



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FRANCISCA LIDIANE LINHARES DE AGUIAR

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS CROTALICIDINAS CONTRA LEVEDURAS
RESISTENTES E CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO
FRAGMENTO C_{tn}[15-34] COM MODELOS DE BIOMEMBRANAS**

FORTALEZA

2019

FRANCISCA LIDIANE LINHARES DE AGUIAR

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS CROTALICIDINAS CONTRA LEVEDURAS
RESISTENTES E CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO
FRAGMENTO Ctn[15-34] COM MODELOS DE BIOMEMBRANAS**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Farmácia

Orientador: Prof^o. Dr. Gandhi Rádis-Baptista

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Carolina Sidrim de Paula Cavalcante

FORTALEZA

2019

FRANCISCA LIDIANE LINHARES DE AGUIAR

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS CROTALICIDINAS CONTRA LEVEDURAS
RESISTENTES E CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO
FRAGMENTO Ctn[15-34] COM MODELOS DE BIOMEMBRANAS**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

APROVADA EM: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^o. Dr. Gandhi Rádís Baptista (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof.^a. Dra. Carolina Sidrim de Paula Cavalcante (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof.^a. Dra. Aparecida Tiemi Nagao Dias
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof.^a. Dra. Luciana Magalhães Melo
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof.^a. Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle
Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

Prof. Dr. Roberto Nicolete
Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, CE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A229a Aguiar, Francisca Lidiane Linhares de.
Atividade antifúngica das crotalicidinas contra leveduras resistentes e caracterização do mecanismo de ação do fragmento Ctn[15-34] com modelos de biomembranas / Francisca Lidiane Linhares de Aguiar. – 2019.
107 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Gandhi Rádis-Baptista.
Coorientação: Profa. Dra. Carolina Sidrim de Paula Cavalcante.
1. peptídeo antimicrobiano (PAM). 2. crotalicidina. 3. levedura resistente. 4. biofilme. 5. lipossomas. I.
Título.
-

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo suporte durante toda minha vida acadêmica.

Ao prof. Gandhi Rádis-Baptista pela orientação e, sobretudo pela gentileza, paciência, confiança e oportunidades que me foram concedidas durante essa jornada.

À profa. Carol Sidrim pela disponibilidade e co-orientação, pelos momentos de descontração, por todas as caronas e cafés no Centro de Estudos em Aquicultura Costeira - CEAC. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Nuno C Santos pela oportunidade, disponibilidade e preocupação para que minha experiência fosse a melhor possível durante meu estágio no Instituto de Medicina Molecular na Universidade de Lisboa. A todos que fazem parte da Unidade de Biomembranas por serem sempre tão solícitos, em especial a Teresa Freitas pelo carinho e a Sónia Abreu, pela amizade, paciência e ensinamentos.

À todos que fazem parte do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú, em especial a profa. Raquel Fontenelle que esteve comigo desde a graduação. Agradeço pela amizade e suporte durante todos esses anos.

Aos professores do Curso do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPgCF) da Universidade Federal do Ceará, pela dedicação e valiosas contribuições acadêmicas oferecidas durante esse período.

Ao secretário do PPgCF, Maxwell Rodrigues, pelo exemplo de funcionário, pela responsabilidade e dedicação com que trata dos assuntos relacionados ao programa.

Aos meus amigos, em especial a Ana Bruna que compartilhou comigo grande parte dos desafios e experiências da pós-graduação.

Aos membros da banca examinadora pela colaboração.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo financiamento da pesquisa (Código de Financiamento 001) e concessão da bolsa durante o período de realização do doutoramento.

À todos, minha sincera gratidão.

'A persistência é o menor caminho do êxito'

(Charles Chaplin)

RESUMO

A crotalicidina (Ctn), um peptídeo antimicrobiano relacionado à catelicidina da glândula de veneno de uma cascavel da América do Sul, bem como seu fragmento C-terminal, Ctn [15-34], têm demonstrado importantes atividades contra microorganismos, protozoários tripanossomáticos e certas linhas celulares de tumor. Aqui, a atividade contra cepas clínicas de *Candida albicans* resistente ao fluconazol e *Cryptococcus* spp resistente ao fluconazol e anfotericina B é demonstrado. Testes de microdiluição e viabilidade celular foram utilizados para avaliar e comparar a suscetibilidade de leveduras patogênicas e o potencial inibitório desses peptídeos. As curvas de cinética de morte do peptídeo mais ativo (Ctn [15-34]) isoladamente ou em combinação com fluconazol contra leveduras patogênicas resistentes foram determinadas. Concomitantemente, o efeito fungicida e/ou fungistático do Ctn [15-34] foi visualizado pelo teste do *spotting*. Testes de viabilidade utilizando XTT, microscopia confocal e AFM foram utilizados para determinar a atividade antibiofilme de Ctn [15-34] frente *C. albicans*. Ensaio de fluorescência utilizando di-8-ANEPPS, espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta utilizando lipossomas foram utilizados para esclarecer os mecanismos de ação de Ctn[15-34]. Todos os peptídeos foram ativos contra todas as linhagens de leveduras, incluindo as resistentes aos antifúngicos. A associação de fluconazol com Ctn e Ctn [15-34], embora não seja sinérgica, foi capaz de reduzir os valores de CIM antifúngica contra *C. albicans* resistentes ao fluconazol, voltando aos padrões de suscetibilidade. Além disso, o Ctn [15-34] sozinho ou em combinação com o fluconazol inibiu o crescimento de leveduras após 8 horas de tratamento. Ctn[15-34] inibiu a formação de biofilme, inclusive frente a cepas resistentes. Os ensaios espectroscópios mostraram uma interação do peptídeo com a membrana de *C. albicans*. No geral, Ctn e Ctn [15-34] são potenciais derivações antifúngicas que exibem atividades anti-leveduras, mesmo contra isolados clínicos dotados de mecanismos de resistência a medicamentos. A atividade peptídica eficaz contra cepas resistentes de leveduras patogênicas demonstra que os peptídeos derivados da crotalicidina são modelos promissores para o desenvolvimento de novos antifúngicos.

Keywords: peptideo antimicrobiano (PAM), crotalidina, levedura resistente, biofilme, lipossomas.

ABSTRACT

Crotalicidin (Ctn), a cathelicidin-related antimicrobial peptide from the venom gland of a South American rattlesnake, as well as its C-terminal Ctn[15-34] fragment, have shown important activities against micro-organisms, trypanosomatid protozoa and certain lines of tumor cells. Herein, the activity against clinical strains of fluconazole-resistant *Candida albicans* and of amphotericin B and fluconazole-resistant *Cryptococcus* spp. is demonstrated. Microdilution and luminescent cell viability tests were used to evaluate and compare the susceptibility of pathogenic yeasts and the inhibitory potential of these peptides. The time-kill curves of the most active peptide (Ctn[15-34]) alone or in combination with fluconazole against resistant pathogenic yeasts were determined. Concomitantly, fungicidal and/or fungistatic effect of Ctn[15-34] were visualized by the spotting test. Viability tests using XTT, confocal laser scanning microscope and AFM were used to determine antibiofilm activity of Ctn[15-34] against *C. albicans*. Fluorescence assays using Di-8-ANEPPS, dynamic light scattering and zeta potential using liposomes were used to clarify the mechanisms of action of Ctn [15-34]. All peptides were active against all yeast strains, including those resistant to antifungals. The association of fluconazole with both Ctn and Ctn[15-34], although not synergic, was able to reduce the antifungal MIC values against fluconazole-resistant *C. albicans* back to the susceptibility standards. Moreover, Ctn[15-34] alone or in combination with fluconazole inhibited yeast growth after 8 hours of treatment. Ctn [15-34] inhibited biofilm formation, even against resistant strains. Spectroscopic assays showed an interaction of the peptide with the *Candida membrane*. Overall, Ctn and Ctn[15-34] are potential antifungal leads displaying anti-yeast activities even against clinical isolates endowed with drug resistance mechanisms. The effective peptide activity against resistant strains of pathogenic yeasts demonstrates that crotalicidin-derived peptides are promising templates to the development of new antifungals.

