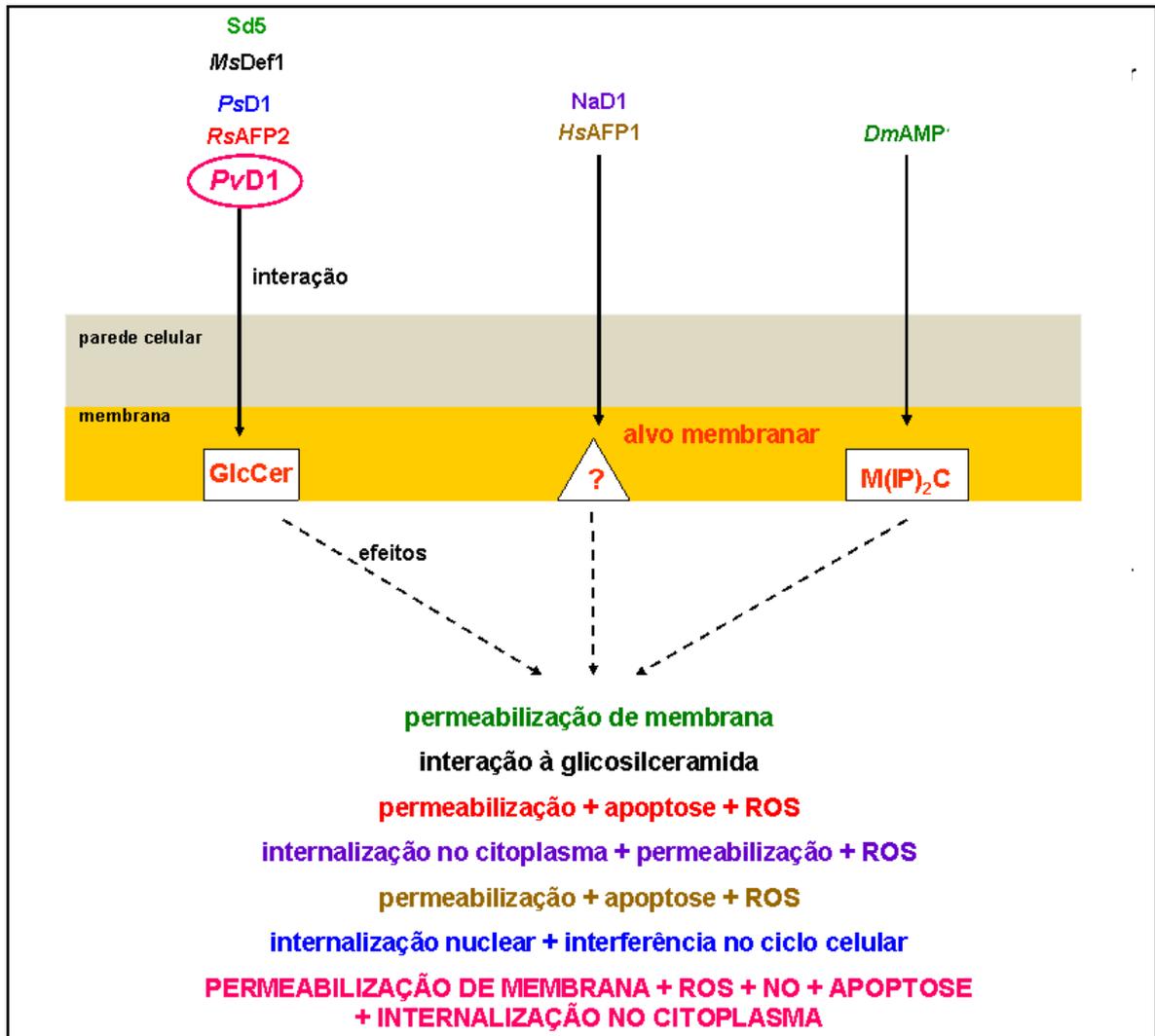


Figura 4 - Representação esquemática do modo de ação mais complexo das defensinas de plantas (*PvD*₁; *Sd5*, *MsDef1*, *PsD1*, *RsAFP2*, *NaD1* e *HsAFP1*) contra fungos com indicação de seus alvos membranares e efeitos desencadeados pela interação. As cores correlacionam as defensinas com seus efeitos (Adaptado de De Coninck *et al.* 2013, Mello *et al.* 2014).

1.5. Fluconazol

Os derivados azóis representam o grupo de medicamentos antifúngicos mais utilizados pelo mundo, são compostos totalmente sintéticos caracterizados por um anel pentagonal na estrutura molecular os quais contém átomos de carbono e hidrogênio e que, geralmente, têm ação fungistática sobre determinados fungos. O fluconazol, foi desenvolvido em 1982 e licenciado em 1990, é um fármaco antifúngico triazólico (contém três átomos de carbono e três

de hidrogênio) de amplo espectro com efetivo contra uma variedade de fungos que causam tanto micoses superficiais quanto sistêmicas em humanos. Está entre as principais drogas de escolha para o tratamento de infecções causadas por *Candida* sp. (Adams, 2003; Cha & Sobel, 2004).

O fluconazol atua como um inibidor enzimático, mais seletivo que os imidazóis, devido ao acréscimo de nitrogênio em seu anel azol. Além de aumentar a seletividade, o aumento de um átomo de nitrogênio proporciona estabilidade metabólica, prolongando o seu tempo de meia vida plasmática. Ele atua desregulando a biossíntese do ergosterol fúngico pela inibição da enzima 14- α -desmetilase (*ERG11p*) dependente do citocromo P-450, codificada pelo gene *ERG11*. Essa enzima é responsável pela desmetilação do lanosterol para formação do ergosterol, quando essa etapa é bloqueada devido à ação do fluconazol sobre a enzima, provoca a formação de esteróis tóxicos, a inibição do fungo se dá pela acumulação desses intermediários e pela ausência de ergosterol (Figura 5) (Sheehan *et al.* 1999).

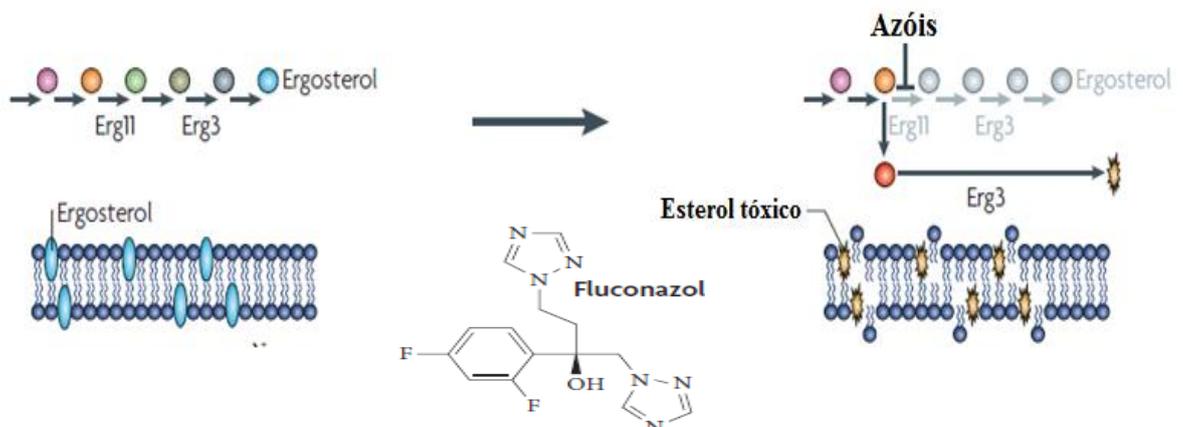


Figura 5 - Representação esquemática do modo de ação dos azóis. Os azóis, tais como o fluconazol, inibem *ERG11p*, causando o bloqueio da produção de ergosterol e levando ao acúmulo de um esteroide intermediário tóxico para as células fúngicas (adaptado de Cowen, 2008).

Entre as drogas de escolha, o fluconazol vem como o agente antifúngico preferido para o tratamento de infecções tanto tópicas quanto sistêmicas causadas por *Candida* sp. Esse fator pode ser atribuído a sua estabilidade

metabólica, alta solubilidade em água, boa tolerabilidade, baixo custo, possibilidade de administração via oral (Grant & Clissold, 1990) e capacidade de penetrar no sistema nervoso central (Eschenauer *et al.* 2013). Apesar de sua eficácia e segurança em comparação aos seus antecessores, o fluconazol tem limitações que, mesmo poucas, são extremamente importantes e vem restringindo e defasando a eficácia deste medicamento. Elas estão relacionadas a sua interação com outros medicamentos que leva a efeitos colaterais graves, sua falta de atividade contra fungos filamentosos e a crescente aparecimento de cepas resistentes (Fica, 2004).

Devido ao seu mecanismo de ação, o fluconazol afeta o metabolismo de outros compostos através da sua interferência em diferentes isoenzimas do complexo citocromo P-450 humano, alterando seus níveis plasmáticos e levando ao surgimento de diversos efeitos colaterais. Sua combinação com certos medicamentos pode causar efeitos indesejáveis graves devido ao aumento ou redução na biodisponibilidade dos mesmos (Colombo *et al.* 2002; Moreira, 2010). Mas essa é uma das menores limitações do fluconazol, seu maior problema está no surgimento cada vez maior de cepas resistentes a este medicamento (Silva *et al.* 2012).

A resistência primária de leveduras aos derivados azóis, é atribuída principalmente ao fenômeno de efluxo, no qual a perda da droga no interior celular acontece através de transporte ativo e é mediada através da glicoproteína P ou por outras proteínas como MFS (principal superfamília facilitadora) (Santos Jr *et al.* 2005; Cannon *et al.* 2009). Mutações no gene *ERG11* podem causar resistência pela diminuição da ligação do fluconazol à enzima alvo (Kakeya *et al.* 2003). Pode ocorrer também a síntese aumentada de 14- α -demetilase, devido à amplificação do gene, desta forma, a transformação de lanosterol em ergosterol não é totalmente impedida quando sob a ação do derivado azólico. (Nenoff *et al.* 1999).

A utilização profilática do fluconazol, seu uso prolongado, além da utilização inadequada são fatores que contribuem para o aumento da ocorrência de resistência de diversos fungos a este antifúngico, entre eles destacam-se as espécies do gênero *Candida*, em especial a *C. albicans* (Taylor *et al.* 2000; Spampinato & Leonardi, 2013; Cuenca-Estrella, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral a obtenção da defensina PvD₁ a partir de sementes de *Phaseolus vulgaris* e a avaliação de sua atividade biológica em combinação com a droga fluconazol sobre o desenvolvimento das leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Obter a defensina PvD₁ das sementes de *P. vulgaris*;
- 2) Verificar o efeito da defensina PvD₁ em associação, ou não, com Fluconazol sobre o crescimento das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*;
- 3) Analisar o efeito da defensina PvD₁ em combinação com fluconazol, sobre a permeabilização de membrana e indução de estresse oxidativo nas leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*;

3. MATERIAIS

3.1. Sementes

Sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Pérola foram fornecidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro - PESAGRO, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

3.2. Microrganismos

As espécies de leveduras *Candida albicans* (CE022) e *Candida tropicalis* (CE017) foram cultivadas em ágar Sabouraud (1% de peptona, 2% de glicose e 1,7% de agar-agar) (Merck) e conservadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

4. MÉTODOS

4.1. Extração e Purificação da Defensina PvD₁ de Sementes de *Phaseolus vulgaris*.

4.1.1. Extração Proteica das Sementes

As sementes de feijão comum foram descascadas e trituradas com um processador de alimentos até a formação de uma farinha bem fina. A farinha obtida foi extraída em tampão fosfato (Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 15 mM, KCl 100 mM, EDTA 1,5%) (Sigma) pH 5,4 na proporção de 1:5 (farinha:tampão de extração) sob agitação constante por 2 h a 4 °C, segundo a metodologia desenvolvida por Games *et al.* (2008) (Figura 6). Após homogeneização, o extrato bruto foi submetido à centrifugação a 15.000 x *g* por 20 min a 4 °C e o sobrenadante resultante foi submetido à precipitação com sulfato de amônio a 70% de saturação e deixado a 4 °C por 16 h. O precipitado resultante, obtido após nova centrifugação a 15.000 x *g* por 20 min a 4 °C, foi ressuspenso em 10 mL de água destilada e aquecido a 80 °C por 15 min e em seguida centrifugado a 10.000 x *g* por 8 min a 4 °C. O precipitado resultante desta última centrifugação foi descartado e o sobrenadante dialisado durante três dias em água destilada e em seguida liofilizado para posterior purificação dos peptídeos. Esta amostra, chamada ao final do processo de fração 0-70 (F/0-70), foi liofilizada (Liofilizador

K105, Liotop) e armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e usada posteriormente para a purificação dos peptídeos.

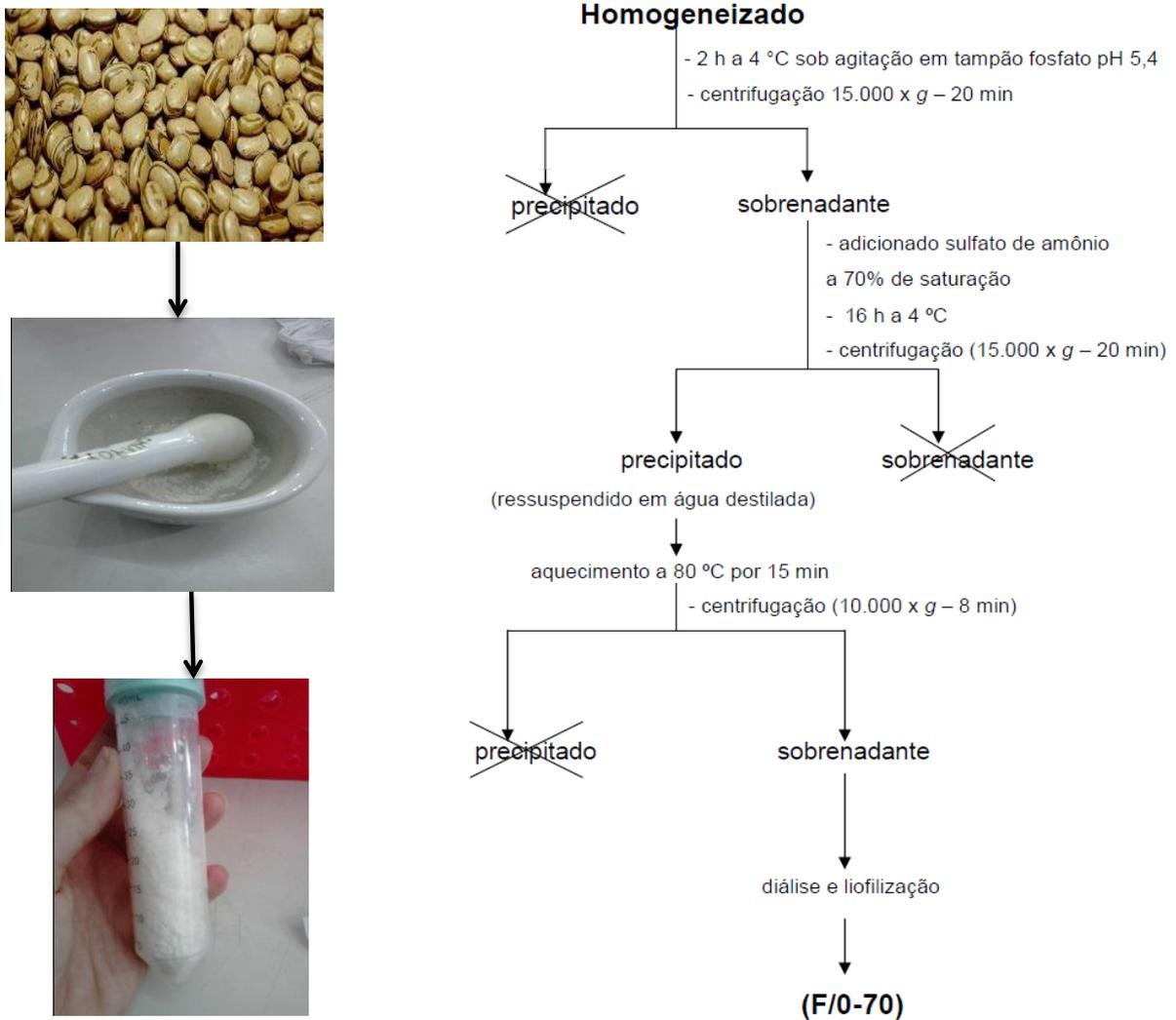


Figura 6 – Esquema de fracionamento com sulfato de amônio do homogeneizado obtido a partir da extração da farinha de sementes de feijão comum (Games *et al.* 2008).