Keywords: antimicrobial peptide (AMP), clinical isolates, crotalicidin, resistant yeasts, biofilm, liposome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estágios de formação do biofilme em <i>C. albicans</i> : (1) adesão das células (verde) a superfície; (2) formação de microcolônias na camada basal; (2) formação de camadas superiores, com a presença de hifas e produção de matrix extracelular (azul); (4) maturação do biofilme (4) dispersão de esporos (violeta), que atuam como propágulos dando origem a novos biofilmes.....	18
Figura 2.	Principais mecanismos de resistência de <i>Candida</i> spp. aos medicamentos antifúngicos.	21
Figura 3.	Modelos de mecanismos de ação membranolíticos dos peptídeos antimicrobianos.....	26
Figura 4.	Modelos de ação propostos para AMPs com atividade antifúngica.....	27
Figura 5.	Estrutura secundária do peptídeo Crotalicidina (Ctn) e seus fragmentos Ctn[1-14] e Ctn[15-34]. Destaque para as atividades biológicas do Ctn[15-34].....	30
Figura 6.	Representações de três tipos de lipídeos de membrana. a) Fosfatidilcolina. b)Glicolípídeo. c)Esterol.....	31
Figura 7.	Estrutura da membrana e parede celular fúngica.....	32
Figura 8.	Viabilidade relative de <i>C. albicans</i> (Cepa selvagem) (A), <i>C. albicans</i> (isolado clínico) (B), and <i>C. neoformans</i> (isolado clínico) (C) depois do tratamento com concentrações crescentes de Ctn[15-34], fluconazol (FLC) e a combinação de Ctn[15-34] e FLC.....	50
Figura 9.	Cinética de morte de <i>C. albicans</i> (ATCC 90028) (A), <i>C. albicans</i> (isolado clínico) (B) e <i>C. neoformans</i> (isolado clínico) (C) tratados com Ctn[15-34], AMB, FLC e Ctn [15-34] combinado with FLC. Experiento realizado em triplicata.....	52

Figura 10.	Formação das colônias de leveduras em SDA depois do tratamento com Ctn [15-34], AMB and FLC após 24h de incubação. Alíquotas de 2 µl do teste de microdiluição foram adicionados na superfície das placas com ágar, incubados overnight a 35°C e fotografados em seguida.....	53
Figura 11.	Eletroforese em gel de agarose com produtos de amplificação do PCR..	55
Figura 12.	Perfil de expressão gênica em <i>C. albicans</i> resistente a fluconazol.....	55
Figura 13.	Formação de biofilme em diferentes concentrações e tempos de incubação.....	56
Figura 14.	Atividade antibiofilme de Ctn[15-34] frente <i>C. albicans</i> . Imagens obtidas através de microscopia confocal de varredura a laser depois de 72hs de incubação das cepas. Aumento: 400x. Lasers: 488 nm (SYTO9) para células viáveis; 561 nm (iodeto de propídio) para células mortas (A). Quantificação das células viáveis obtidas através da avaliação das imagens. Barras representam média ± desvio padrão. ***p<0,001 em relação ao controle (células sem tratamento).....	57
Figura 15.	Imagens AFM de biofilmes de <i>C. albicans</i> . Foram realizados ensaios de formação, erradicação e inibição para as células ATCC e isolado clínico. Imagens de microscopia de força atômica mostraram o efeito do peptídeo antimicótico em <i>C. albicans</i> , com diferentes concentrações de peptídeos (ausência, MIC, 10XMIC e 100XMIC). Área total de digitalização para cada imagem: 10 × 10 µm ²	59
Figura 16.	Potencial de membrana dipolar em sistemas de membrnas lipídicas e células de <i>C. albicans</i>	60
Figura 17.	Diâmetro hidrodinâmico das diferentes vesículas lipídicas tratadas com concentrações crescentes do peptídeo Ctn[15-34]. (A) Escala de 6000 µM devido a grande aglomeração apresentada na concentração de 50 µM para membrane like (B) Detalhe dos dados para as vesículas que apresentaram tamanho em escala < 150 µM, sem a concentração de 50 µM para membrane like.....	61

Figura 18. Potencial zeta das vesículas lipídicas, de protoplastos e células de *C. albicans*. Foram utilizadas vesículas na concentração de 200 μM e células na concentração de 10^5 UFC.ml^{-1} 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Peptídeos antifúngicos utilizados em ensaios clínicos.....	28
Tabela 2.	Genes selecionados para o estudo de expressão de resistência versus susceptibilidade em <i>Candida</i> spp	39
Tabela 3.	Modelos de lipossomas e células utilizadas nos estudos de mecanismos de ação do peptídeo Ctn [15-34].....	44
Tabela 4.	Propriedades físico-químicas da crotalidina (Ctn) e seus fragmentos N-terminal (Ctn[1-14] e C-terminal (Ctn[15-34]).....	47
Tabela 5.	Determinação da concentração mínima inibitória (CIM) do Ctn e dos peptídeos derivados Ctn[1-14] and Ctn[15-34]) frente a leveduras resistentes a AMB e/ou FLC.....	48
Tabela 6.	Determinação do índice FIC (FICI) para <i>Candida albicans</i> and <i>Cryptococcus neoformans</i> resistentes a fluconazol.....	49
Tabela 7	Genes e suas respectivas proteínas relacionadas a resistência em <i>Candida</i> spp.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ²⁺	Cátion bivalente de Cálcio
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CHOL	Colesterol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
ERG	Ergosterol
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FIC	Concentração Inibitória Fracionada
FICI	Índice de Concentração Inibitória Fracionária
FLC	Fluconazol
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxi-1-piperazina)etanosulfônico
HIV	<i>Human immunodeficiency vírus</i>
IFIs	Infecções fúngicas invasivas
LABMIC	Laboratório de Microbiologia
LUVs	<i>Large Unilamellar Vesicles</i>
Mg ²⁺	Cátion bivalente de Magnésio
MLVs	<i>Multilamellar Lipid Vesicles</i>
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
PI	Iodeto de propídeo
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
POPE	1-palmitoil A oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina
POPI	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoinositol
POPS	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-L-serina
RPMI	Meio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-qPCR	<i>Reverse Transcriptase- Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SDA	Sabouraud dextrose ágar
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	Infecções fúngicas invasivas (IFIs).....	15
1.2	Biofilmes	17
1.3	Mecanismos de resistência a antifúngicos	19
1.3.1	Resistência aos derivados azólicos	21
1.3.2	Resistência as equinocandinas	22
1.3.3	Resistência aos polienos.....	22
1.4	Peptídeos antimicrobianos como fonte para o desenvolvimento de novos antifúngicos	23
1.4.1	Propriedades físico-químicas.....	24
1.4.2	Mecanismos de ação.....	25
1.4.3	Crotalidinas.....	29
1.5	Estrutura e organização das membranas biológicas.....	30
2.	JUSTIFICATIVA.....	34
3.	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral.....	35
3.2	Objetivos específicos	35
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	Peptídeos	36
4.2	Micro-organismos	36
4.3	Preparação do inóculo para os testes de susceptibilidade antifúngica	36
4.4	Teste de microdiluição em caldo.....	36
4.5	Atividade modulatória pelo método de <i>Checkerboard</i>	37
4.6	Ensaio da Curva do tempo de morte	37
4.7	Viabilidade celular com BactiterGlo	38
4.8	Perfil de expressão gênica em <i>C. albicans</i>	38
4.8.1	Extração de RNA total	38
4.8.2	Síntese de cDNA	39
4.8.3	Análise do perfil de expressão gênica por RT-qPCR de <i>C. albicans</i>	39
4.8.4	Eletroforese em Gel de Agarose	40
4.8.5	Análise estatística dos dados de qPCR.....	41

4.9	Atividade antibiofilme de Ctn[15-34] frente a <i>C. albicans</i>	41
4.9.1	Preparação da cultura para os ensaios antibiofilme	41
4.9.2	Formação do biofilme	42
4.9.3	Erradicação e inibição do biofilme por microscopia confocal.....	42
4.9.4	Análise morfológica do biofilme de <i>C.albicans</i> utilizando AFM.....	43
4.10	Estudos do mecanismo de ação de Ctn [15-34] em <i>C. albicans</i>	43
4.10.1	Isolamento de protoplastos em <i>C. albicans</i>	43
4.10.2	Preparação dos lipossomas	44
4.10.3	Espectroscopia de fluorescência usando di-8-ANEPPS	44
4.10.4	Dispersão dinâmica de luz (DLS).....	45
4.10.5	Zeta potencial	46
5.	RESULTADOS.....	47
5.1	Atividade antifúngica e modulatória das crotalicidinas	47
5.2	Perfil de expressão gênica em <i>C. albicans</i> sensível e resistente a fluconazol	53
5.3	Atividade antibiofilme frente <i>C. albicans</i>	55
5.4	Mecanismos de ação de Ctn[15-34] utilizando membranas lipídicas	60
6.	DISCUSSÃO	63
7.	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	70
	APÊNDICES	79
	APÊNDICE A	80
	APÊNDICE B.....	85
	APÊNDICE C.....	97

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infecções fúngicas invasivas (IFIs)

As IFIs são caracterizadas por infecções fúngicas sistêmicas, generalizadas, profundas, viscerais e com grave risco de vida. Estas infecções estão associadas com altas taxas de mortalidade e morbidade, além de elevados custos com os tratamentos. Muitos fatores contribuem para o aumento dessas infecções nas últimas décadas, como uso prolongado de um amplo espectro de antimicrobianos, que possibilita a emergência de cepas resistentes, uso de dispositivos médicos e aumento de pacientes que fazem tratamentos ou possuem qualquer condição que provoque imunossupressão, como portadores de HIV, doenças autoimunes, diabéticos, transplantados, entre outros (ENOCH et al., 2017).

Estima-se que as IFIs causem mais de 1,5 milhões de mortes em todo mundo (ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018). Os micro-organismos mais envolvidos nessas infecções são as espécies de *Candida*, responsáveis pelas candidemias e *Cryptococcus*, causadores da meningite criptocócica. A incidência anual estimada de micoses invasivas devido a esses patógenos é de 223.100 casos de candidíase (BONGOMIN et al., 2018) e 1 milhão de casos, com aproximadamente 625 mil mortes, para criptococose (MADA, JAMIL e ALAM, 2019).