4.1.2. Cromatografia de Troca Iônica em coluna de DEAE-Sepharose

Para a purificação da *PvD*₁, inicialmente foi usada uma coluna de troca iônica, DEAE-Sepharose, com 100 mL de resina. Esta foi montada sob a ação da gravidade e depois da resina estar devidamente empacotada, foi lavada com 350 mL de água. Em seguida lavada com aproximadamente 250 mL de hidróxido de sódio 0,1 M, novamente foi lavada com 350 mL água e depois 250 mL de ácido clorídrico 0,1 M. Posteriormente com a resina devidamente ativada foi passado o tampão de equilíbrio, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, deixando a coluna preparada para o uso. A amostra aplicada na coluna foi preparada da seguinte forma: 50 mg da F/0-70 foram pesados e dissolvidos em 5 mL de tampão de equilíbrio e depois centrifugado a 16.000 x *g* por 3 min à temperatura ambiente e o sobrenadante aplicado sobre a resina. A amostra foi eluída primeiramente no tampão de equilíbrio e em seguida em um tampão Tris-HCl adicionado de NaCl na concentração de 1 M. Foram coletados frações de 3 mL em 50 tubos em um fluxo de 60 mL.h⁻¹. As absorbâncias das frações foram lidas em um espectrofotômetro a 280 nm. Após a cromatografia, o pico D1 (não retido), foi concentrado por liofilização. Em um trabalho anterior, vimos que nesse pico está presente a defensina *PvD*₁ de *P. vulgaris* (Games *et al.* 2008).

4.1.3. Cromatografia de Fase Reversa em Coluna C2/C18

Uma coluna de fase reversa C2/C18 (μ RPC C2/C18, GE-Healthcare) acoplada a uma coluna guarda C8 (Pelliguard, 20 x 4,6 mm, Sigma) equilibrada com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma) foi empregada sequencialmente no processo de isolamento da defensina *PvD*₁. O pico D₁ não retido, oriundo da cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose, foi solubilizado em TFA 0,1% e 500 μ L desta mistura foram injetados na coluna de fase reversa. A cromatografia foi desenvolvida utilizando-se um fluxo de 0,5 mL. min⁻¹, a temperatura de 32 °C em sistema de HPLC (Prominence, Shimadzu). Para a eluição das proteínas da coluna foi utilizado um gradiente de acetonitrila (ACN) (Merck S.A.) de 0 a 80%. Inicialmente (10 primeiros minutos) a coluna foi lavada com TFA 0,1% em água ultrapura (solvente A), e em seguida um gradiente foi formado através da mistura do solvente A e 80% de acetonitrila em TFA 0,1 % (solvente B) por 48 min. Após esse período a coluna foi lavada com 100% do solvente B totalizando 60 min. A eluição da coluna foi acompanhada por um

detector de arranjo de diodo (DAD), sendo as absorvâncias lidas a 220 nm. Após ser coletado, o pico de interesse foi concentrado por liofilização (Games *et al.* 2008).

4.2. Quantificação de Proteínas

As determinações quantitativas de proteínas foram feitas pelo método do ácido bicinconínico, segundo Smith *et al.* (1985), sendo a ovalbumina (Sigma) utilizada como padrão.

4.3. Eletroforese em Gel de Tricina na Presença de SDS

A eletroforese em gel de tricina foi feita segundo metodologia de Schägger & Von Jagow (1987). Foram usadas placas de vidro de 7 x 10 cm e 8 x 10 cm e espaçadores de 0,5 mm. O gel de separação foi preparado numa concentração de 16,4% de acrilamida/bis-acrilamida e o gel de concentração numa concentração de 3,9%.

O pico D1 e as frações H1 e H2 obtidas por cromatografia foram concentradas por liofilização e, em seguida, pesadas e ressuspensas em tampão de amostra (Tris 0,125 M, SDS 2,5%, azul de bromofenol 0,25%, β -mercaptoetanol 5% e sacarose 15%). Estas foram aquecidas por 5 min a 100 °C e centrifugadas a 16.000 x *g* por 2 min. Após este tratamento 20 μ L das amostras foram aplicadas no gel de concentração. Os géis foram montados no Mini Protean Tetra System (Biorad) e a corrida foi feita a uma voltagem constante de 20 V por um período de aproximadamente 16 h.

4.4. Coloração e Descoloração do Gel

Após o término da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas e colocado na solução corante (Comassie Blue R 0,05%, ácido acético 70% e metanol 40%) por 1 h e após esse período, o gel foi transferido para uma solução descorante (metanol 40% e ácido acético 7%) e mantido até a visualização das bandas de proteína. Imagens dos géis corados foram capturadas pelo fotodocumentador LAS500 (GeHealthCare).

4.5. Curva de Crescimento das Leveduras *C. tropicalis* e *C. albicans*

Inicialmente, células estoques das leveduras foram repicadas para uma nova placa de Petri contendo ágar Sabouraud e crescidas durante 24 h a 30 ° C. Após o período de crescimento, as colônias foram suspensas em caldo Sabouraud e as células foram contadas em câmara Neubauer (Optik Labor) na presença de um microscópio óptico (Axioplan, Zeiss). Após quantificação, as células de *C. albicans* e *C. tropicalis* (1×10^4 células/mL) foram incubadas em 100 µL de caldo Sabouraud e o crescimento foi monitorizado a cada hora durante 36 h por leitura óptica a 620 nm . Os dados de leitura foram tabulados em gráfico para a determinação do tempo de fase LOG de cada levedura.

4.6. Determinação da Concentração de Defensina PvD₁ e Fluconazol para Obtenção de 50 % de Inibição do Crescimento (IC₅₀) sobre as Leveduras

O ensaio para a determinação da concentração de PvD₁ e fluconazol para se ter 50 % de inibição do crescimento sobre as leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis* (IC₅₀) foi realizado conforme descrito no item 4.5, com as seguintes modificações: a leveduras *C. tropicalis* foi incubada em caldo Sabouraud contendo as concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL de PvD₁, conforme descrito por Games *et al.* (2008). A levedura *C. albicans* foi incubada em caldo Saboraud contendo as concentrações de 25, 50, 80, 100 e 150 µg/mL de PvD₁. As células controle foram cultivadas na ausência de PvD₁. O mesmo procedimento foi realizado com fluconazol, com as concentrações de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, e 0.7 µg/mL . Este procedimento de determinação do IC₅₀ foi usado apenas para *C. albicans*. O IC₅₀ utilizado para *C. tropicalis* foi o determinado e descrito por Taveira *et al.* (2014) no valor de concentração de 1 µg/mL. As densidades ópticas foram representadas graficamente após 24 h de ensaio em função do tempo e a partir destes gráficos foram calculadas as porcentagens de inibição para todas as concentrações testadas (curvas de dose-resposta). A IC₅₀, para o tempo de 24 h de incubação com a defensina PvD₁ e fluconazol, foi determinada a partir dos dados das curvas de dose-resposta (usando os parâmetros da percentagem de inibição de crescimento em função da concentração de proteína) (Taveira *et al.* 2014).

4.7. Análise da Atividade Antimicrobiana da Defensina PvD₁ em Combinação com Fluconazol

Para verificar se existe atividade combinatória, foram usados em conjunto o antifúngico fluconazol e a defensina PvD₁. Inicialmente, as células de leveduras (1×10^4 células/mL) foram incubadas em 100 μ L de caldo Sabouraud contendo uma concentração de metade do IC₅₀ do fluconazol e a concentração do IC₅₀ de PvD₁. Os experimentos de controle foram: 1) cultivadas apenas na presença de meio de cultura; 2) cultivadas na presença das substâncias individuais, isto é, na presença somente de PvD₁ ou na presença somente de fluconazol. A atividade aditiva foi deduzida na comparação das densidades ópticas de cada controle e combinação de drogas (fluconazol +PvD₁). O ensaio foi realizado em placas de cultura de células (96 poços), incubadas a 30 °C por um período de 24 h (Taveira *et al.* 2014).

Para a observação da inibição do crescimento fúngico, foi determinada a densidade óptica calculada a partir de leitura em um leitor de microplacas, a 620 nm no tempo final de 24h. Todo o ensaio foi feito em triplicata e sob condições de assepsia em capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert *et al.* (1990).

4.8. Efeitos da Defensina PvD₁ em Combinação com Fluconazol sobre a Permeabilização de Membrana das Leveduras

Após ensaio de inibição do crescimento, a permeabilização da membrana das células de leveduras, crescidas na ausência e na presença da PvD₁ e do fluconazol separados ou em combinação, foi avaliada através da utilização do corante fluorescente Sytox Green, segundo metodologia descrita por Thevissen *et al.* (1999) com algumas modificações. Sytox Green é um corante que possui alta afinidade para ácidos nucleicos e penetra em células apenas quando sua membrana está comprometida. Ao final do ensaio de inibição do crescimento, uma alíquota das células de leveduras crescidas na ausência e presença das substâncias separadas e em combinação, foi incubada sob constante agitação e ao abrigo da luz por 2 h, com o corante fluorescente Sytox Green a uma concentração final de 0,2 μ M, de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. Após este período, estas células foram transferidas para lâminas, cobertas com lamínulas e observadas por Microscopia de Contraste de

Interferência Diferencial (DIC) e por microscopia de fluorescência utilizando a câmera AxioCam MRc5 e o programa AxioVision Release 4.8.2. Foi utilizado um conjunto de filtros fluorescentes para detecção da fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450 - 490 nm e emissão de 500 nm).

4.9. Ensaio de Determinação da Indução de Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular (ROS)

Para avaliar se o mecanismo de ação da *PvD*₁ em combinação com fluconazol envolve a indução do estresse oxidativo, a sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) foi utilizada para medir o nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, respectivamente, segundo metodologia descrita por Mello *et al.* 2011. Após ensaio de inibição do crescimento as células de leveduras, crescidas na ausência e na presença das substâncias separadas e em combinação, foram incubadas com a sonda específica para ROS que é capaz de se difundir através da membrana plasmática das células e serem hidrolisadas por esterases intracelulares formando uma molécula não fluorescente. Esta molécula então irá reagir com o ROS intracelular formando uma molécula fluorescente. Após 2 h de incubação, ao abrigo da luz e com constante agitação, as células foram analisadas em microscópio de fluorescência (Axiovision 4, Zeiss) equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção da fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450 - 490 nm e emissão de 500 nm).

5. RESULTADOS

5.1. Purificação da Defensina PvD₁ de Sementes de *P. vulgaris*

A cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Sepharose da F/0-70 obtida por extração proteica das sementes de *P. vulgaris*, apresentou dois diferentes picos denominados D1, que foi eluído em tampão de equilíbrio da coluna, e D2 que foi eluído em tampão de equilíbrio da coluna acrescido de NaCl 1 M (Figura 7). No pico D1, encontra-se presente a defensina PvD₁ previamente isolada de sementes de feijão comum como descrita por Games *et al.* (2008). Este pico foi então dialisado, liofilizado e utilizado para eletroforese.

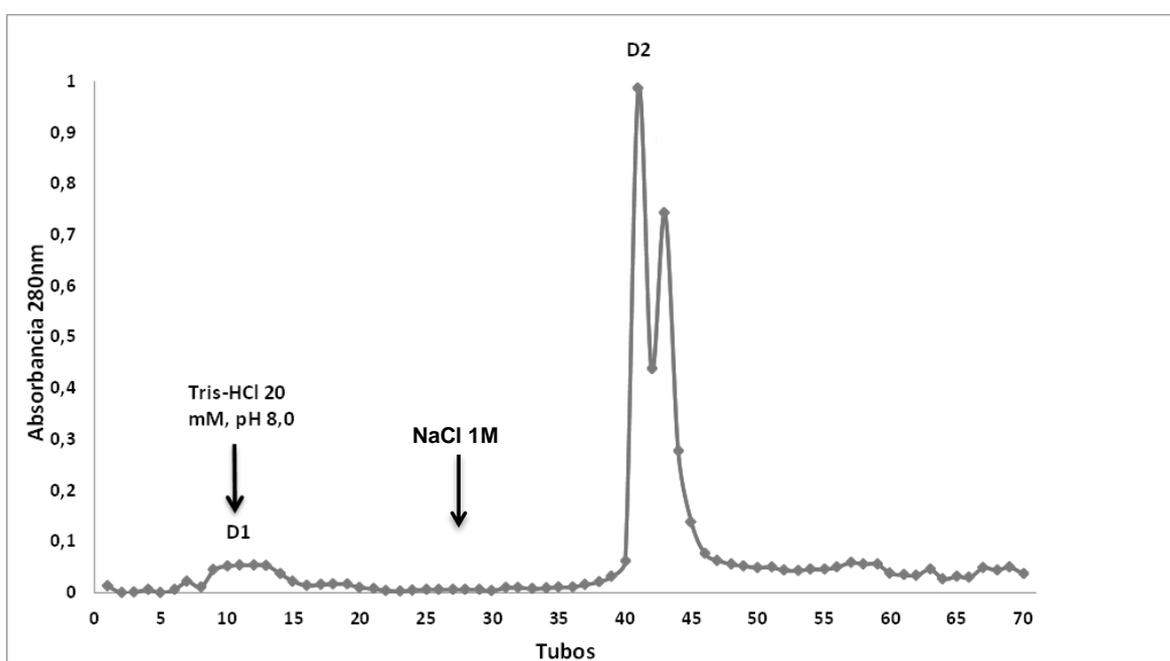


Figura 7 – Cromatograma obtido após cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose da fração F/0-70. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0. O pico D1 foi eluído com tampão de equilíbrio da coluna (Tris-HCl 20 mM) e o pico D2 foi eluído com tampão Tris-HCl 20 mM + NaCl 1 M. Foram coletadas frações de 3 mL por tubo, num total de 70 tubos, em um fluxo de 60 mL.h⁻¹.