As candidemias provocadas por leveduras de *Candida* spp ocorrem principalmente em ambiente hospitalar. Estes patógenos oportunistas fazem parte da microbiota humana, colonizam cavidade oral, trato gastrointestinal e mucosa vaginal (SARDI et al., 2013), no entanto, em condições de imunossupressão são capazes de provocar infecções. Além das condições do próprio hospedeiro, essas infecções dependem também da capacidade dos micro-organismos de produzir o que chamamos de fatores de virulência. No caso das leveduras, os principais fatores de virulência são capacidade de expressão de enzimas extracelulares hidrolíticas, fosfolipases e proteinases, que degradam os tecidos do hospedeiro; produção de adesinas (Ex: família ALS, IEPa, Hwp, 1 Int, etc.) fundamentais para colonização (DEORUKHKAR; ROUSHANI, 2017); formação de biofilmes; produção de tubo germinativo por algumas espécies de *Candida* spp.; produção de hemolisinas e hidrofobicidade da superfície

celular e resistência ao peróxido de hidrogênio (DEORUKHKAR, SAINI, MATHEW, 2014).

Espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* são patógenos responsáveis por cerca de 90% das meningites que acometem pacientes HIV positivos. Essas leveduras podem causar infecções de alto risco de vida porque produzem como fatores de virulência a capacidade de desenvolver in vivo uma cápsula reticulada extracelular, que reformula a célula fúngica em uma versão mais patogênica capaz de modular e escapar do sistema imunológico do hospedeiro já comprometido (MUKAREMERA et al., 2018). Ao contrário das espécies de *Candida*, as leveduras de *Cryptococcus* spp. não fazem parte da microbiota do corpo humano. Esses patógenos têm distribuição global no meio ambiente e podem ser frequentemente isoladas do solo e das aves, principalmente pombos (Columbidae); elas também colonizam várias espécies de árvores. Nos seres humanos, a infecção por *Cryptococcus* ocorre por inalação, com o fungo causando infecção pulmonar que pode subsequentemente levar a meningite, encefalite ou meningoencefalite (ARAUJO et al., 2017; CHEN et al., 2017).

Embora menos comum, há relatos de *Cryptococcus* pertencentes a outras espécies além do complexo *C. neoformans/C. gattii* que infectam seres humanos, como *C. albidus* e *C. laurentii* (PAL e DAVE 2016). A infecção por *C. laurentii*, além da inalação, também pode ocorrer pelas vias digestivas e por lesões cutâneas. Os casos relatados nos últimos cinco anos incluem doenças como meningite criptocócica associada a portadores de HIV (MANFREDI et al., 2006), criptococose cutânea primária (MOLINA-LEYVA et al., 2013), infecção central associada a catéter (RODRIGUEZ e PINILLA, 2012), fungemia em recém-nascidos prematuros (CHENG et al., 2001), infecção de pacientes com câncer (NEVES et al., 2015), doença cardiovascular (BANERJEE et al., 2013) e infecção de pacientes imunocomprometidos (SMITH et al., 2017).

A presença da cápsula polissacarídica é uma das características mais marcantes em *Cryptococcus* spp e constitui o principal fator de virulência desses patógenos. Essa estrutura é induzida em resposta às condições associadas ao hospedeiro como pH7,0, altos níveis de CO₂ e privação de ferro (O' MEARA; ALSPAUGH, 2012). Outros fatores associados a virulência são produção de enzimas hidrolíticas (ex. proteases, nucleases, fosfolipases) que interferem nos mecanismos de defesa do

hospedeiro clivando moléculas do sistema imune de defesa (CASADEVALL; COELHO; ALANIO, 2018).

1.2 Biofilmes

A maioria dos micror-organismos possui a capacidade de formar biofilmes. O biofilme é uma rede complexa de um ou mais espécies de micro-organismos envolvidos por uma matriz polimérica extracelular, constituída de carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos. Essa formação confere algumas vantagens para os micro-organismos, como proteção tanto ao estresse ambiental como ao sistema imune do hospedeiro e uma maior resistência aos fármacos antimicrobianos.

Devido a essas características, os biofilmes potencializam o aparecimento de infecções persistentes no hospedeiro. É o caso dos biofilmes formados por espécies de *Candida* que são a terceira maior causa de infecções relacionadas a uso de cateter (BOUZA, GUINEA, GUEMBE, 2015). Outros dispositivos médicos incluindo próteses articulares, acessos à diálise (Ex: fístulas de hemodiálise, enxertos de hemodiálise, catéteres de diálise), dispositivos cardíacos, dispositivos do sistema nervoso central são susceptíveis a formação de biofilme por *C.albicans*. Após contato desses dispositivos com o hospedeiro, o biofilme se dissemina na corrente sanguínea dando origem a infecção.

A formação dessa comunidade de micro-organismos segue um padrão de formação que inclui uma fase inicial de adesão das células sobre uma superfície, material inerte ou tecido vivo, seguida pela formação de uma colônia. Posteriormente, na fase intermediária, as células começam a secretar substâncias da matriz extracelular. Os componentes da matriz compreendem proteínas, lipídeos (glicerolipídeos e esfingolipídeos), fósforo, ácido urônico e DNA extracelular (GALOCHA et al., 2019). Esses componentes permitem a formação de uma estrutura tridimensional, na fase de maturação. Uma vez formado o biofilme maduro, as células podem disseminar da progênie migrando para outros nichos para dar origem a um novo biofilme, finalizando o ciclo (Fig.1).

Nesse último estágio do ciclo, as células que dispersam do biofilme, embora sejam semelhantes às células planctônicas, possuem características fenotípicas totalmente

distintas. Estas incluem maior capacidade em formar biofilme e aumento das propriedades de adesão (NOBILE; JOHNSON, 2015). A colonização tanto das superfícies abióticas como dos tecidos depende dessa capacidade das células de *Candida* em aderir a essas superfícies. Nas superfícies inertes, a adesão está relacionada a fatores inespecíficos como interação eletrostática entre as células e a superfície, enquanto que nos tecidos a adesão está relacionada a fatores específicos, como interações entre adesinas da parede celular e ligantes específicos nas células epiteliais (MONTEIRO et al., 2015).

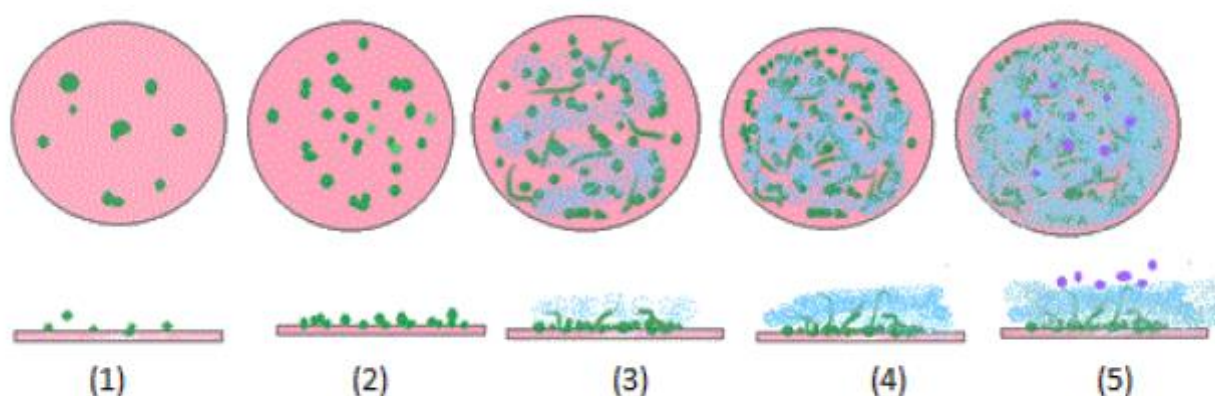


Figura 1. Estágios de formação do biofilme em *C. albicans*: (1) adesão das células (verde) a superfície; (2) formação de microcolônias na camada basal; (3) formação de camadas superiores, com a presença de hifas e produção de matriz extracelular (azul); (4) maturação do biofilme (5) dispersão de esporos (violeta), que atuam como propágulos dando origem a novos biofilmes. Fonte: GU, XU e SUN, 2015.

Como dito anteriormente, os biofilmes são mais tolerantes aos medicamentos antifúngicos, sendo intrinsecamente mais tolerantes ao fluconazol e demais azólicos (SILVA et al., 2017). Uma vez estabelecido, o biofilme pode tolerar concentrações até 1000 vezes maiores que as necessárias para eliminar células planctônicas. As equinocandinas são a única classe de medicamentos eficazes no combate aos biofilmes de *C. albicans* e, portanto, utilizadas como primeira linha de terapia contra as infecções causadas por esses micro-organismos (WALL et al., 2019). O alvo desses antifúngicos são β -1,3 glucanos, um dos principais polissacarídeos que compõe a matriz do biofilme em *C. albicans* (TSUI et al., 2016).

A resistência aos antifúngicos é atribuída principalmente a matriz extracelular, que funciona como uma barreira que protege o biofilme contra o sistema imune do hospedeiro e impede a penetração dos antifúngicos. Os componentes da matriz podem retardar o acesso dos antimicrobianos a tal ponto que as células localizadas profundamente dentro de uma microcolônia escapam da exposição (SILVA et al., 2017). Em *Candida* além da difusão dos fármacos ocorrer de forma mais lenta pode haver também adsorção ou neutralização dos medicamentos (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006).