O pico D1 obtido na cromatografia de DEAE-Sepharose, foi submetido à uma cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 em sistema de HPLC. Como resultado, observamos a presença de um pico não retido (NR) e depois, de

dois picos determinados H1, no tempo de retenção de 25 min, e H2 no tempo de retenção de 33 min. No pico H1, encontra-se presente a defensina PvD_1 previamente isolada de sementes de feijão *P. vulgaris* como descrita por Games *et al.* (2008). Este pico H_1 (Figura 8) foi então dialisado, liofilizado e utilizado para os ensaios de inibição de crescimento das leveduras e ensaio de efeito aditivo com fluconazol.

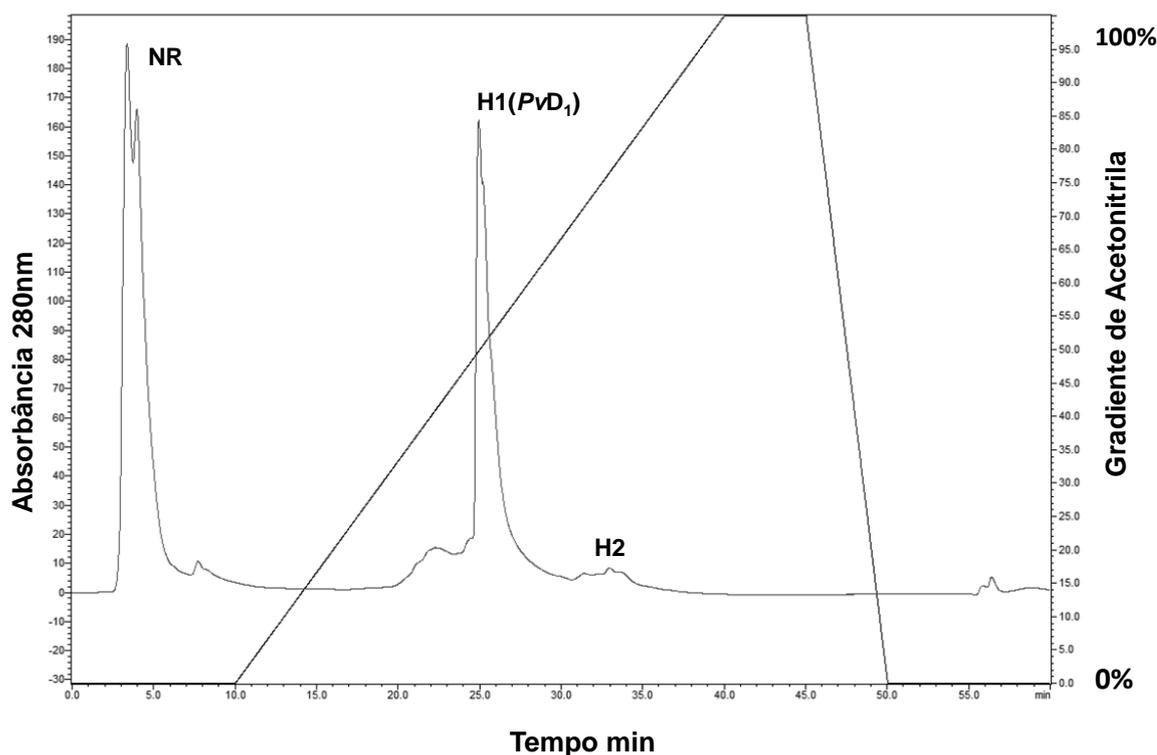


Figura 8 – Cromatograma obtido após cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 em HPLC do pico D1 obtido após cromatografia em DEAE-Sepharose. A coluna foi equilibrada com uma solução de TFA 0,1% e a amostra foi eluída em um gradiente de acetonitrila 80%-TFA 0,1% de 0 a 100%, a um fluxo de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O padrão de eluição dos peptídeos foi monitorado a 220 nm.

5.2. Eletroforese em Gel de Tricina na Presença de SDS

O perfil proteico dos picos obtidos em ambas as cromatografias descritas anteriormente foram analisados por eletroforese em gel de tricina, como pode ser observado na Figura 9. No pico D1, representado na raia 2, observamos a presença de duas bandas proteicas: uma menor com aproximadamente 6 kDa e outra com aproximadamente 17 kDa. Na raia 3, onde temos o pico H2, vimos a presença de uma banda proteica acima de 17 kDa e na raia 4, onde está o pico

H1, podemos observar a presença de apenas um único peptídeo de aproximadamente 6 kDa, que corresponde à defensina PvD₁ já previamente isolada e caracterizada por Games *et al.* 2008.

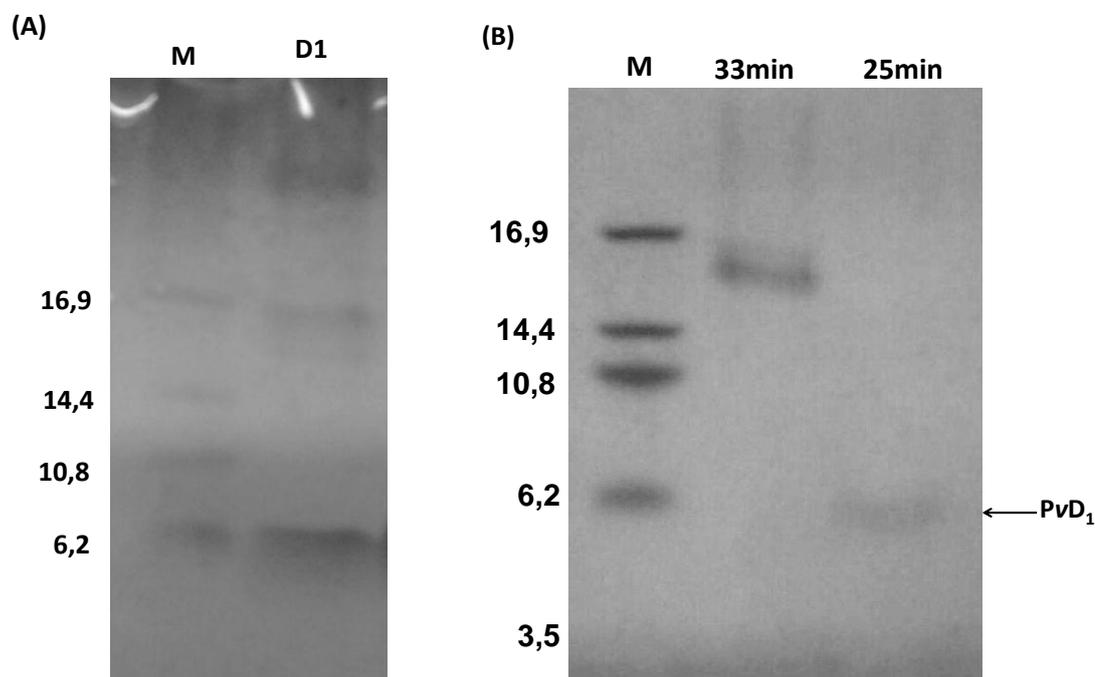


Figura 9 – Visualização eletroforética em gel de tricina na presença de SDS (A) pico D1 obtido após cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose e (B) picos H1 e H2 obtidos por cromatografia em coluna de fase reversa C2/C18. Todas as amostras foram tratadas com β -mercaptoetanol. M - marcador de massa molecular (kDa); D1 – pico não retido obtido em DEAE-Sepharose; H2 – pico obtido após cromatografia em coluna C2/C18 em HPLC; H1 – pico obtido após cromatografia em coluna C2/C18 em HPLC.

5.3. Curva de Crescimento das Leveduras *Candida tropicalis* e *Candida albicans*

Foi feita uma curva de crescimento padrão para ambas as leveduras, a fim de identificar o momento em que as células estariam iniciando a fase LOG, que caracteriza-se por intenso metabolismo celular. A figura 10 mostra a curva de crescimento para *C. tropicalis* e *C. albicans*, respectivamente. Com base nos dados da curva, foi determinado o tempo de 14 h para ambas.

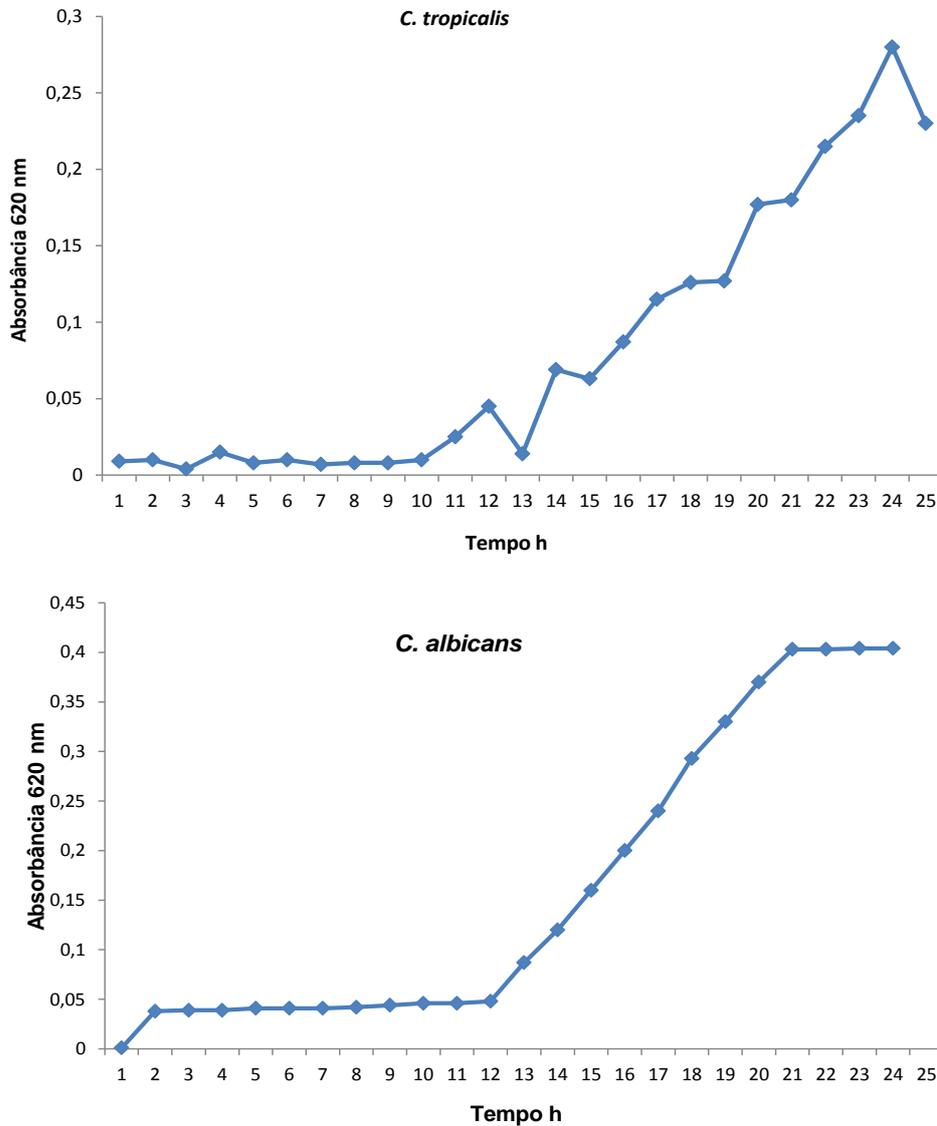


Figura 10 – Curva padrão de crescimento para determinação da fase LOG das células de *C. tropicalis* e *C. albicans*. O crescimento foi monitorado a cada h durante um período de 36 h através de leitura óptica a 620 nm.

5.4. Determinação da Concentração de Defensina PvD₁ para obtenção 50 % de Inibição do Crescimento das Leveduras (IC₅₀)

Foram realizados ensaios de inibição de crescimento com *C. albicans* e *C. tropicalis* utilizando diferentes concentrações de PvD₁ para determinar seu IC₅₀. A

figura 11 mostra o gráfico de inibição de crescimento com PvD_1 para as células de (A) *C. tropicalis* e (B) *C. albicans*.

Foram utilizadas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ para *C. tropicalis*, a porcentagem de inibição para cada concentração está indicada no gráfico. Para *C. albicans* foram utilizadas inicialmente as concentrações de 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{g/mL}$, a partir daí realizou-se um cálculo de porcentagem para encontrar uma concentração que teoricamente causaria 50% de inibição. Foi realizado então, o ensaio com as concentrações de 25, 50, 80, 100 e 150 $\mu\text{g/mL}$, a porcentagem de inibição para cada concentração está indicada no gráfico.

De acordo com os dados do gráfico, a concentração calculada de PvD_1 necessária para inibir 50% do crescimento de *C. tropicalis* é 47,9 $\mu\text{g/mL}$ e para *C. albicans* é 78,2 $\mu\text{g/mL}$. Para os ensaios de combinação, foram utilizadas as concentrações aproximadas de 50 $\mu\text{g/mL}$ de PvD_1 para *C. tropicalis* e de 80 $\mu\text{g/mL}$ para *C. albicans*.

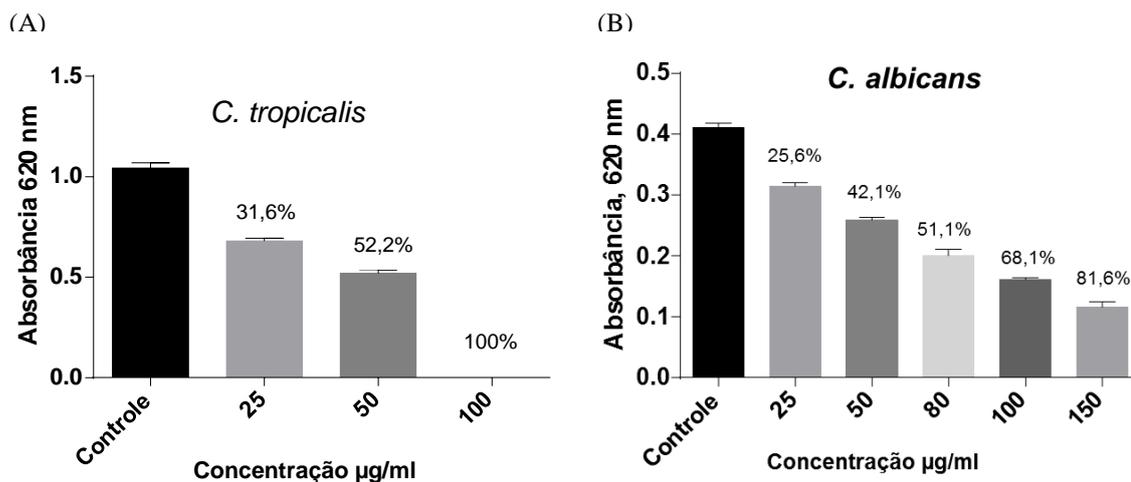


Figura 11 - Curva de crescimento da levedura *C. tropicalis* e *C. albicans* em até 24 h na presença e na ausência da Defensina PvD1 (A) para *C. tropicalis*, foram usadas as concentrações de: 25 µg/mL; 50 µg/mL; 100 µg/mL. (B) para *C. albicans*, foram usadas as concentrações de: 25 µg/mL; 50 µg/mL; 80 µg/mL ;100 µg/mL; 150 µg/mL. A porcentagem de inibição para cada concentração esta indicada no gráfico. Todos os experimentos foram feitos em triplicata (coeficientes de variação foram inferiores a 20%).