Um outro importante fator de virulência do biofilme é o sistema “quórum sensing”, um mecanismo de comunicação entre as células que envolve a troca de moléculas. As moléculas quórum sensing mais estudadas em *Candida* são farnesol e tirosol. Essas moléculas regulam a expressão de genes que alteram o fenótipo da célula, o que as torna mais resistentes aos antimicrobianos. Farnesol inibe a transição da forma leveduriforme para filamentosa bem como inibe a formação de tubo germinativo e disseminação das leveduras no estágio final do biofilme. Ao contrário do farnesol, tirosol tem a função de acelerar a transição da forma de leveduras para hifas (MONTEIRO et al., 2015). A forma filamentosa têm maior capacidade de aderir e penetrar nas células epiteliais humanas do que os blastoconídios, sendo portanto, mais invasiva e patogênica (SEBAA; BOUCHERIT-OTMANI; COURTOIS, 2019).

Além das grandes pesquisas desenvolvidas em busca de alternativas para combate ao biofilme formado por *Candida*, algumas estratégias vêm sendo implementadas nos últimos anos na busca de mitigar o problema. Uma das abordagens é chamada terapia de bloqueio, que consiste na erradicação do biofilme em cateteres antes do contato com o paciente. Para isso são utilizadas altas concentrações de medicamentos antifúngicos. Uma desvantagem são os altos custos com medicamentos. Outra técnica utilizada é o uso de nanomateriais (ex. silano) e nanopartículas para o revestimento dos cateteres. Em alguns casos o material impede a adesão das células e consequente formação de biofilmes (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018).

1.3 Mecanismos de resistência a antifúngicos

A resistência aos antifúngicos é considerada quando o fármaco é inativo ou a concentração mínima inibitória (CIM) de determinado composto excede o ponto de corte

de sensibilidade daquele micro-organismo. As diretrizes que estabelecem os padrões para determinar os pontos de corte são CLSI e EUCAST.

Os antifúngicos utilizados na terapêutica contemporânea podem ser divididos de acordo com o seu alvo de ação na célula fúngica em: inibidores da biossíntese do ergosterol (azólicos, derivados morfolínicos e alilaminas); compostos que atuam diretamente sobre o ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana (derivados poliênicos); inibidores da síntese da parede celular (equinocandinas, nicamicina); inibição da síntese de ácidos nucleicos (flucitosina) e inibidores da síntese dos microtúbulos (griseofulvina) (KATHIRAVAN et al., 2012).

A resistência a esses fármacos é intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca não possui relação com a exposição dos micro-organismos aos medicamentos, como por exemplo, a resistência de *C. krusei* ao fluconazol. A resistência adquirida ocorre quando um micro-organismo anteriormente sensível é exposto ao antifúngico durante um período prolongado de tempo. Acredita-se que quase todas as espécies sensíveis de *Candida* são capazes de adquirir resistência quando expostas aos azóis por longo período de tempo.

A presença de resistência em cepas de *Candida* geralmente esta associada não apenas a um, mas a vários fatores que atuam ao mesmo tempo, resultando na expressão da característica de resistência (Fig. 2). Entre as causas descritas para o fenômeno da resistência apresentada por essas cepas estão: pontos de mutação em genes, redução da permeabilidade da membrana e superexpressão de bombas de efluxo. A seguir serão descritos separadamente os mecanismos envolvidos na resistência de leveduras para as principais classes de antifúngicos utilizados atualmente na terapia clínica (azólicos, equinocandinas e polienos).

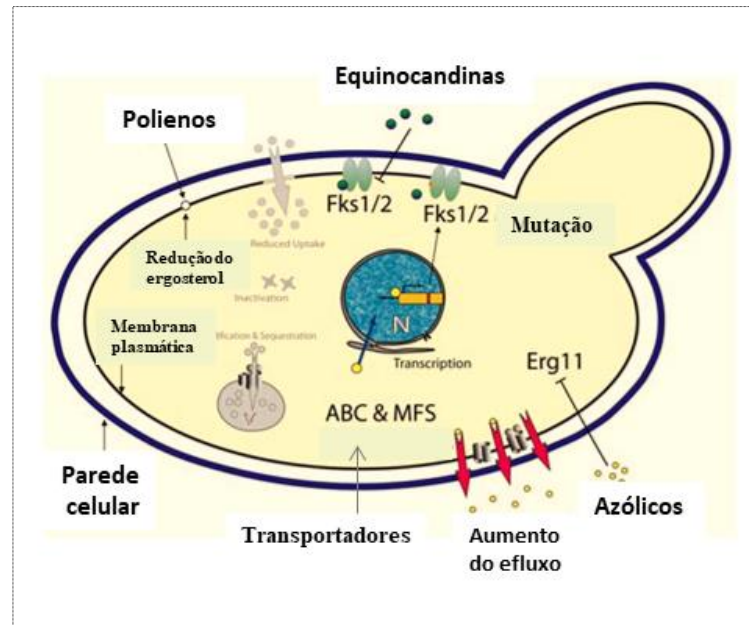


Figura 2. Principais mecanismos de resistência de *Candida* spp. aos fármacos antifúngicos. Fonte: Adaptado de TSCHERNER; SCHWARZMULLER; KUCHLER, 2011.

1.3.1 Resistência aos derivados azólicos

Os derivados azólicos, em especial o fluconazol, são os antifúngicos mais utilizados tanto na profilaxia quanto na terapia de infecções por *Candida* (SULEYMAN; ALANGADEN, 2016). Eles atuam inibindo uma importante enzima na via de biossíntese do ergosterol, a 14 α -lanosterol desmetilase, codificada pelo gene *ERG11*. Pontos de mutações nesse gene causam inibição ou modificação da 14 α -lanosterol desmetilase que resulta na diminuição da afinidade dos azóis com a enzima alvo (ZANG et al., 2019). São conhecidos cerca de 140 pontos de mutação em *ERG11*, no entanto somente alguns mostraram-se associados com a resistência de *C. albicans* a azólicos (DEBNATH, ADDYA, 2014).

A superexpressão nos genes *CDR1* (*Candida Drug Resistant*) e *MDR1* (*Multiple Drug Resistant*) também são características de cepas resistentes. Esses genes codificam, respectivamente, proteínas transportadoras *ATP-binding cassette* (*ABC*) e *major facilitator superfamily* (*MFS*), que são bombas de efluxo responsáveis por “bombear” as drogas para fora da célula, aumentando assim a resistência. Transportadores do tipo *ABC* são *ATPases* e necessitam de *ATP* para realizar o efluxo do seu substrato, enquanto a superfamília *MFS* engloba, entre outros, bombas antiporte de

H⁺ (PRASAD; RAWAL; SHAH, 2016). Bombas de efluxo MFS tendem afetar todos os azóis (PFALLER et al., 2012), enquanto que bombas do tipo ABC são específicas para fluconazol. A superexpressão de CDR2, MDR2, MDRR1 também mostraram estarem fortemente associados com a resistência de *C. albicans* a derivados azólicos.

1.3.2 Resistência as equinocandinas

As equinocandinas são os únicos compostos antifúngicos disponíveis na clínica que atuam sobre a parede celular fúngica. Nessa classe incluem-se os fármacos caspofungina, anidulafungina e micafungina, lipopeptídeos semi-sintéticos derivados dos produtos naturais equinocandina B (*Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*), pneumocandina B0 (*Glarea lozoyensis*) e FR901379 (*Coleophoma empetri*) (HASHIMOTO, 2009).

Esses compostos inibem a síntese do complexo enzimático 1,3-β-glucano sintase (codificado pelos genes FKS), interrompendo a produção de 1,3-β glucanos, um dos principais polímeros que constituem a estrutura da parede celular das leveduras. Esse mecanismo único reduz significativamente a ocorrência de efeitos tóxicos quando do uso da droga, já que age em uma estrutura inexistente nas células do hospedeiro.

O mecanismo de resistência ocorre por mutações nos genes FKS1 e FKS2, que codificam a subunidade catalítica da 1,3-β-glucano sintase. Essas mutações resultam em alteração conformacional da enzima-alvo e diminuição da afinidade das equinocandinas. São conhecidas mutações em duas regiões nucleotídicas específicas, HS1 (*hot spot 1*) e HS2 (*hot spot 2*) (HORI; SHIBUYA, 2018). Na maioria dos casos somente uma das mutações é responsável pelo fenótipo de resistência.

Espécies do complexo *C. parapsilosis* exibem uma baixa sensibilidade intrínseca as equinocandinas, que resulta de um polimorfismo natural (P660A na extremidade 3' do HS1). No entanto, tal polimorfismo tem menos impacto do que os adquiridos por mutações, uma vez que essas espécies, ainda que com CIMs mais elevadas, respondem à terapia com equinocandinas, ao contrário do que ocorre nas mutações adquiridas (SANGLAD, 2016).

1.3.3 Resistência aos polienos

Os poliênicos atualmente em uso clínico são a anfotericina B (AMB), nistatina e natamicina (ASHBEE; GILLEECE, 2014), sendo esses dois últimos de uso

tópico, enquanto AMB é utilizada para tratamento das IFIs. Devido a seu amplo espectro de atividades, AMB têm sido utilizada como referência na clínica por mais de 50 anos. Apesar de sua potente atividade fungicida, seu uso é limitado devido a sua nefrotoxicidade. Atualmente existem formulações lipídicas menos agressivas que embora menos tóxica, ainda apresentam uma frequência de efeitos adversos. Isso inclui reações à infusão, hepatotoxicidade e, dependendo da concentração, mantêm ainda sua nefrotoxicidade.