5.5. Determinação da Concentração de Fluconazol para obtenção 50 % de Inibição do Crescimento das Leveduras

Foram realizados ensaios de inibição de crescimento da levedura *C. albicans* utilizando 0,1µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,3 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,5 µg/mL; 0,6 µg/mL e 0,7 µg/mL para determinar seu IC₅₀. Para *C. tropicalis* foi usado o valor de IC₅₀ determinado por Taveira *et al.* (2016) que corresponde a 1 µg/mL.

A figura 12 mostra o gráfico de inibição de crescimento com diferentes concentrações de fluconazol e a porcentagem de inibição, está indicada no gráfico. A concentração calculada de fluconazol necessária para causar aproximadamente 50% de inibição foi de 0,47 µg/mL. Para os ensaios de combinação foi considerada a concentração aproximada de 0,5 µg/mL e foi utilizada a concentração equivalente à metade da IC₅₀ aproximado do fluconazol.

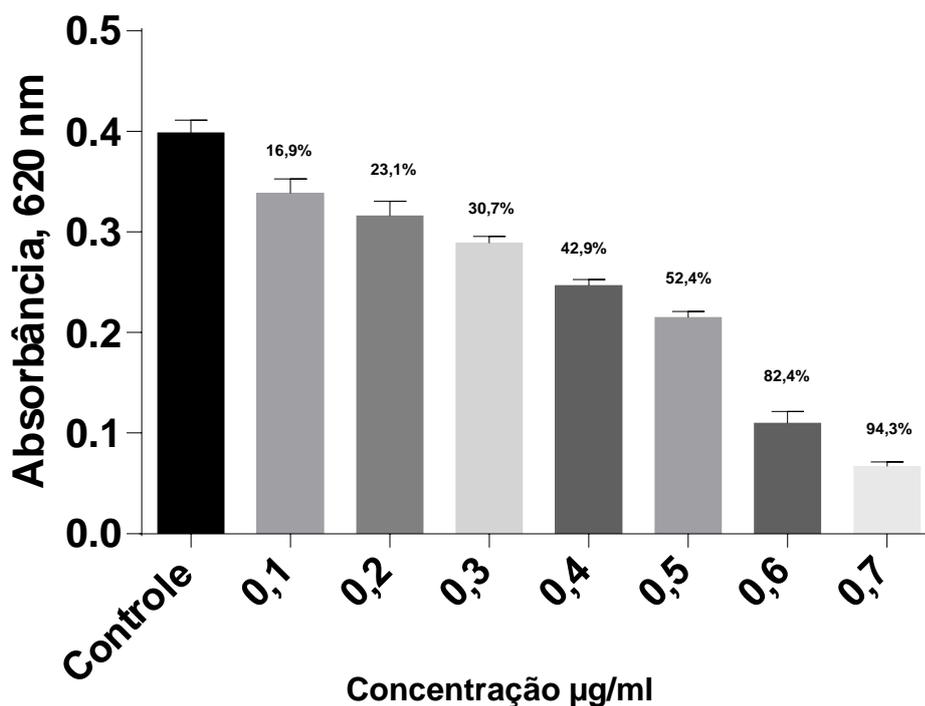


Figura 12 - Curva de crescimento das células da levedura *C. albicans* em até 24 h na ausência e na presença de fluconazol nas seguintes concentrações: 0,1µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,3 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,5 µg/mL; 0,6 µg/mL; 0,7 µg/mL. A partir destes dados de inibição do crescimento em função da concentração usada, foi determinada a IC₅₀ para a levedura. Todos os experimentos foram feitos em triplicata (coeficientes de variação foram inferiores a 20%).

5.6. Análise da Inibição do Crescimento das Leveduras pela Defensina PvD₁ em Combinação com Fluconazol.

Tendo em vista o potencial da defensina PvD₁ na inibição de crescimento de leveduras, a mesma foi utilizada em combinação com fluconazol para determinar se haveria ação aditiva e potencialização do seu efeito contra a levedura *C. tropicalis*. Foi utilizada a concentração da IC₅₀ da PvD₁ e metade do IC₅₀ do fluconazol, os testes foram realizados de modo que a PvD₁ foi adicionada ao meio no início do ensaio (tempo 0 h) e o fluconazol adicionado 14 h após crescimento (fase LOG). O teste inverso, iniciando o ensaio adicionando o fluconazol e 14 h após crescimento adicionado a PvD₁, também foi feito.

Para células de *C. tropicalis* não houve aumento na atividade inibitória da combinação de PvD₁ + FLC em relação às substâncias quando ensaiadas

separadamente. Este resultado sugere um efeito antagônico dessas substâncias (tabela 1). A figura 13 mostra que houve maior inibição de crescimento nas células tratadas somente com a *PvD*₁, em comparação com as células tratadas com as combinações *PvD*₁+FLC e FLC+*PvD*₁. Também não houve diferença significativa entre a ordem de uso da *PvD*₁ primeiro e/ou o FLC.

Tabela 1. Porcentagem do efeito de inibição da *PvD*₁ e FLC sozinhos e em combinação mostrando o antagonismo em células de *C. tropicalis in vitro*.

| Levedura | Amostras | Concentração µg/mL | Inibição (%) | Efeito da Combinação <i>PvD</i> ₁ +FLC (%) | Efeito da Combinação FLC+ <i>PvD</i> ₁ (%) |
|----------------------|-------------------------|-----------------------|--------------|---|---|
| <i>C. tropicalis</i> | <i>PvD</i> ₁ | 50 | 45 | 24,3 | 37,8 |
| | FLC | 0,5 | 26 | | |

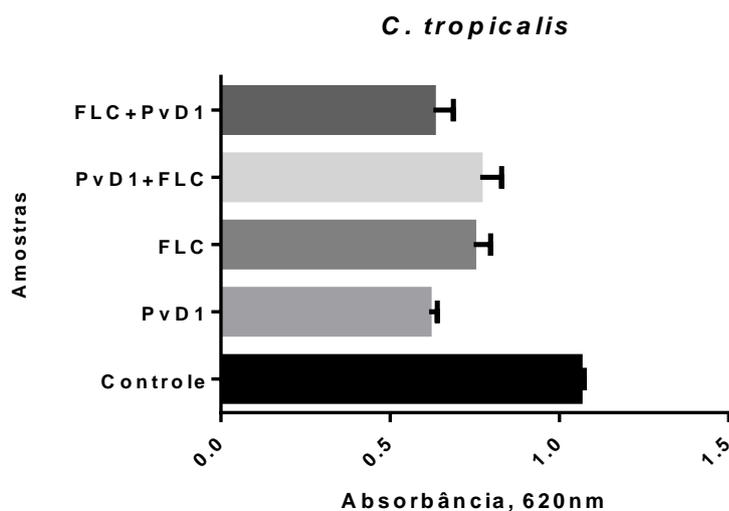


Figura 13 - Curva de crescimento da levedura *C. tropicalis*, na ausência e na presença das seguintes concentrações: 50 µg/mL(*PvD*₁); 0,5 µg/mL (FLC); 50 µg/mL (*PvD*₁) + 0,5 µg/mL(FLC); 0,5 µg/mL (FLC) + 50 µg/mL (*PvD*₁). Todos os experimentos foram feitos em triplicata (coeficientes de variação foram inferiores a 20%).

Diante dos resultados encontrados para *C. tropicalis*, os mesmos ensaios foram feitos com células de *C. albicans* para verificar se o antagonismo estava relacionado à combinação das substâncias ou ao microrganismo que estava sendo utilizado.

Para as células de *C. albicans*, a combinação de PvD_1 e FLC demonstrou um aumento da atividade inibitória sugerindo ação aditiva (tabela 2). A combinação de PvD_1 e FLC inibiu o crescimento de *C. albicans*, se comparado quando as substâncias foram usadas separadamente. Podemos observar ainda que a taxa de inibição da combinação foi maior que o somatório das taxas de inibição da PvD_1 e FLC individualmente. Não houve diferença nos resultados entre a ordem de colocar no ensaio a PvD_1 primeiro ou o FLC. Esses dados também estão demonstrados no gráfico de inibição do crescimento (figura 14). A combinação de PvD_1 e FLC foi eficaz contra as células de *C. albicans*, sugerindo que o antagonismo pode estar relacionado às diferenças que podem existir na composição da membrana dessas leveduras e não à interação entre essas substâncias.

Tabela 2. Porcentagem de inibição da *PvD₁* e FLC sozinhos e em combinação mostrando efeito aditivo contra células de *C. albicans in vitro*.

| Levedura | Amostras | Concentração µg/mL | Inibição (%) | Efeito da Combinação <i>PvD₁</i> +FLC *(%) | Efeito da Combinação FLC+ <i>PvD₁</i> *(%) |
|--------------------|------------------------|-----------------------|--------------|---|--|
| <i>C. albicans</i> | <i>PvD₁</i> | 80 | 50,6 | 79,4 | 81,3 |
| | FLC | 0,25 | 25,6 | | |

* Indica significância pelo teste T (P <0,05)

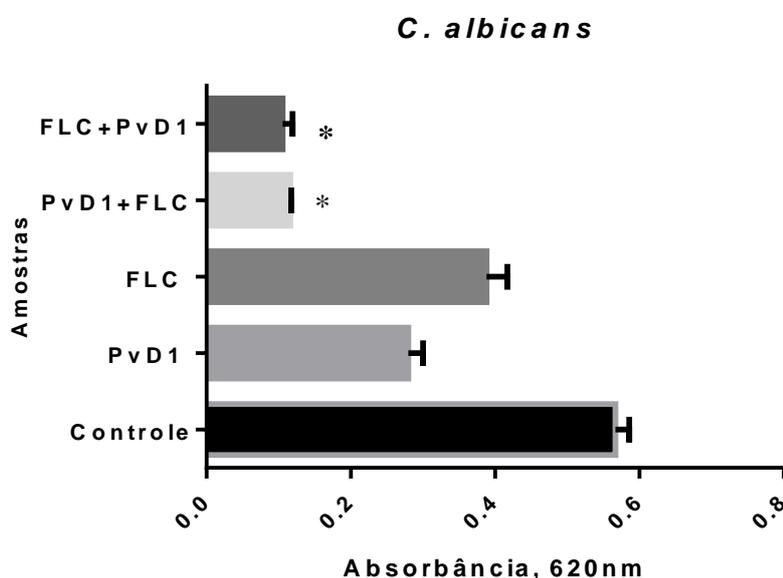


Figura 14 - Curva de crescimento da levedura *C. albicans* em até 24 h, na ausência e na presença das seguintes concentrações: 80 µg/mL (*PvD₁*); 0,25 µg/mL (FLC); 80 µg/mL (*PvD₁*) + 0,25 µg/mL (FLC); 0,25 µg/mL (FLC) + 80 µg/mL (*PvD₁*). Todos os experimentos foram feitos em triplicata (coeficientes de variação foram inferiores a 20%).

(*) Indica a significância pelo teste T (P <0,05).

5.7. Efeitos da Defensina *PvD₁* Sobre a Permeabilização de Membrana das Leveduras

Após ensaio de inibição, apesar de não ter sido observada ação aditiva entre a defensina *PvD₁* e o fluconazol sobre o crescimento da levedura *C. tropicalis*, as células foram usadas para a análise da permeabilização da

membrana através da utilização de corante Sytox green após 24 h de incubação. Houve uma significativa permeabilização de membrana nas células incubadas com fluconazol e nas células incubadas com a combinação em que o fluconazol foi adicionado inicialmente (Figura 15). Podemos sugerir desta forma, que essa permeabilização é causada pela ação do fluconazol durante as primeiras 14 h. A porcentagem de células permeabilizadas pode ser observada na tabela 3.

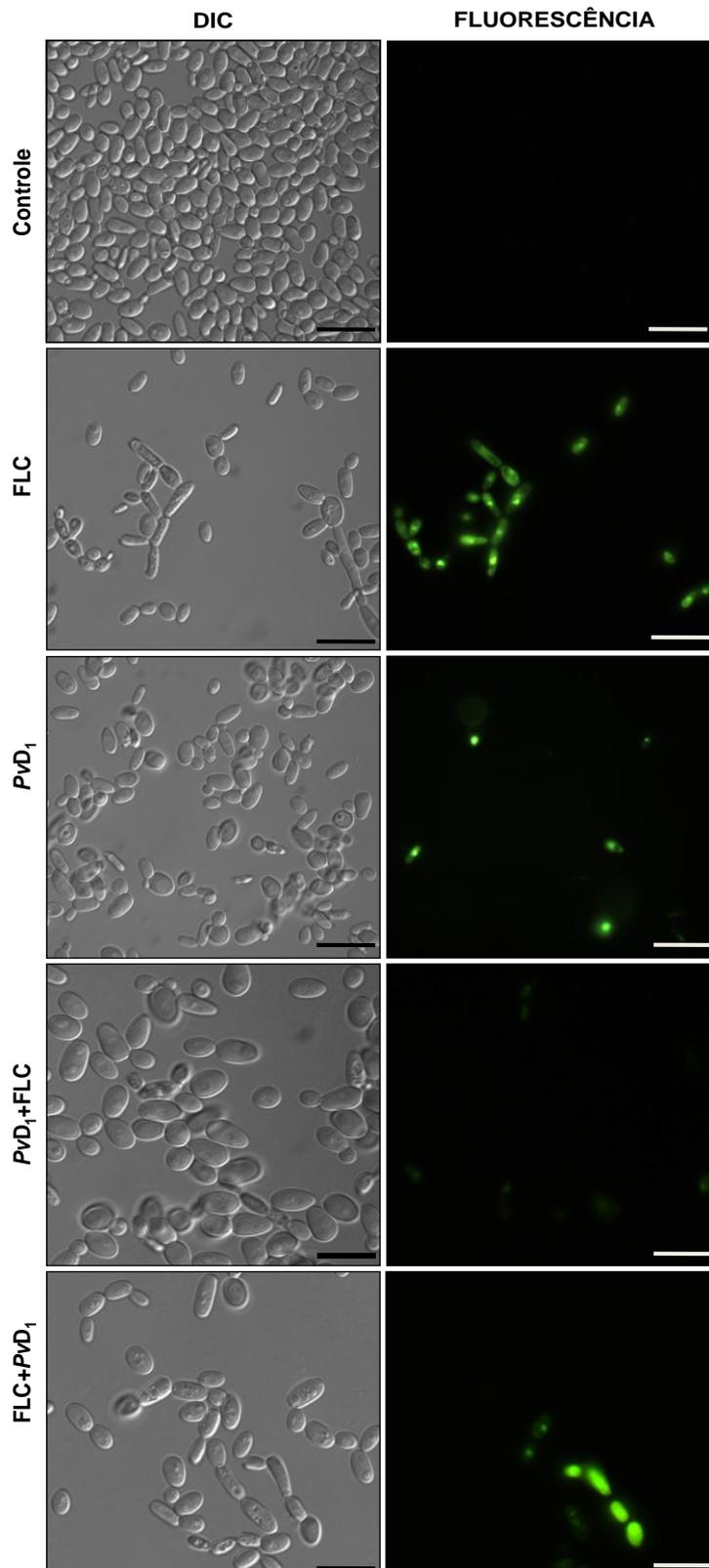


Figura 15 – Células de *C. tropicalis* tratadas com Sytox green após 24 h de incubação com as substâncias e visualizadas por microscopia de fluorescência. As células foram tratadas com: FLC – metade do IC₅₀ aproximado; PvD₁ – IC₅₀ aproximado; PvD₁+FLC; FLC+PvD₁. Células controle foram tratadas apenas com Sytox green. Barra = 20 μm.