Devido à sua natureza anfifílica, AMB se liga à bicamada lipídica formando um complexo com o ergosterol, com produção de poros que culminam no extravasamento do conteúdo citoplasmático e lise celular. Embora a resistência natural a anfotericina B seja considerada rara, algumas cepas podem tornar-se resistentes ao longo do tratamento. Tolerância a AMB resulta também em resistência a azólicos, uma vez que a redução de ergosterol pode ocorrer pela inibição da 14α -lanosterol desmetilase, molécula-alvo dos azólicos. Mutações combinadas em ERG11 e ERG3 ou mutações em ERG 2 e ERG6 estão associadas com redução de ergosterol e resistência a AMB em *Candida* spp.

1.4 Peptídeos antimicrobianos como fonte para o desenvolvimento de novos antifúngicos

Uma fonte alternativa de compostos com propriedades antimicrobianas que podem driblar esses mecanismos de defesa das células fúngicas são os peptídeos antimicrobianos (PAMs). Essas moléculas fazem parte do sistema imune inato de vertebrados e invertebrados (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2016), constituindo uma barreira de proteção contra ampla variedade de patógenos (Ex. fungos, bactérias, vírus e parasitas) (RIZZA et al., 2008; PASUPULETI; SCHMIDTCHEN; MALMSTEN, 2011; MALLAPRAGADA; WADHWA; AGRAWAL, 2017).

Os PAMs foram descobertos em 1939, quando foi isolada a bacteriocina gramicidina da cepa de solo *Bacillus* sp. (DUBOS, 1939). Desde então vários peptídeos antimicrobianos já foram descritos em diversos grupos de procariotos (AGEITOS et al., 2017) e eucariotos, tais como moluscos, insetos, crustáceos, plantas, anfíbios, peixes e mamíferos (BRANDENBURG et al., 2012; VILLA et al., 2017). Atualmente, o banco de dados dedicado à Coleção de peptídeos antimicrobianos (CAMP^{R3}) contém 8164

sequências de peptídeos (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/>), a maioria (~74%) encontrado em animais.

Os PAMs podem ser sintetizados pelos organismos de forma natural, através da expressão de genes e síntese ribossomal ou através de processos não-ribossomais, envolvendo enzimas multifuncionais do metabolismo secundário dos organismos conhecidas como peptídeos sintetases não ribossômicas (sigla do inglês NPRSs) (RONCEVIC, PUIZINA e TOSSI, 2019).

1.4.1 Propriedades físico-químicas

A grande diversidade de estruturas primárias dos PAMs descritos dificulta a classificação desses compostos em grupos. No entanto, de acordo com suas estruturas secundárias os peptídeos são classificados de modo geral em quatro famílias: i – α : peptídeos que se estruturam em α - hélice. Ex.: Catelicidina humana LL37 (MOJSOKA; JENSSEN, 2015); ii – β : peptídeos que se estruturam em conformações folha β . Ex.: lactoferrina B; iii – $\alpha\beta$: peptídeos que possuem ambas conformações, α -hélice e folha β , podendo ou não ser estabilizadas por pontes dissulfeto. Ex.: β -defensina humana (HBD-1); iv - não $\alpha\beta$: peptídeos que não possuem nenhuma das estruturas anteriores, normalmente aleatórios. Ex.: indolicina bovina (WANG, 2015).

Os PAMs são moléculas pequenas, possuem entre 10 a 100 resíduos de aminoácidos, são anfipáticos, em sua grande maioria catiônicos, com carga líquida variando entre +2 e +9 e possuem conjuntos de regiões hidrofóbicas (40-60% dos resíduos). A interação com membranas celulares e atividade antimicrobiana dos PAMs depende substancialmente dessas características.

A carga afeta a interação inicial dos PAMs com as membranas lipídicas. PAMs catiônicos são atraídos por ligação eletrostática com a membrana de bactérias e leveduras que possuem carga total negativa. Por outro lado, estudos mostram que aumento da cationicidade acima de certo limite resulta em aumento da capacidade hemolítica e perda da atividade antimicrobiana (RONCEVIC, PUIZINA e TOSSI, 2019).

A hidrofobicidade diz respeito à porcentagem de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos presentes no peptídeo e está relacionada à capacidade do PAM de interagir com e permeabilizar a bicamada lipídica dos micro-organismos. Existe uma relação da hidrofobicidade com a atividade antimicrobiana, semelhante a que ocorre com a carga.

Contudo, estudos apontam que o aumento excessivo do percentual de hidrofobicidade pode também levar a perda do potencial antimicrobiano, além de aumentar a capacidade hemolítica dos PAMs (STREMPEL et al., 2015).

A anfipacidade diz respeito às diferentes regiões hidrofóbicas e hidrofílicas do peptídeo, não apenas na estrutura primária, mas também em sua conformação espacial e em como essas características influenciam nas interações entre os PAMs e os micro-organismos (KUMAR et al., 2018).

1.4.2. Mecanismos de ação

As propriedades físico-químicas dos PAMs que permitem a interação com as membranas dos micro-organismos resultam em três mecanismos de ação de membranolíticos: formação de barril, formação de poro toroidal e modelo tipo tapete (GIULIANE et al., 2010).

Na formação de barril, os PAMs se inserem na bicamada de modo que as regiões hidrofóbicas do peptídeo se ligam a superfície da camada lipídica enquanto que sua face hidrofílica fica exposta, formando a face interior do barril ou poros na membrana. O resultado final é a saída de íons e moléculas pequenas através da membrana plasmática que culminam no extravasamento do conteúdo intracelular. Um exemplo de peptídeo antimicrobiano que induz este tipo de poro é a alameticina, produzido pelo fungo *Trichoderma viride*.

No segundo modelo, de formação de poro toroidal, os PAMs unem-se paralelamente as cabeças polares dos fosfolípidos da membrana e induz a monocamada lipídica superior a dobrar-se, formando poros, cujas paredes são compostas por cabeças de fosfolípidos e regiões hidrofílicas de peptídeos intercalados. A formação dos poros permite a saída de água e os íons da célula, resultando em morte celular. Este tipo de poro é induzido pelas magaininas presente na pele do sapo africano *Xenopus laevis*, melitinas isoladas do veneno de abelha *Apis mellifera* e protegrinas, presentes em leucócitos de porcos.

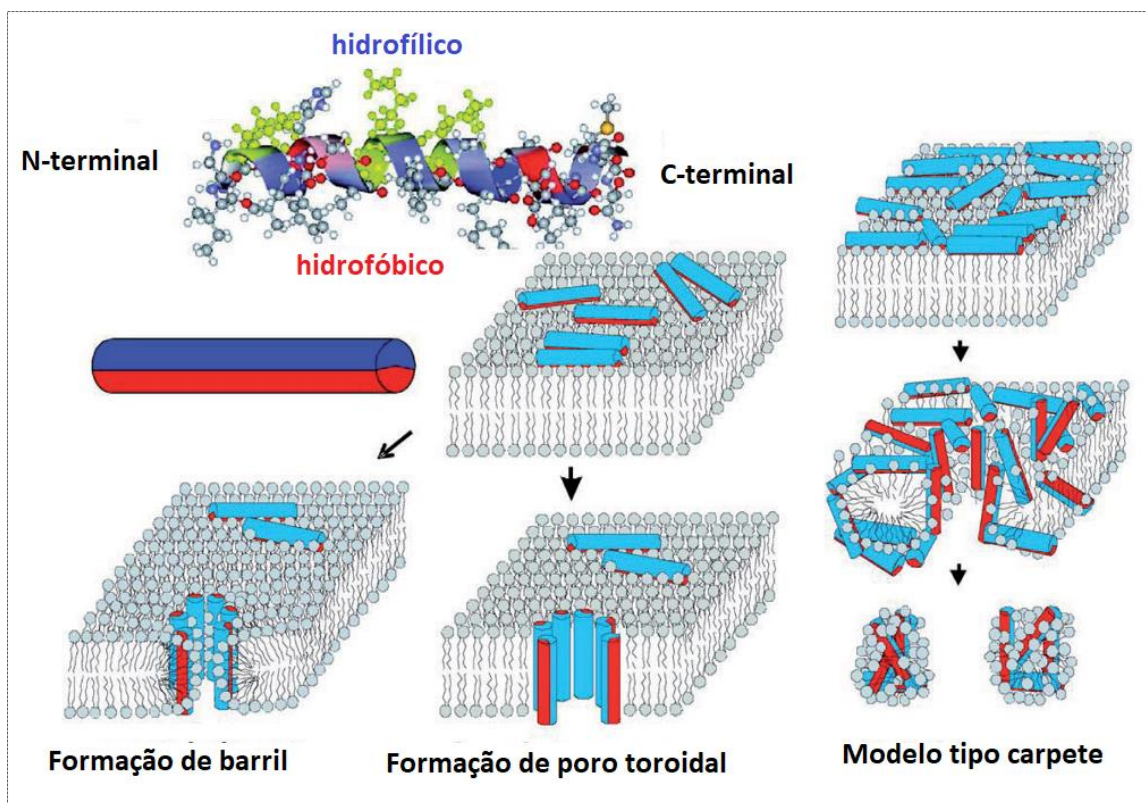


Figura 3. Modelos de mecanismos de ação membranolíticos dos peptídeos antimicrobianos. Fonte: GIULIANI et al., 2008.