Tabela 3. Porcentagem de células de *Candida tropicalis* permeabilizadas após tratamento com PvD_1 , FLC, PvD_1+FLC e $FLC+PvD_1$.

| Amostras | Número de células em DIC | Número de células fluorescentes | Porcentagem de células fluorescentes |
|-------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| Controle | 729,7 ± 12,55 | 0 | 0 |
| PvD_1 | 258,2 ± 43,67 | 13,2 ± 3,26 | 5,11 |
| FLC | 129,7 ± 19,34 | 20 ± 4,52 | 15,4 |
| PvD_1+FLC | 700 ± 50,45 | 33,7 ± 9,03 | 4,81 |
| $FLC+PvD_1$ | 178,2 ± 40,02 | 33,2 ± 9,03 | 18,6 |

Determinação do número de células de *Candida tropicalis* visualizadas em quatro campos aleatórios por DIC e fluorescência das amostras obtidas a partir do ensaio de permeabilização de membranas. O número de células em DIC de cada amostra foi considerado 100 %.

Contrário ao resultado obtido com *C. tropicalis*, houve ação combinatória entre PvD_1 e fluconazol contra *C. albicans*. Este resultado pode ser observado também na figura 16, que mostra uma redução no número de células nos campos dos tratamentos com a combinação de PvD_1 e fluconazol. Quanto à permeabilização das membranas, não observamos diferença significativa entre os tratamentos, porém, se compararmos com o número de células presentes nas amostras, podemos sugerir que houve uma potencialização no efeito de permeabilização de membrana da combinação de PvD_1 e FLC. A porcentagem de células permeabilizadas pode ser observada na tabela 4.

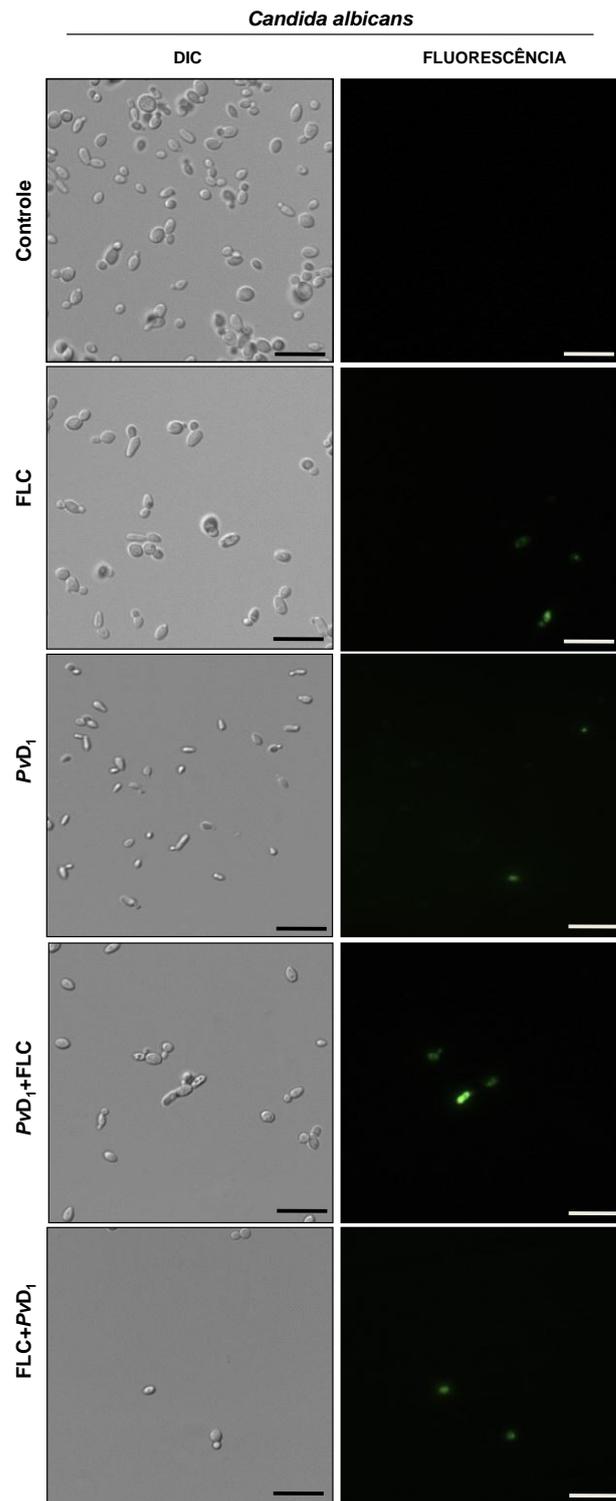


Figura 16 – Células de *C. albicans* tratadas com Sytox green após 24 h de incubação com as substâncias e visualizadas por microscopia de fluorescência. As células foram tratadas com: FLC – metade do IC₅₀ aproximado; PvD₁ – IC₅₀ aproximado; PvD₁+FLC; FLC+PvD₁. As células controle foram tratadas apenas com Sytox green. Barras = 20 µm.

Tabela 4. Porcentagem de células de *Candida albicans* permeabilizadas após tratamento com PvD_1 , FLC, PvD_1+FLC e $FLC+PvD_1$.

| Amostras | Número de células em DIC | Número de células fluorescentes | Porcentagem de células fluorescentes |
|-------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| Controle | 570,5 ± 67,04 | 0 | 0 |
| PvD_1 | 167,2 ± 5,44 | 5,2 ± 3,56 | 3,13 |
| FLC | 190,0 ± 9,05 | 7,5 ± 2,29 | 3,94 |
| PvD_1+FLC | 60,7 ± 9,65 | 8,5 ± 1,5 | 13,99 |
| $FLC+PvD_1$ | 29,75 ± 7,75 | 8,2 ± 1,9 | 27,73 |

Determinação do número de células de *Candida albicans* visualizadas em quatro campos aleatórios por DIC e fluorescência das amostras obtidas a partir do ensaio de permeabilização de membranas. O número de células em DIC de cada amostra foi considerado 100 %.

5.8. Efeitos da Defensina PvD_1 em Combinação com Fluconazol Sobre a Indução da Produção Endógena de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Ambas as leveduras foram tratadas com sonda de ROS para verificar se haveria produção endógena de espécies reativas de oxigênio resultantes da ação da defensina PvD_1 em combinação com fluconazol.

A figura 17 mostra o resultado obtido para as células de *C. tropicalis*. Houve aumento mais significativo na produção de ROS nas células tratadas com a combinação de PvD_1 e FLC em relação as células tratadas com as substâncias separadamente e ao controle. A porcentagem de células permeabilizadas pode ser observada na tabela 5.

As mudanças morfológicas causadas pelo fluconazol quando atuando sozinho não foram observadas nas células tratadas com a combinação de PvD_1 e fluconazol, principalmente nas células onde a PvD_1 foi colocada primeiro.

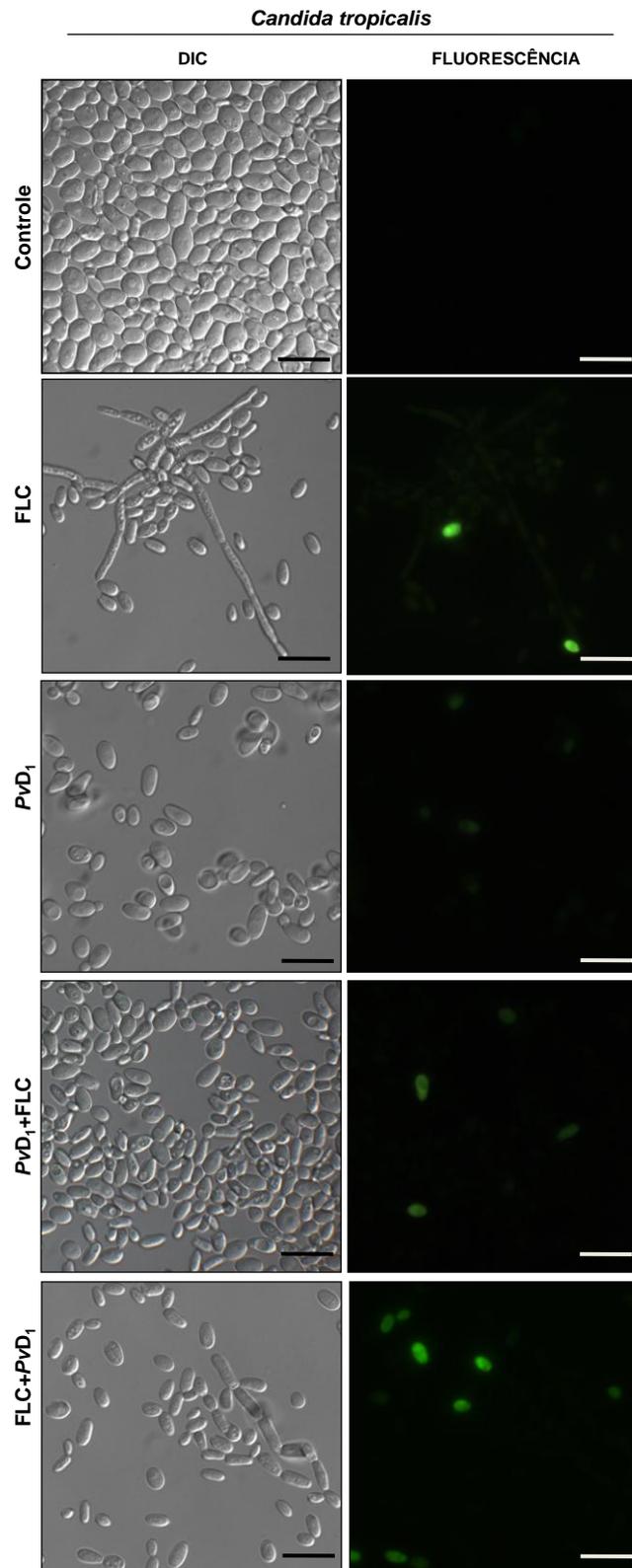


Figura 17 – Imagens das células de *C. tropicalis* tratadas com sonda fluorescente 2', 7' diclorofluoresceínadiacetato (H_2DCFDA) para detecção de espécies reativas de oxigênio e visualizadas por microscopia de fluorescência. As células foram tratadas com: FLC – metade do IC_{50} aproximado; PvD_1 – IC_{50} aproximado; PvD_1+FLC ; $FLC+PvD_1$. As células controle foram tratadas apenas com sonda H_2DCFDA . Barras de 20 μm .

Tabela 5. Porcentagem de células *Candida tropicalis* fluorescentes após tratamento com PvD_1 , FLC, PvD_1+FLC e $FLC+PvD_1$.

| Amostras | Número de células em DIC | Número de células fluorescentes | Porcentagem de células fluorescentes |
|-----------------|---------------------------------|--|---|
| Controle | 729,7 ± 12,55 | 0 | 0 |
| PvD_1 | 217,5 ± 46,8 | 3,7 ± 1,08 | 1,7 |
| FLC | 221,2 ± 67,41 | 6,2 ± 2,48 | 2,8 |
| PvD_1+FLC | 675 ± 14,3 | 10,25 ± 2,94 | 1,66 |
| $FLC+PvD_1$ | 212 ± 30,48 | 36,5 ± 13,95 | 17,2 |

Determinação do número de células de *Candida tropicalis* visualizadas em quatro campos aleatórios por DIC e fluorescência das amostras obtidas a partir do ensaio da detecção de espécies reativas de oxigênio. O número de células em DIC de cada amostra foi considerado 100 %.

Para as células de *C. albicans*, devido a um pequeno número de células nos tratamentos, não se pode afirmar que houve um aumento significativo entre os tratamentos, porém houve um aumento de ROS das células tratadas com a combinação de PvD_1 e fluconazol, em relação ao controle (Figura 18). A porcentagem de células permeabilizadas pode ser observada na tabela 6.

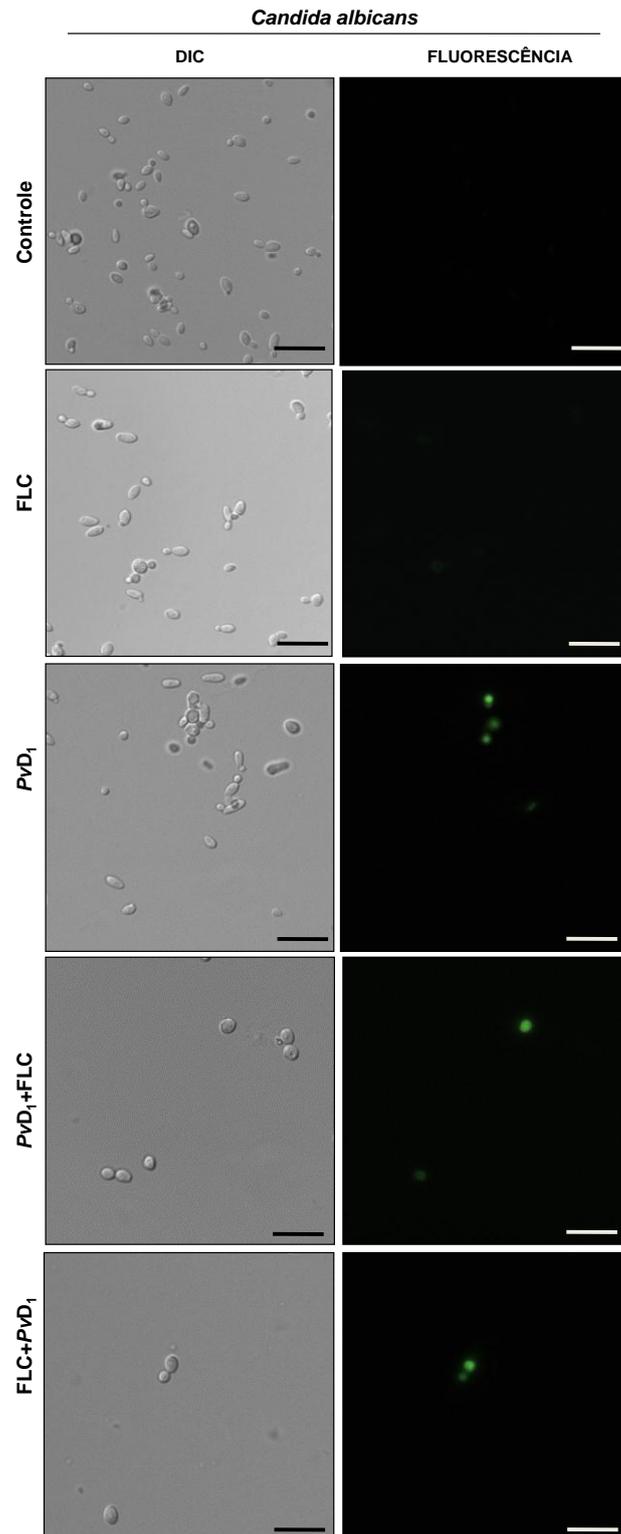


Figura 18 – Imagens das células de *C. albicans* tratadas com sonda fluorescente 2', 7' diclorofluoresceínadiacetato (H_2DCFDA) para detecção de espécies reativas de oxigênio e visualizadas por microscopia de fluorescência. As células foram tratadas com: FLC – metade do IC_{50} aproximado; PvD_1 – IC_{50} aproximado; PvD_1+FLC ; $FLC+PvD_1$. As células controle foram tratadas apenas com sonda H_2DCFDA . Barras de 20 μm .