No modelo tipo tapete os resíduos carregados positivamente do peptídeo se ligam aos fosfolípídeos da membrana carregados negativamente. Em seguida, o peptídeo se acumula na superfície da membrana plasmática, recobrando-a de forma análoga a um tapete. O resultado final é a desintegração da membrana e formação de micelas, resultando em morte da célula. A ovispirina, encontrada nas células mielóides de ovelhas é um exemplo de peptídeo antimicrobiano com este mecanismo de ação. Após o colapso, os peptídeos formam micelas com os componentes da camada lipídica.

Além desses mecanismos membranolíticos, o efeito dos PAMs pode envolver liberação não lítica de ATP, efluxo de íons potássio e internalização e interação com alvos intracelulares (DNA, RNA e proteína) (BECHINGER; GORR, 2017).

Todos esses modelos de mecanismo de ação de PAMs foram estudados principalmente em células bacterianas. No entanto mecanismos específicos foram observados em estudos com fungos (Fig. 4). A equinocandina e seus análogos sintéticos mencionados anteriormente atuam inibindo a produção de 1,3-glucanos, polímero chave na parede das leveduras.

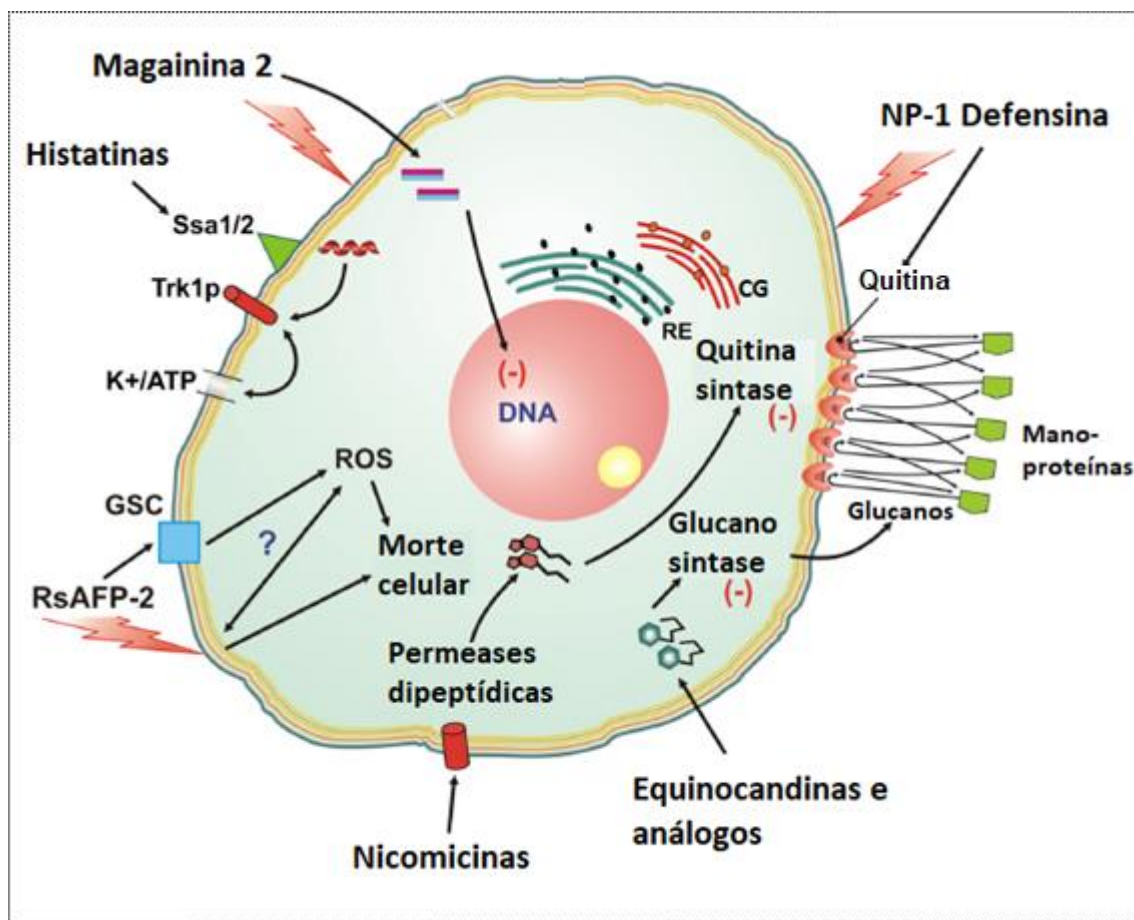


Figura 4- Modelos de ação propostos para AMPs com atividades antifúngicos. Fonte: Adaptado de MATEJUK et al., 2010.

A defensina NP-1 se liga firmemente à quitina na parede celular e isso pode ser importante mediando a lise seletiva da membrana. Ausente nos vertebrados, a quitina é um componente da parede celular essencial para manter a integridade estrutural do fungo. As nicomicinas, produzida por *Streptomyces tendae* e *S. ansochromogenes*, também atuam inibindo a biossíntese da quitina. A quitina sintase é a enzima que cataliza a formação de quitina através da transferência de N-acetilglucosamina da uridina difosfato de N-acetilglucosamina para crescimento da cadeia de β -1,4-N-acetilglucosamina. As nicomicinas são análogos da N-acetilglucosamina da uridina difosfato de N-acetilglucosamina, portanto inibidores competitivos da enzima quitina sintase. Esses compostos são capazes de inibir a síntese de quitina em *C. albicans*, tanto in vitro quanto in vivo.

As histatinas, classe de peptídeos catiônicos ricos em histidina encontrados na saliva de mamíferos, possuem promissora atividade antifúngica contra fungos resistentes a AMB e zóis, incluindo *Candida spp* e *Cryptococcus neoformans*. Esses AMPs, se ligam a proteínas Ssa1/2 de superfície da parede celular do fungo, são internalizados e têm como provável alvo intracelular primário o transportador de potássio Trk1p. Esse transportador, além de ser responsável pela absorção de potássio pode estar relacionado com o efluxo de cloreto. Logo as propriedades fungicidas das histatinas podem estar relacionadas com a perda de íons citoplasmáticos como ATP de K⁺. Outros estudos apontam para um mecanismo menos comum, no qual histatina 5 transloca-se através da membrana e atua inibindo a polaridade da membrana mitocondrial em leveduras (PURI; EDGERTON, 2014).

Um derivado de histatina 5, o PAC-113, está entre os fármacos antifúngicos derivados de peptídeos em estudos clínicos atuais (Tabela 1). Esse composto além de causar ruptura de membrana também possui ação imunomodulatória, produzindo espécies reativas de oxigênio após interações com mitocôndrias fúngicas e provocando alterações na produção de citocinas (NICOLA et al., 2018). Todos os demais compostos apresentados na tabela 1 são catiônicos e atuam também causando ruptura da membrana com exceção de CZEN-002, que atua por imunomodulação, com supressão da produção de TNF- α . Além disso, causa acúmulo de cAMP em *C. albicans*, interrompendo vias de sinalização essenciais para a célula (KOO; SEO, 2019).

Tabela 1- Peptídeos antifúngicos utilizados em ensaios clínicos.

Peptídeos	Descrição (Fabricante)	Indicação	Clínico
PAC-113 (P-113)	AMP derivado da histatina 5 encontrada na saliva humana (Pacgen)	Candidíase oral em pacientes soropositivos	Fase II
NP213 (Novexatina)	Peptídeo catiônico cíclico (Novabióticos)	Infecções fúngicas nas unhas causadas por fungos dermatofíticos e não dermatofíticos	Fase IIb
VL-2397 (ASP2397)	Hexapeptídeo cíclico que quela íons de alumínio (Vical)	Infecções fúngicas invasivas especialmente aspergillosis	Fase II iniciada recentemente

CZEN-002	Ocatapeptídeo sintético derivado de alfa melanócitos-hormônio estimulante (Zengen)	Vulvovaginitis causadas por <i>C. albicans</i>	Fase IIb
NP339	Peptídeo catiônico baseado na poliarginina (Novabiótico)	Tratamento tópico para infecções por <i>Candida</i> spp. e <i>Aspergillus</i> spp.	Fase pré-clínica

Fonte: Adaptado de NICOLA et al., 2018

1.4.3 Crotalicidinas

Diante da grande variedade de estruturas e mecanismos apresentados pelos PAMs, novas moléculas vêm sendo isoladas e sintetizadas. A crotalicidina (Ctn), um peptídeo alfa-helicoidal linear de 34 resíduos que pertence ao grupo de viperidinas da família *cathelidina* de peptídeos antimicrobianos de vertebrados, foi isolada a partir da glândula de veneno da cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus* e sua atividade antiproliferativa foi demonstrada in vitro contra bactérias (FALCAO et al., 2014). A atividade contra os protozoários tripanossomatídeos também foi demonstrada pelo Ctn e seu congêneres altamente conservado, batroxidina, que difere do Ctn por oito resíduos de aminoácidos não críticos (MELO et al., 2017; BANDEIRA et al., 2017).

O Ctn foi dividido estruturalmente em dois fragmentos, Ctn N-terminal N de 14 resíduos e o Ctn C-terminal de 20 resíduos [15-34], este último mantendo a maior parte da atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e algumas linhas de células tumorais (FALCAO et al., 2015) (Fig. 5). Além disso, o Ctn [15-34] também foi eficaz in vitro como antiviral contra o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV), um vírus de RNA que afeta as fazendas de camarão (VIEIRA-GIRAO et al., 2017). As propriedades antifúngicas desses peptídeos também foram recentemente demonstradas contra cepas de leveduras e dermatófitos suscetíveis a AMB (CAVALCANTE et al., 2017),

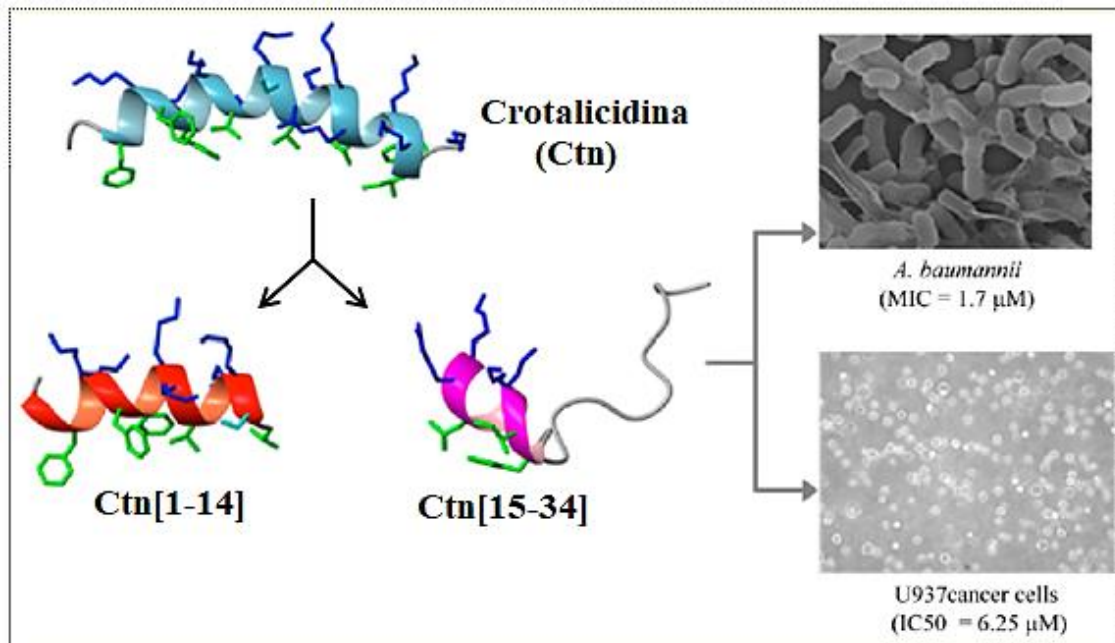


Figura 5. Estrutura secundária do peptídeo Crotalicidina (Ctn) e seus fragmentos Ctn[1-14] e Ctn[15-34]. Destaque para as atividades biológicas do Ctn[15-34]. Fonte: FALÇÃO et al. (2015)

Em bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, o mecanismo de ação do Ctn [15-34] depende de perturbação da membrana, internalização citoplasmática e interação com ácidos nucleicos (PEREZ-PEINADO et al. 2018). Em *Candida*, mecanismo de ação de Ctn [15-34] demonstrou envolver a ruptura da membrana e indução de apoptose precoce e tardia necrose (CAVALCANTE et al., 2018).

1.5 Estrutura e organização das membranas biológicas

As membranas biológicas são estruturas fluídas e dinâmicas formadas por uma bicamada de moléculas lipídicas anfipáticas, com as caudas hidrofóbicas interagindo entre si e as regiões hidrofílicas voltadas para o meio aquoso intracelular e extracelular. Três grupos de lipídios são encontrados nas membranas celulares: os fosfolipídeos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, etc), os glicolipídeos e os esteróis (colesterol, ergosterol) (Fig. 6), sendo os fosfolipídeos os compostos lipídicos mais abundantes nas biomembranas (WATSON, 2015). Além dos lipídeos, alguns açúcares e diversas proteínas encontram-se mergulhadas na bicamada lipídica, desempenhando um papel-chave na estrutura e função dessas membranas.

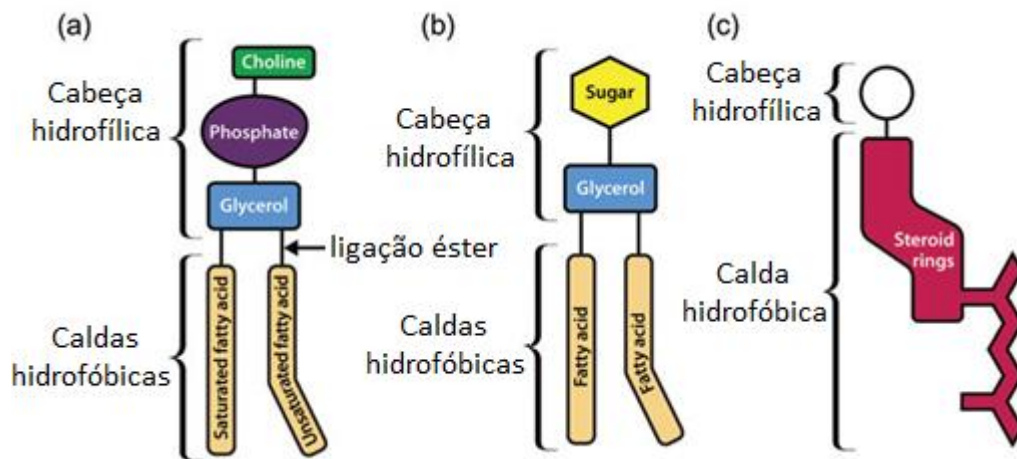


Figura 6. Representações de três tipos de lipídios de membrana. a) Fosfatidilcolina. b) Glicolípido. c) Esterol. Fonte: WATSON, 2015.

O modelo atualmente aceito da estrutura da membrana plasmática foi proposto em 1972, por Singer e Nicholson. Trata-se do modelo do mosaico fluído, que descreve a natureza fluída das membranas biológicas, onde os fosfolípideos dispõem-se lado a lado e conseguem deslocar-se sem perder o contato um com os outros. Nesse modelo as proteínas estão inseridas em cada um dos lados da bicamada ou a atravessam completamente, funcionando como canais entre os meios interno e externo da célula.

A função primária da membrana plasmática é conferir proteção para as células, mantendo uma barreira entre o interior de uma célula e o ambiente extracelular. Embora funcionem como uma barreira, as membranas não são impermeáveis e permitem que determinadas substâncias entrem na célula enquanto excretam outras de seu interior, através de canais iônicos ou receptores específicos. Dependendo do organismo podem servir de base de ligação ao citoesqueleto ou para a parede celular, ajudando a célula a se sustentar e manter a forma e permitem que as células se comuniquem umas com as outras, compartilhando informações.

Nos fungos, além da membrana plasmática existe também uma estrutura externa protetora denominada parede celular, que difere quimicamente da parede celular presente nas plantas, ainda que possa exercer as mesmas funções. A parede celular que além de conferir proteção física contra o ambiente, também determina o formato da célula, fornece suporte osmótico e está relacionada com eventos de sinalização celular, adesão e divisão.

A composição química, estrutura e dimensão da parede celular variam consideravelmente, dependendo das condições ambientais e/ou de cultivo laboratorial e essa formação é coordenada com o ciclo celular. Em condições normais de desenvolvimento, a estrutura da parede celular é baseada na parede já existente nas células progenitoras, que são estendidas e remodeladas. Neste caso, ela serve como um arcabouço para a incorporação de novos materiais dentro dos pontos de crescimento.

Em *C. albicans*, a camada mais externa da parede é formada por ligações de polímeros de manose ligados covalentemente a proteínas formando as glicoproteínas, enquanto a camada interna contém polissacarídeos como glucanas e quitina, que conferem rigidez e formato à célula (Fig. 7).

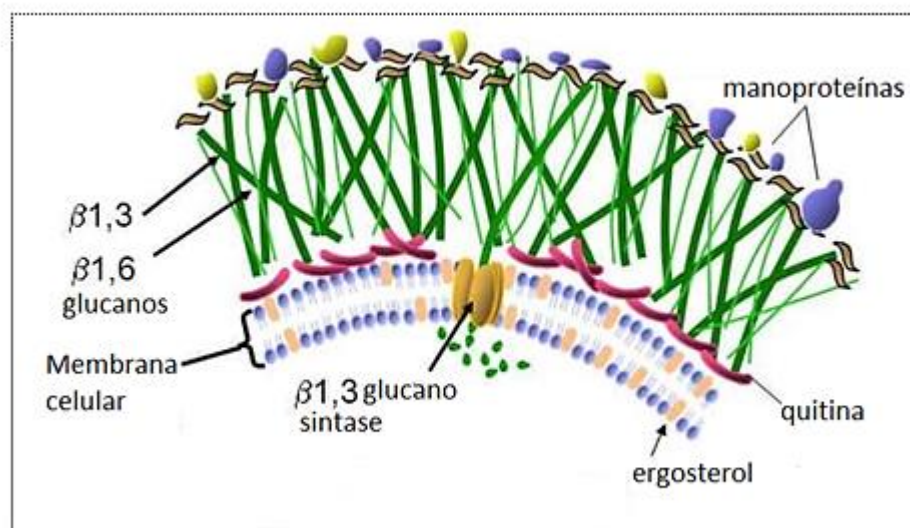


Figura 7. Estrutura da membrana e parede celular fúngica. Fonte: Adaptado de KARTSONIS, NIELSEN, DOUGLAS, 2003.