Tabela 6. Porcentagem de células de *Candida albicans* fluorescentes após tratamento com *PvD*₁, FLC, *PvD*₁+FLC e FLC+*PvD*₁.

| Amostras | Número de células em DIC | Número de células Fluorescentes | Porcentagem de células fluorescentes |
|------------------------------|---------------------------------|--|---|
| Controle | 232 ± 20,21 | 0 | 0 |
| <i>PvD</i> ₁ | 135,2 ± 21,51 | 2,7 ± 1,50 | 2,03 |
| FLC | 117,5 ± 7,72 | 1 ± 1,15 | 0,85 |
| <i>PvD</i> ₁ +FLC | 59,5 ± 15,54 | 19,7 ± 2,06 | 33,19 |
| FLC+ <i>PvD</i> ₁ | 17,75 ± 2,21 | 2,2 ± 0,5 | 12,67 |

Determinação do número de células de *Candida albicans* visualizadas em quatro campos aleatórios por DIC e fluorescência das amostras obtidas a partir do ensaio da detecção de espécies reativas de oxigênio. O número de células em DIC de cada amostra foi considerado 100 %.

6. DISCUSSÃO

Em 2008, Games *et al.* isolaram e caracterizaram uma nova defensina de sementes de feijão comum *P. vulgaris*, a qual foi denominada de *PvD₁*. Em 2011 Mello *et al.* demonstraram a atividade antifúngica desta defensina sobre diversas espécies de fungos filamentosos e leveduras, além de elucidar seu mecanismo de ação sobre *C. albicans*. No presente trabalho, foi estudado a atividade antifúngica da defensina *PvD₁* em combinação com a droga comercial fluconazol sobre as leveduras *C. tropicalis* e *C. albicans*. O trabalho foi iniciado com a obtenção da *PvD₁* através da extração da farinha das sementes de feijão comum, de acordo com a metodologia descrita por Games *et al.* (2008) ilustrado na figura 6. Diferente do que foi encontrado por Games *et al.* (2008), neste trabalho encontramos duas, e não uma única banda majoritária no pico D1, uma de aproximadamente 6 kDa e outra de aproximadamente 16 kDa (figura 7 e 9) A fração D1 foi então submetida à cromatografia em HPLC para que então se obtivesse a defensina *PvD₁* já previamente isolada (figura 8) A diferença na composição proteica do pico D1 pode estar relacionada ao fato de que o lote de sementes utilizado neste estudo foi produzido mais recentemente e é diferente do utilizado nos experimentos por Games *et al.* (2008).

Após a purificação, foram realizados ensaios de inibição de crescimento com a combinação da defensina *PvD₁* e fluconazol utilizando a concentração de IC50 da *PvD₁* e metade do IC50 de fluconazol. Em ensaios preliminares realizados pelo nosso grupo, com a combinação de *PvD₁* e FLC contra células de *C. tropicalis*, foi observado o antagonismo dessas substâncias sobre o efeito de inibição do crescimento, ou seja, não houve nenhuma inibição com as duas substâncias colocadas concomitantemente (comunicação pessoal). Desta forma, decidiu-se por realizar uma nova abordagem, colocando uma das substâncias no início do ensaio e a outra quando a levedura atingisse sua fase LOG, a fim de verificar se a fase de crescimento celular estaria relacionada à ação antagônica. Já se sabe que a taxa de crescimento é extremamente dependente do meio e alguns compostos antimicrobianos causam danos maiores se colocados em um determinado momento da fase, como por exemplo, a fase LOG (Murray *et al.* 2006).

Os ensaios foram realizados contra as células de *C. tropicalis* e *C. albicans* *in vitro*, para comparação entre os resultados e verificar se o antagonismo está relacionado à levedura ou à interação das substâncias entre si. Nos resultados envolvendo as células de *C. tropicalis*, a combinação das substâncias ainda atuou de forma antagônica, tendo uma taxa de inibição inferior ao IC50 de *PvD*₁. Quando a segunda substância é adicionada, independente de ser a *PvD*₁ ou o FLC, além do mesmo não exercer efeito, faz com que a primeira também deixe de atuar na inibição de crescimento (figura 13, tabela 1) Contra as células de *C. albicans*, no entanto, houve uma potencialização do efeito de inibição de crescimento da combinação de *PvD*₁ e FLC, demonstrando que essas moléculas juntas atuam com efeito aditivo (figura 14, tabela 2).

Taveira *et al.* (2016) realizaram ensaios de atividade antimicrobiana contra espécies de *Candida sp.*, utilizando uma combinação da tionina de *Capsicum annuum* denominada CaThi e fluconazol e encontraram resultados semelhantes para *C. albicans* e diferentes para *C. tropicalis*. Em seus resultados, eles observaram que a combinação de CaThi e fluconazol inibiu todas as leveduras testadas, inclusive *C. tropicalis*, causando modificações morfológicas drásticas nessas células, sugerindo que essa combinação atua de forma aditiva contra as espécies de levedura usadas. Considera-se sinergismo entre AMPs e drogas, quando a ação combinada do AMP com a mesma, causa uma potencialização na diminuição no crescimento do microrganismo, em comparação com a inibição do crescimento das substâncias individuais. Alguns AMPs têm demonstrado potencializar o efeito de drogas comerciais quando atuando em conjunto, inclusive do fluconazol, atuando contra várias espécies de microrganismos diferentes (Park *et al.* 2006; Taveira *et al.*, 2016). Além desse peptídeo de planta, peptídeos de outros organismos também têm sido usados nos estudos envolvendo a combinação com drogas comerciais (Rollins-Smith *et al.* 2002; Silva, 2008).

O mecanismo de ação da *PvD*₁ está especialmente em sua propriedade de permeabilizar a membrana plasmática fúngica, causando alterações na homeostase iônica e perda da capacidade de funcionamento adequado (Carvalho e Gomes, 2011). A ação do fluconazol também provoca permeabilização de membrana devido à depleção de ergosterol e acúmulo de esteróis tóxicos (Fica, 2004). Nesse estudo foram realizados experimentos de permeabilização de membrana com células de *C. tropicalis* e *C. albicans* através da técnica de Sytox

Green O Sytox green é um corante que possui alta afinidade para ácidos nucleicos e penetra em células apenas quando sua membrana está comprometida. Em *C. tropicalis*, houve fluorescência significativa apenas nas células que foram tratadas com fluconazol sozinho e com a combinação em que o fluconazol foi incorporado primeiro ao meio. Diante desses dados, podemos sugerir que a permeabilização visualizada na combinação é causada pela ação do fluconazol durante as primeiras 14 h e que a mesma é bloqueada após a adição da *PvD*₁ (figura 15, tabela 3). Para as células de *C. albicans*, não pode ser observada uma fluorescência significativa em nenhum tratamento. Nas células tratadas com a combinação, isso ocorre provavelmente devido ao número reduzido de células, porém, se compararmos com o número de células presentes nas amostras, podemos sugerir que houve uma potencialização no efeito de permeabilização de membrana da combinação de *PvD*₁ e FLC (figura 16, tabela 4).

Além da geração de espécies reativas de oxigênio natural das células fúngicas, o estresse oxidativo pode ser causado por muitos compostos antifúngicos, sendo o aumento de espécies reativas de oxigênio um dos mecanismos de ação causados por esses compostos (Kobayashi, *et al.* 2002; Thevissen *et al.* 2007). Ao analisar o efeito da combinação de *PvD*₁ com fluconazol sobre a indução da produção endógena de ROS em células de *C. tropicalis* e *C. albicans*, verificou-se que no controle, nenhuma fluorescência foi observada, indicando a não produção endógena de ROS, durante aquele período de avaliação. Nas células de *C. tropicalis*, tratadas com as substâncias separadas, não houve fluorescência significativa, porém, nas células que foram tratadas com a combinação da *PvD*₁ e FLC houve um aumento na fluorescência, indicando um aumento na produção de ROS (figura 17, tabela 5). Nas células de *C. albicans*, devido a um pequeno número de células nos tratamentos, não se pode afirmar que houve um aumento significativo entre os tratamentos, porém em relação ao número de células no tratamento, houve um aumento de ROS das células tratadas com a combinação de *PvD*₁ e fluconazol, em relação ao controle (figura 18, tabela 6). Vários estudos têm mostrado que o aumento na produção de ROS nos organismos alvo é um modo de ação recorrentemente empregado pelas defensinas e diversos outros AMPs (Giudici *et al.* 2006; Aerts *et al.* 2007; Mello *et al.* 2011). Quando em combinação com drogas, vários AMPs demonstraram a

potencialização não só do seu efeito de permeabilização, mas também na produção de ROS, levando em alguns casos, a morte por apoptose (Aerts *et al.* 2009, 2011; Thevissen *et al.* 2012; Van Der Weerden *et al.* 2010; Taveira *et al.* 2016).

Outra característica importante em várias leveduras, entre elas algumas espécies do gênero *Candida*, é a formação de pseudo-hifas. Essa modificação morfológica acontece após agressões ou exposição a um ambiente hostil como um método de sobrevivência (Jiang *et al.* 2016). Tem-se descrito nos últimos anos que alguns AMPs são capazes de causar a formação de pseudo-hifas (Diz *et al.* 2011, Mello *et al.* 2014, Taveira *et al.* 2016). Essa característica também é observada nas células de *Candida* tratadas com fluconazol, o que indica que as células estão submetidas a estresses e precisam se adaptar para sobreviver. Nesse estudo, mesmo usando a metade do IC₅₀ do fluconazol, foi possível observar a formação de pseudo-hifas nas células de *C. tropicalis* tratadas com o fluconazol sozinho. Nas células tratadas com a combinação em que o FLC foi colocado primeiro, é possível ver um princípio de formação de pseudo-hifas, algumas células estão alongadas e parecem estar ligadas umas as outras, mas não houve progressão, muito provavelmente devido a adição de PvD₁. Este fato fortalece a suposição de que as substâncias impedem o efeito uma da outra em *C. tropicalis* (figuras 15 e 17).

A combinação de PvD₁ e FLC foi eficaz contra *C. albicans* possuindo um efeito aditivo na inibição de crescimento e levando ao aumento de permeabilização de membrana e uma possível produção endógena de ROS. Contra *C. tropicalis*, no entanto houve uma ação antagônica entre essas substâncias. Levando-se em consideração que o alvo da PvD₁ em *C. albicans* é a GlcCer (Mello *et al.* 2014) e que o alvo de ligação para o fluconazol é a enzima 14- α desmetilase, que regula a síntese de ergosterol fúngico (Sheehan *et al.* 1999), podemos sugerir que para a células de *C. albicans*, a defensina PvD₁ liga-se a GlcCer presente na membrana fúngica dando início a uma cascata de eventos, entre eles a permeabilização da membrana (Mello *et al.* 2014), sugerimos então que isso facilita a entrada do fluconazol que por sua vez, provoca alterações na membrana plasmática através da inibição da síntese de ergosterol potencializando o efeito de inibição de crescimento.

A composição de membrana da *C. tropicalis* é pouco elucidada e também não é conhecido o alvo de ligação da defensina PvD_1 para esta levedura, o que pode-se supor é que esse alvo não é GlcCer e o antagonismo da combinação não está relacionado à interação das substâncias entre si, mas sim com o alvo de ligação, em especial às diferenças na composição da membrana das duas leveduras testadas. Mais estudos são necessários para desvendar o alvo de ligação da PvD_1 e os mecanismos pelos quais a combinação de PvD_1 e FLC agem contra a *C. tropicalis*.

A ação combinatória ou sinérgica entre AMPs e drogas antimicrobianas que potencializem seu efeito terapêutico e permitam a redução na dose aplicada, já vem sendo observados nos últimos anos, gerando resultados promissores (Park *et al.* 2006; Aerts *et al.* 2011; Thevissen *et al.* 2012; Taveira *et al.* 2016). Esses resultados são muito importantes, pois ao utilizar uma quantidade mínima do medicamento reduz-se a incidência de efeitos colaterais, além de reduzir as chances de desenvolvimento de resistência pelo microrganismo. Os resultados obtidos com a PvD_1 são mais um indício do potencial de que os peptídeos antimicrobianos (AMPs) representam uma inesgotável possibilidade de novos agentes, que ao atuar em conjunto com medicamentos antifúngicos, contribuem para que os mesmos, tenham suas doses efetivas reduzidas, possam penetrar com mais efetividade na célula do microrganismo, possivelmente até mesmo aquelas com resistência selecionada, e assim potencializar sua atividade antimicrobiana.

7. CONCLUSÕES

Podemos concluir que:

- A defensina *PvD*₁ extraída de sementes de *Phaseolus vulgaris* foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* de *C. albicans* e *C. tropicalis*;
- A combinação de *PvD*₁ com fluconazol teve ação aditiva contra o crescimento de *C. albicans*;
- A combinação de *PvD*₁ e fluconazol levou a um aumento na permeabilização de membrana e na produção endógena de ROS em *C. albicans*;
- A combinação de *PvD*₁ e fluconazol não teve ação aditiva contra as células de *C. tropicalis*;
- Foi observada uma ação diferenciada da combinação de *PvD*₁ e fluconazol contra *C. tropicalis* e *C. albicans*.

8. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, H.R. Farmacologia e Terapêutica em Veterinária, 8 ed., Rio de Janeiro: Guanabara. *Koogan*, p.776-778, 2003.

AERTS, A.M., FRANÇOIS, I.E., MEERT, E.M., LI, Q.T., CAMMUE, B.P. E THEVISSSEN, K. The antifungal activity of *RsAFP2*, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, v.13, nº4, p.243-247. 2007.

AERTS, A.M., CARMONA-GUTIERREZ, D., LEFEVRE, S., GOVAERT, G., FRANCOIS, I.E., MADEO, F., SANTOS, R., CAMMUE, B.P. E THEVISSSEN, K. The antifungal plant defensin *RsAFP2* from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. *FEBS Letters*, v. 583, p.2513-2516. 2009.

AERTS, A.M., BAMMENS, L., GOVAERT, G., CARMONA-GUTIERREZ, D., MADEO, F., CAMMUE, B.P. E THEVISSSEN, K. The antifungal plant defensin *HsAFP1* from *Heuchera sanguinea* induces apoptosis in *Candida albicans*. *Front. Microbiol.*, v. 47, p.1-9. 2011.

ALMEIDA, M.S., CABRAL, K.M.S., KURTENBACH, E., ALMEIDA, F.C. L. E VALENTE, A.P. Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. *Journal of Molecular Biology*, v.215, p.403-410. 2002.

ALVARES, C.A.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *J. Bras. de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.43, n.5, p.319-327. ISSN 1676-2444, 2007.

BENKO-ISEPPON, A.M.; GALDINO, S.L.; CALSA JÚNIOR, T.; KIDO, E.A.; TOSSI, A.; BELARMINO, L.C.; CROVELLA, S. Overview of plant antimicrobial peptides. *Current Protein and Peptide Science*, v.11, p.181-188, 2010.

BLEACKLEY, M.R.; WILTSHIRE, J.L.; PERRINE-WALKER, F.; VASA, S.; BURNS, R.L.; VAN DER WEERDEN, N.L.; ANDERSON, M.A. Agp2p, the plasma membrane transregulator of polyamine uptake, regulates the antifungal activities of the plant defensin NaD1 and other cationic peptides. *Antimicrobial Agents Chemother*, v.58, p.2688–2698, 2014.

BLOCH, JR. C. E RICHARDSON, M. A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect α -amilase from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L)

Moench) have sequence homologies with wheat γ -purothionins. *FEBS Letters*, v.279, p.101-104, 1991.

BRAGA, P.C.; CULICI, M.; ALFIERI, M.; DAL SASSO, M. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *Int. Journal of Antimicrobial Agents*, v.31, p.472-477. 2008.

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

BROEKAERT, W.F., LEE, H.I., KUSH, A., CHUA, N.H. E RAIKHEL, N. Wound induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *PNAS USA*, v.87, p.7633-7637, 1990.

BROEKAERT, W.F., TERRAS, F.R.G., CAMMUE, B.P.A., OSBORN, R. W. Plant Defensins: Nove Antimicrobial Peptides as Components of the Host Defense System. *Plant Physiology*, v.108, p. 1353–1358, 1995.

BROEKAERT, W.F., CAMMUE, B.P.A., DE BOLLE, M.F.C., THEVISSSEN, K., DE SAMBLANX, G. E OSBORN, R.W. Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.16, p.297-323, 1997.

CANNON, R.D.; LAMPING, E.; HOLMES, A.R.; NIIMI, K.; BARET, P.V.; KENIYA, M.V.; TANABE, K.; NIIMI, M.; GOFFEAU, A.; MONK, B.C. Efflux Mediated Antifungal Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v.22, p.291–321, 2009.

CARVALHO, A.O., GOMES, V.M. Plant Defensins and Defensin-Like Peptides - Biological Activities and Biotechnological Applications. *Current Pharmaceutical Design*, v.17, p.4270-4293, 2011.

CHA, R.; SOBEL, J.D. Fluconazole for the treatment of candidiasis: 15 years experience. *Expert Review Anti-infect Therapy*, v.2, p.57–366, 2004.

CHAFFIN, W.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J.P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiology and Molecular Biology*, v.62, p.130-80. 1998.

CHEN, J.J., CHEN, G.H., HSU, H.C., LI, S.S. E CHEN, C.S. Cloning and functional expression of a mungbean defensin VrD₁ in *Pichia pastoris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p.2256-2261, 2004.

CHEN, G.H.; HSU, M. P.; TAN, C. H.; SUNG, H.Y.; KUO, C.G.; FAN, M.J.; CHEN, H. M.; CHEN, S.; CHEN, C.S. Cloning and characterization of a plant

defensin VaD₁ from azuki bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.982–988, 2005.

COLE, D.C.; GOVENDER, N.P.; CHAKRABARTI, A.; SACARLAL, J.; DENNING, D.W. Improvement of fungal disease identification and management: combined health systems and public health approaches. *The Lancet, Fungal Infections*, v.17, p.412-419, 2017.

COLOMBO, A.L.; MATTA, D.; ALMEIDA, L.P.; ROSAS, R. Fluconazole susceptibility of brazilian *Candida* isolates assessed by a disk diffusion method. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.6, p.118-23. 2002.

COLOMBO, A.L.; DE ALMEIDA JÚNIOR, J.N.; SLAVIN, M. A.; CHEN, S. C-A.; SORRELL T. C. *Candida* and invasive mould diseases in non-neutropenic critically ill patients and patients with haematological cancer. *Lancet Infectious Diseases*, v.17, p.344-356 , 2017.

COOLS, T.L.; VRIENS, K.; STRUYFS, C.; VERBANDT, S.; RAMADA, M.H.S.; BRAND, G.D.; BLOCH, C.; KOCH, B.; TRAVEN, A.; DRIJFHOUT, J.W.; DEMUYSER, L.; KUCHARÍKOVÁ, S.; VAN DIJCK, P.; SPASIC, D.; LAMMERTYN, J.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K. The antifungal plant defensin HsAFP1 is a phosphatidic acid-interacting peptide inducing membrane permeabilization. *Frontiers in Microbiology*, v.8, p.1-13, 2017.

COWEN, L.E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nature Reviews Microbiology*, v.6, p.187-198, 2008.

CUENCA-ESTRELLA. Antifungal drug resistance mechanisms in pathogenic fungi: from bench to bedside. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, p.54-59, 2014.

DANG, L., ELS, J. M., DAMME, V. Toxic proteins in plants. *Phytochemistry*, v.117, p.51-64, 2015.

DE CONINCK, B., CAMMUE, B.P.A. E THEVISSSEN, K. Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. *Fungal Biology Reviews*, v.26, p.109-120. 2013.

DE PAULA, V. S, RAZZERA, G., BARRETO-BERGTER, E., ALMEIDA, F. C. L. E VALENTE, A. P. Portrayal of complex dynamic properties of sugarcane defensina 5 by NMR: multiple motions associated with membrane interaction. *Structure*, v.19, p.26-36, 2011.

DIGNANI, M.C., SOLOMKIN, J.S., ANAISSIE, E. CANDIDA. In: Anaissie, E.; McGinnis, M.R.; Pfaller, M.A. Medical Mycology. 1^a ed., Churchill Livingstone, Filadélfia, p. 195-239, 2003.

DIZ, M.S., CARVALHO, A.O., RIBEIRO, S.F.F., DA CUNHA, M., BELTRAMINI, L., RODRIGUES, R., NASCIMENTO, V.V., MACHADO, O.L.T., GOMES, V.M. Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chilli pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel α -amylase inhibitory properties. *Physiol. Plantarum*, v.142, p.233-46, 2011.

DORGAN, E., DENNING, D.W., MCMULLAN, R. Burden of fungal disease in Ireland. *Journal of Medical Microbiology*, v.6, p.423–6, 2015.

ESCHENAUER, G.A.; CARVER, P.L.; LIN, S.W.; KLINKER, K.P.; CHEN, Y.C.; POTOSKI, B.A.; SHIELDS, R.K.; CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H.; LAM, S.W. Fluconazole versus an echinocandin for *Candida glabrata* fungaemia: a retrospective cohort study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.68, p.922-926, ISSN 0305-7453, 2013.

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*, v.25, p.101-6, 2008.

ESPITIA, C., SERVIN-GONZALEZ, L., MANCILLA, R. New insights into protein O-mannosylation in actinomycetes. *Molecular bioSystems Journal*, v.6, p.775-781, 2010.

FAN, T. F., VRANKEN, W., BROEKAERT, W., BORREMANS, F. Determination of the three dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal protein 1 by 1H NMR. *Journal of Molecular Biology*, v.279, p.257–270, 1998.

FICA C., A.; Tratamento de infecções fúngicas sistêmicas Primeira parte: fluconazol, itraconazol e voriconazol. *Revista chilena de Infectologia*, v.2, p.26-38, ISSN 0716-1018, 2004.

FINKINA E I; SHARAMOVA E I; TAGAEV A A; OVCHINNIKOVA T V. A novel defensin from the lentil *Lens culinaris* seeds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 371, p.860–865, 2008.

FUJIMURA, M., IDEGUCHI, M., MINAMI, Y., WATANABE, K., TADERA, K. Purification, characterization, and sequencing of novel antimicrobial peptides, Tu-

AMP 1 and Tu-AMP 2, from bulbs of tulip (*Tulipa gesneriana* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.68, p.571–577, 2004.

GAMES, P.D., SANTOS, I.S., MELLO, E.O., DIZ, M.S.S., CARVALHO, A.O., SOUZA-FILHO, G.A., DA CUNHA, M., VASCONCELOS, I.M., FERREIRA, B.S.E GOMES, V.M. Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Peptides*, v.29, p.2090-2100, 2008.

GAO, A.G., HAKIMI, S.M., MITTANCK, C.A., WU, Y., WOERNER, B.M., STARK, D.M., SHAH, D.M., LIANG, J. E ROMMENS, C.M. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology*, v.18, p.1307-1310, 2000.

GIUDICI, M., POVEDA, J.A., MOLINA, M.L., DE LA CANAL, L., GONZÁLEZ-ROS, J.M. Antifungal effects and mechanism of action of viscotoxin A3. *FEBS Journal*, v.273, p.72–83, 2006.

GIULIANI, A., PIRRI, G., NICOLETTO, S.F. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology*, v.2, p.1-33, 2007

GRANT, S., CLISSOLD, S. Fluconazole - A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial and systemic mycoses. *Drugs*, v.39, p.877-916, ISSN 0012-6667, 1990.

HAYES, B.M.E., BLEACKLEY, M.R., WILTSHIRE, J L., ANDERSON, M.A., TRAVEN, A., VAN DER WEERDEN, N.L. Identification and mechanism of action of the plant defensin NaD1 as a new member of the antifungal drug arsenal against *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.57, p.3667–3675, 2013.

HAYES, B.M.E., BLEACKLEY, M.R., ANDERSON, M.A., VAN DER WEERDEN, N.L. The plant defensin NaD1 enters the cytoplasm of *Candida albicans* via endocytosis. *Journal of Fungi*, v.4, p.1-15, 2018.

HEGEDÜS, N. E MARX, F. Antifungal proteins: more than antimicrobials? *Fungal Biology Reviews*, v.26, p.132-145, 2013.

ISLAM, K.T., VELIVELLI, S.L.S., BERG, R.H., OAKLEY, B., SAHAH, D.M. A novel bi-domain plant defensin MtDef5 with potent broad spectrum antifungal activity binds to multiple phospholipids and forms oligomers. *Scientific Reports*, v.7, p.1-13, 2017.

JANSSEN, B.J.; SCHIRRA, H.J.; LAY, F.T.; ANDERSON, M.A.; CRAIK, DJ. Structure of *Petunia hybrida* defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds. *Biochemistry*, v.42, p.8214-8222, 2003.

JIANG, C., LI, Z., ZHANG, L., TIAN, Y., DONG, D., PENG, Y. Significance of hyphae formation in virulence of *Candida tropicalis* and transcriptomic analysis of hyphal cells. *Elsevier, Microbiological Research*. V. 192, p.65-72, 2016.

KAKEYA, H., MIYAZAKI, T., MIYAZAKI, Y., KOHNO, S. Azole resistance in *Candida* spp. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, v.44, p.87-92, 2003.

KOBAYASHI, Y.; SATO, A.; TAKASHIMA, H.; TAMAOKI, H.; NISHIMURA, S.; KYOGOKU, Y.; IKENAKA, K.; KONDO, T.; MIKOSHIBA, K.; HOJO, H.; AIMOTO, S.; MORODER, L. A new α -helical motif in membrane active peptides. *Neurochemistry International*, v.18, p.525–534, 1991.

KOBAYASHI, D., KONDO, K., UEHARA, N., OTOKOZAWA, S., TSUJI, N., YAGIHASHI, A., WATANABE, N. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. *Antimicrobial Agents and Chemistry*, v.46, p.3113-3117, ISSN 0066-4804, 2002.

LACERDA, A.F., VASCONCELOS, E.A.R., PELEGRINI, P.B., GROSSI DE SA, M.F. Antifungal defensins and their role in plant defense. *Frontiers in microbiology*, v. 5, p.1-10, 2014

LAY, F.T., BRUGLIERA, F., ANDERSON, M.A. Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. *Plant Physiology*, v.131, p.1283–1293, 2003.

Liu, Y. J., Cheng, C. S., Lai, S. M., Hsu, M. P., Chen, C. S. e Lyu, P. C. Solution structure of the plant defensin VrD1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. *Proteins*, v.63, p.777-786, 2006.

LIU, Z., ZHANG, Z., FARIS, J.D., OLIVER, R.P., SYME, R., MCDONALD, M.C., MCDONALD, B.A., SOLOMON, P.S., LU, S., SHELVER, W.L., XU, S., FRIESEN, T.L. The cysteine rich necrotrophic effector SnTox1 produced by *Stagonospora nodorum* triggers susceptibility of wheat lines harboring Snn1. *PLoS Pathogens*, v.8, p.1-24, 2012.

LOBO, D.S., PEREIRA, I.B., FRAGEL-MADEIRA, L., MEDEIROS, L.N., CABRAL, L.M., FARIA, J., BELLIO, M., CAMPOS, R.C., LINDEN, R.E KURTENBACH, E. Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry*, v.46, p.987-996, 2007.

LOEFFLER, J.; D. A. STEVENS. Antifungal drug resistance. *Clinical Infectious Diseases*, v.36, p.31–41, 2003.

MAHLAPUU, M., HÅKANSSON, J., RINGSTAD, L., BJÖRN, C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontier in Cellular and Infection Microbiology*, v.6, p.1-12, 2016.

MELLO, E.O., RIBEIRO S.F.F., CARVALHO A.O., SANTOS I.S., DA CUNHA M., SANTA CATARINA C., GOMES, V.M. The antifungal activity of PvD₁, a plant seed defensin of *Phaseolus vulgaris*, involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification and induction of reactive oxygen species in yeast cells. *Current Microbiology*, v.62, p.1209–1217, 2011.

MELLO, E O., SANTOS, I.S., CARVALHO, A.O., SOUZA, L.S., SOUZA-FILHO, G.A., NASCIMENTO, V.V., MACHADO, O.L.T., ZOTTICH, U., GOMES, V.M. Functional expression and activity of the recombinant antifungal defensin PvD_{1r} from *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) seeds. *BMC Biochemistry*, v.15, p.1-13, 2014.

MENDEZ, E.; MORENO, A.; COLILLA, F.; PELAEZ, F.; LIMAS, G.G.; MENDEZ, R.; SORIANO, F.; SALINAS, M.; AND HARO, C. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, α -hordothionin, from barley endosperm. *European Journal of Biochemistry*, v.194, p.533-9, 1990.

MENDEZ, E., ROCHER, A., CALERO, M., GIRBES, T., CITORES, L., SORIANO, F. Primary structure of α -hordothionin, a member of a novel family of thionins from barley endosperm, and its inhibition of protein synthesis in eukaryotic and prokaryotic cell-free systems. *European Journal of Biochemistry*, v.239, p.67-73, 1996.

MENZIN, J., MAYERS, J.L., FRIEDMAN, M., KORN, J.R., PERFECT, J.R., LANGSTON, A.A., DANNA, R.P., PAPADOPOULOS, G. The economic costs to United States hospitals of invasive fungal infections in transplant patients. *American Journal of Infection Control*, v.39, p.15-20, 2011.

MOREIRA, M. I. Azois: Farmacologia e interações medicamentosas. Trabalho de Conclusão de Curso, Licenciatura em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando pessoa, 65 pg., 2010.

MORENO, M., SEGURA, A., AND GARCÍA-OLMEDO, F. Pseudothionin-St1, a potato peptide active against potato pathogens. *European Journal of Biochemistry*, v.223, p.135-139, 1994.

MURRAY, P.R., DREW, W.L., KOBAYASHI, G.S., THOMPSON, J.K. Microbiologia médica. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*. 5.ed, 2006.

NASCIMENTO, V.V., MELLO, E. O., CARVALHO, L.P., MELO, E.J.T., CARVALHO, A. O., FERNANDES, K.V.S., GOMES, V.M. PvD₁ defensin, a plant antimicrobial peptide with inhibitory activity against *Leishmania amazonensis*. *Bioscience Reports*, v.35, p.1-7, 2015.

NAWROT, R., BARYLSKI, J., NOWICKI, G., BRONIARCZYK, J., BUCHWALD, W., GOŹDZICKA-JÓZEFIK, A. Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiologica*, v.59, p.181–196, 2014.

NENOFF, P., OSWALD, U., HAUSTEIN, U. F. *In vitro* susceptibility of yeasts for fluconazole and itraconazole. Evaluation of a microdilution test. *Mycoses*, v.42, p.629-639, 1999.

NETT, J.E., ANDES, D.R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infect Dis. Clin. North. Am.*, 30, (1): 51-83, ISSN 1557-9824. 2016.

NEOH, C.F., SLAVIN, M., CHEN, S. C-A. STEWART, K., KONG, D. C. M. Echinocandins in the treatment of candidaemia and invasive candidiasis: clinical and economic perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.43, p.207-2014, 2014.

NG, T.B., WONG, J.H., FANG, E.F. Defensins and other biocidal proteins from bean seeds with medicinal activities. *Current Medicinal Chemistry*, v.18, p.5644-5654, 2011.

NOONAN, J., WILLIAMS, W.P., SHAN, X. Investigation of antimicrobial peptide genes associated with fungus and insect resistance in maize. *International Journal of Molecular Sciences*, v.18, p.1-16, 2017.

ODINTSOVA, T., EGOROV, T. Plant antimicrobial peptides. In: H. R. Irving; C. Gehring (Eds.); *Plant Signaling Peptides*. v. 16, p.107–133, 2012.

OGURO, Y.; YAMAZAKI, H.; TAKAGI, M.; TAKAKU, H. Antifungal activity of plant defensin AFP1 in *Brassica juncea* involves de recognition of the methyl residue in glucosylceramide of target pathogen *Candida albicans*. *Current Genetics*, v.60, p.89-97, 2014.

OLADELE, R.O., DENNING, D.W. Burden of serious fungal infection in Nigeria. *West African Journal of Medicine*, v.33, p.107–14, 2014.

OSBORN, R.W., DE SAMBLANX, G.W., THEVISSSEN, K., GODERIS, I., TORREKENS, S.E VAN LEUVEN, F.V. Isolation and characterization of plant defensins from seeds of *Asteraceae*, *Hippocastanaceae* and *Saxifragaceae*. *FEBS Letters*, v.368, p.257-262, 1995.

PARK, H.C.; KANG, Y.H.; CHUN, H.J.; KOO, J.C.; CHEONG, Y.H.; KIM, C.Y.; KIM, M.C.; CHUNG, W.S.; KIM, J.C.; YOO, J.H.; KOO, Y.D.; KOO, S.C.; LIM, C.O.; LEE, S.Y.; CHO, M.J. Characterization of a stamen-specific cDNA encoding a novel plant defensin in chinese cabbage. *Plant Molecular Biology*, v.50, p.59–69, 2002.

PARK, Y., PARK, S.N., PARK, S.C., SHIN, S.O., KIM, J.Y., KANG, S.J., KIM, M.H., JEONG, C.Y., HAHM, K.S. Synergism of Leu–Lys rich antimicrobial peptides and chloramphenicol against bacterial cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1764, p.24-32, 2006.

PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J., SHEEHAN, D.J. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clinical Microbiology Reviews*, v.19, p.435– 447, 2006.

RAMAMOORTHY, V., CAHOON, E.B., LI, J., THOKALA, M., MINTO, R.E. E SHAH, D.M. Glucosylceramide synthase is essential for alfalfa defensin-mediated growth inhibition but not for pathogenicity of *Fusarium graminearum*. *Molecular Microbiology*, v.66, p.771-786, 2007.

REZENDE, C., SEGURA, R., RIVA, S.B.M., CASTRO, V.C.O. Mecanismos de ação dos antifúngicos. *Revista Unifev: Ciência e Tecnologia*, v.2, p.222-236, ISSN: 2525-6599, 2017.

RODRIGUEZ-TUDELA, J.L., ALASTRUEY-IZQUIERDO, A., GAGO, CUENCA-ESTRELLA, S.; LEÓN, C.; MIRO, J.M; NUÑEZ BOLUDA, A.; RUIZ CAMPS, I.; SOLE, A.; DENNING., D.W. Burden of serious fungal infections in Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, v.21, p.183–189, 2015.

ROLLINS-SMITH, L.A., DOERSAM, J. K. LONGCORE, J.E. TAYLOR, S.K. SHAMBLIN, J.C. CAREY, C. ANDZASLOFF, M.A.. Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. *Developmental and Comparative Immunology*, v.26, p.63–72, 2002.

SAGARAM, U.S., PANDURANGI, R., KAUR, J., SMITH, T.J., SHAH, D.M. Structure-activity determinants in antifungal plant defensins *MsDef1* and *MtDef4* with different modes of action against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*, v. 6, p.1-13, 2011.

SANTOS JR, I. D., SOUZA, I.A.M., BORGES, R.G., SOUZA, L.B. S., SANTANA, W.J.; COUTINHO, H.D.M. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. *Scientia Medica*, Porto Alegre: PUCRS, v. 15, p.189-197, 2005.

SARDI, J. C. O.; PITANGUI, N. S.; GULLO, F. P.; ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. A mini review of *Candida* species in hospital infection: Epidemiology, virulence factor and drugs resistance and prophylaxis. *Trop. Med. Surg.* v. 1, p.1-7, ISSN 2329-9088, 2013.

SCHÄGGER, H. E VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, v.166, p.368-379, 1987.

SEGURA, A., MORENO, M., MOLINA, A. E GARCIA-OLMEDO, F. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Letters*, v.435, p.159-162, 1998.

SHABIR, U., ALI, S., MAGRAY, A.R., GANAI, B.A., FIRDOUS, P., HASSAN, T., NAZIR, R. Fish antimicrobial peptides (AMP's) as essential and promising molecular therapeutic agents: A review. *Microbial Pathogenesis*, v.114, p.50–56. Doi 10.1016/j.micpath.2017.11.039, 2018.

SHEEHAN, D.J., HITCHCOCK, C.A., SIBLEY, C.M. Current and emerging azole antifungal agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, p.40-79, 1999.

SHIRAKAWA, M., UEDA, H., KOUMOTO, Y., FUJI, K., NISHIYAMA, C., KOHCHI, T. CONTINUOUS VASCULAR RING (COV1) is a transGolgi network-localized membrane protein required for Golgi morphology and vacuolar protein sorting. *Plant Cell Physiology*, v.55, p.764–772, 2014.

SILVA, F. D. Mecanismo de ação da microplusina, um peptídeo quelante de cobre com atividade antimicrobiana. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Biologia da Relação Patógeno e Hospedeiro - Universidade de São Paulo, 31 pg., 2008.

SILVA, O.N.; MULDER, K.C.L.; BARBOSA, A.E.A.D.; OTERO-GONZALEZ, A.J.; LOPEZ-ABARRATEGUI, C.; REZENDE, T.M.B.; DIAS, S.C.; FRANCO, O.L.

Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: From natural screenings to biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology*, v.2, p.1-14, 2011.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*; v.36, p.288-305, 2012.

SITARAM, N. Antimicrobial peptides with unusual amino acid compositions and unusual structures. *Current Medicinal Chemistry*, v.13, p.679–696, 2006.

SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MAALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OSLO, B.J., KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, v.150, p.76-85, 1985.

SOLIS, J., MEDRANO, G., GHISLAIN, M. Inhibitory effect of a defensin gene from the Andean crop maca (*Lepidium meyenii*) against *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology*, v.164, p.1071–1082, 2007.

SOUZA, G.S., NASCIMENTO, V.V., CARVALHO, L.P., MELO, E.J.T., FERNANDES, K.V., MACHADO, O.L.T., RETAMAL, C A., GOMES, V.M. E CARVALHO, A.O. Activity of recombinant and natural defensins from *Vigna unguiculata* seeds against *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology*, v.35, p.116-125, 2013.

SPAMPINATO, C., LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. *BioMed Research International*, v.2013, p.1-13, ISSN 2314-6133, 2013.

SPELBRINK, R.G., DILMAC, N., ALLEN, A., SMITH, T.J., SHAH, D.M., HOCKERMAN, G.H. Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. *Plant Physiology*, v.135, p.2055–2067, 2004.

STANGARLIN, J.R., KUHN, O.J., TOLEDO, M.V., PORTZ, R.L., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. *Scientia Agraria Paranaensis*, v.10, p.18-46, 2011.

TAM, J.P., WANG, S., WONG, K.H., TAN, W.L. Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals*, v.8, p.711-757, 2015.

TAVEIRA, G.B., MATHIAS, L.S., VIEIRA-DA-MOTTA, O., MACHADO, O.L.T., RODRIGUES, R., CARVALHO, A.O., TEIXEIRA-FERREIRA, A., PERALES, J., VASCONCELOS, I.M. E GOMES, V.M. Thionin-like peptides from *Capsicum annuum* fruits with high activity against human pathogenic bacteria and yeasts. *Biopolymers*, v.102, p.30-39, 2014.

TAVEIRA, G.B., CARVALHO, A.O., RODRIGUES, R., TRINDADE, F. G.; CUNHA, M., GOMES, V.M. Thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits: mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida* species. *BMC Microbiology*, v.16, p.1-13, 2016.

TAYLOR, B.N., FICHTENBAUM, C., SAAVEDRA, M., SLAVINSKY III, J., SWOBODA, R., WOZNIAK, K., ARRIBAS, A., POWDERLY, W., FIDEL JR, P. L. In vivo virulence of *Candida albicans* isolates causing mucosal infections in people infected with the human immunodeficiency virus. *The Journal of Infectious Diseases*, v.182, p.955–959, 2000.

TEIXEIRA, V., FEIO, M. J. E BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, v.51, p.149-177, 2012.

TERRAS, F., SCHOOF, H., DE BOLLE, M., VAN LEUVEN, F., REES, S., VANDERLEYDEN, J., CAMMUE, B. E BROEKAERT, W. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *The Journal of Biological Chemistry*, v.267, p.15301-15309, 1992.

TERRAS, F.R.G., ERGERMONT, K., KOVALEVA, V., RAIKHEL, N.V., OSBOURN, R.W., KESTER, A., REES, S.B., TORREKENS, S., VAN LEUDEN, F., VANDERLEYDEN, J., CAMMUE, B.P.A. E BROEKAERT, W.F. Small cystein-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*, v.7, p.573-588, 1995.

THEVISSSEN, K., TERRAS, F.R.G. E BROEKAERT, W.F. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p.5451-5458, 1999.

THEVISSSEN, K., FERKET, K.K.A., FRANÇOIS, I.E.J.A. E CAMMUE, B. P.A. Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides*, v.24, p.1705-1712, 2003.

THEVISSSEN, K., WARNECKE, D.C., FRANCOIS, I.E., LEIPELT, M., HEINZ, E., OTT, C., ZHRINGER, U., THOMMA, B.P., FERKET, K.K.E

CAMMUE, B.P. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *The Journal of Biological Chemistry*, v.279, p.3900-3905, 2004.

THEVISSSEN, K., KRISTENSEN, H-H., THOMMA, B.P.H.J., CAMMUE, B. P.A.E FRANÇOIS, I.E.J.A. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discovery Today*, v.12, p.966-971, 2007.

THEVISSSEN, K., DE MELLO TAVARES, P., XU, D., BLANKENSHIP, J., VANDENBOSCH, D., IDKOWIAK-BALDYS, J., GOVAERT, G., BINK, A., ROZENTAL, S., DE GROOT, P.W., DAVIS, T.R., KUMAMOTO, C.A., VARGAS, G., NIMRICHTER, L., COENYE, T., MITCHELL, A., ROEMER, T., HANNUN, Y.A. E CAMMUE, B.P. The plant defensin *R*sAFP2 induces cell wall stress, septin mislocalization and accumulation of ceramides in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, v.84, p.166-180, 2012.

VAN DER WEERDEN, N.L., LAY, F.T. E ANDERSON, M.A. The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae. *The Journal of Biological Chemistry*, v.283, p.14445-14452, 2008.

VAN DER WEERDEN, N.L., HANCOCK, R.E. E ANDERSON, M.A. Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process. *Journal of Biological Chemistry*, v.285, p.37513-37520, 2010.

VAN'T HOF, W., VEERMAN, E.C.I., HELMERHORST, E.J., NIEUW AMERONGEN, A.V. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Journal of Biological Chemistry*, v.382, p.597-619, 2001.

VRIENS, K.; CAMMUE, B.P.; THEVISSSEN, K. Antifungal plant defensins: Mechanisms of action and production. *Molecules*, v.19, p.12280-12303, 2014.

WANG, S., RAO, P. E YE, X. Isolation and biochemical characterization of a novel leguminous defense peptide with antifungal and antiproliferative potency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.82, p.79-86, 2009.

WILMES, M., CAMMUE, B.P.A., SAHL, H.G. E THEVISSSEN, K. Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation. *Natural Product Reports*, v.28, p.1350-1358, 2011.

WISNIEWSKI M E; BASSET C L; ARTLIP T S; WEBB R P; JANISIEWICZ W J; NORELLI J L. Characterization of a defensin in bark and fruit tissues of

peach and antimicrobial activity of a recombinant defensin in the yeast, *Pichia pastoris*. *Physiologia Plantarum*, v.119, p. 563–572, 2003.

WONG, J.H. E NG, T.B. Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. *Peptides*, v.26, p.1120-1126, 2005.

ZICCARDI, M.; SOUZA, L.O.P.; GANDRA, R.M.; GALDINO, A.C.M.; BAPTISTA, A.R.; NUNES, A.P.F.; RIBEIRO, M.A., BRANQUINHA, M.H.; SANTOS, A.L.F. *Candida parapsilosis* (sensu lato) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. *International Journal of Medical Microbiology*, v.305, p.848-59, ISSN 1618-0607, 2015.

YE X Y; NG T B. Peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to cowpea 10-kda protein precursor exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptaseinhibitory activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 285, p.424–429, 2001.

ZHU, S., GAO, B., E TYTGAT, J. Phylogenetic distribution, functional epitopes and evolution of the CSab superfamily. *Cellelar Molecular Life Sciences*, v.62, p.2257–2269, 2005.

ZHU, M., LIU, P., NIU, Z.W. A perspective on general direction and challenges facing antimicrobial peptides. *Chinese Chemical Letters Chinese Chemical Society* v.28, p.703–708, 2017.