A diferenciação entre as membranas de fungos e do hospedeiro ocorre principalmente devido a diferença de esterol, com a presença de ergosterol nas membranas fúngicas ao invés de colesterol, presente nas membranas de eucariotos complexos. Outros compostos que a diferenciam da célula do hospedeiro é a presença de quitina e glucanos (Fig. 7).

A proporção de lipídeos na membrana dos fungos varia de espécime para espécime. Estudos apontam diferenças nas concentrações de lipídeos em cepas de *C. albicans* resistentes e sensíveis a fluconazol (LOFFLER et al., 2000). De modo geral, a maioria dos lipídeos que compõe a membrana citoplasmática desses micro-organismos

são zwitteriônicos, como fosfatidilcolina, fosfolípido mais abundante nesses microorganismos. Outra parcela são de lipídeos aniônicos como a fosfatidilserina, segundo fosfolípido mais abundante nas leveduras, seguida do fosfatidilinositol.

Devido à complexidade das membranas plasmáticas fúngicas, os estudos de interação peptídeo-membrana vêm sendo realizados com modelos de membranas mais simples, em sistemas mais controlados, compostos por diferentes composições lipídicas que mimetizem a composição original das membranas microbianas (Ex. monocamadas de Langmuir, lipossomas e bicamadas com suporte sólido). Dentre estes destacam-se os lipossomas ou vesículas lipídicas que além de servirem de modelos para estudos de interação de drogas com membranas biológicas também podem ser utilizados como carreadores de fármacos, a exemplo da anfotericina lipossomada (AmBisome®), utilizada para tratamento de candidemias e outras candidosis invasivas (BULBAKE et al., 2017).

Os lipossomas podem ser obtidos por diversos métodos e podem variar em tamanho de dezenas de nanômetros como as SUVs (< 100nm), a 1000nm como as LUVs (100-1000 nm) ou ainda até a escala de microns, como as GUVs (>1-100µm) (HASAN; MECHLER, 2017). Diversos estudos utilizam as LUVs como modelo de membrana biológica porque essas vesículas possibilitam a obtenção de dados quantitativos da associação lipídeo/peptídeo em uma solução para decifrar o mecanismo antimicrobiano dos peptídeos (MANZINI et al., 2014; OLIVA et al., 2019).

2. JUSTIFICATIVA

O aumento e as complicações causadas pelas infecções fúngicas invasivas ocorrem pelo crescente surgimento de leveduras resistentes aos fármacos de uso convencional, à toxicidade apresentada por alguns medicamentos e a emergência de cepas patogênicas. Esses fatores associados aumentam a mortalidade e morbidade dos pacientes além de elevar os custos com tratamento. Diante desse cenário existe a necessidade de medicamentos mais eficazes e seletivos.

A capacidade que os PAMs possuem de interagir com determinadas membranas celulares e, dessa forma, exibirem uma eficiente atividade antimicrobiana contra determinados agentes patogênicos, além do amplo espectro de atividades frente vários organismos é que tem motivado, nos últimos anos, um grande interesse em se estudar esse grupo de proteínas (KANG et al., 2014).

Para a evolução e sobrevivência em um ambiente dominado por milhares de espécies de micro-organismos, todos os organismos necessitam expressar PAMs em seus tecidos e células, incluindo os animais desde os artrópodes a humanos são ‘equipados’ com tais peptídeos (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2008). Portanto, quanto maior a biodiversidade de um território, maior a possibilidade de descoberta de estruturas moleculares e atividades biológicas e farmacológicas.

Nesse contexto, os venenos animais constituem fontes valiosas de polipeptídios biologicamente ativos, sendo que esses últimos podem servir como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos ou serem usados como insumos diagnósticos (FOX; SERRANO, 2007).

As crotalicidinas, catelecidinas isoladas a partir da glândula de venenos da serpente sul-americana *Crotalus durissus terrificus*, tem apresentado atividade antimicrobiana contra diversos patógenos, como bactérias, vírus, protozoários e leveduras. Estudos anteriores caracterizaram a atividade desses compostos frente espécies de *Candida*, principalmente o fragmento Ctn[15-34]. No entanto são necessários estudos sobre as bases de seu mecanismo de ação e como esses compostos atuam sobre cepas resistentes e biofilme, características muito comuns nesses micro-organismos patogênicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Investigar o potencial antifúngico e mecanismo de ação das crotalícidinas contra leveduras resistentes e biofilme de *C. albicans*.

3.2 Objetivos específicos

- Testar a atividade antifúngica dos peptídeos frente *C. albicans* e *Cryptococcus* spp.;
- Determinar a curva de viabilidade celular de cepas de leveduras resistentes tratadas com crotalícidinas;
- Investigar a atividade do peptídeo sobre a formação e inibição do biofilme de *C. albicans* utilizando microscopia confocal e AFM.
- Determinar o perfil de expressão gênica da cepa de *C. albicans* sensível e resistente ao fluconazol frente a ação do Ctn[15-34] e do derivado azólico após atividade antifúngica *in vitro*, comprovada.
- Estudar a interação do Ctn[15-34] com células de *C. albicans* e com lipossomas que mimetizam membranas de leveduras e dos seus hospedeiros;
- Avaliar o efeito do Ctn[15-34] no tamanho e carga das vesículas através do estudo do potencial zeta e da dinâmica de dispersão de luz (DLS);

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Peptídeos

Ctn, Ctn[1-14] e Ctn[15-34] foram sintetizados por síntese orgânica em fase sólida. Após a síntese, os peptídeos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com grau de pureza de >95% e, em seguida caracterizados por espectrometria de massas (FALCÃO et al., 2015).

4.2 Micro-organismos

Os isolados clínicos de *Candida albicans* e *Cryptococcus laurentii* utilizados nesse estudo foram cedidos pelo Hospital de Santa Casa de Misericórdia de Sobral (Ceará, Brasil) e os isolados de *Cryptococcus neoformans* foram cedidos pelo Hospital São José, em Fortaleza (Ceará). A identificação das espécies de *C. albicans* foi realizada com o uso de CHROMagar-Candida (CHROMagar Company), sistema automatizado VITEK 2 (bioMe'rieux) com cartão YST, e identificação por PCR-AGE usando a região do espaço interno transcrito (ITS). As cepas identificadas fazem parte do projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Número do Parecer: 644.365 - Data da Relatoria: 23/04/2014.

4.3 Preparação do inóculo para os testes de susceptibilidade antifúngica

As cepas de leveduras foram cultivadas em placas de ágar Sabouraud dextrose (SDA) a 35° C durante 24 h. As colônias dos micro-organismos foram diluídas em PBS para obter uma turbidez equivalente à escala 0,5 do padrão McFarland (2×10^6 UFC.ml⁻¹). Essa suspensão foi diluída de 1:2 ($2.5 - 5 \times 10^3$ UFC.ml⁻¹) em meio RPMI 1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado para pH 7,0 com ácido morfolinopropanosulfônico 0,165 M (MOPS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo).

4.4 Teste de microdiluição em caldo

A concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos frente as cepas de leveduras seguiu o método de 96 poços proposto pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (antigo NCCLS; M27-A3). Para a solução stock, os peptídeos foram diluídos na concentração de 1mM em água deionizada estéril. A partir dessa solução foram feitas diluições seriadas em meio RPMI 1640 (Sigma) na concentração de 0,02 e 40 µM. Por último, 100 µL do inóculo foi adicionado as placas. Os antifúngicos

fluconazol e amfotericina B foram utilizados como controle antimicótico nas concentrações de 0,06-64 e 0,015-16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. As placas foram incubadas a 35°C por 24h para *C. albicans* e 48h para *Cryptococcus* spp. A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visual dos microorganismos. O experimento foi realizado em triplicata.

4.5 Atividade modulatória pelo método de *Checkerboard*

O efeito de Ctn [15-34] combinado com FLC foi determinado pelo método *checkerboard*, que utiliza o cálculo do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) para quantificar a interação entre as drogas. A turbidez das suspensões fúngicas foi ajustada para 0,5 da escala McFarland ($\sim 10^6$ CFU.ml⁻¹). Inicialmente foram realizadas diluições seriadas dos peptídeos em 50 μl de meio RPMI 1640 num intervalo de concentração entre 0,0195 - 40 μM . Em seguida, foram adicionados 50 μl de fluconazol nas diferentes concentrações (0,195 - 200 μM). Por último, 100 μl do inóculo foram adicionados aos poços. Células tratadas com o peptídeo e fluconazol individualmente foram utilizadas como controle. Foi utilizado também um controle não tratado.

As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h para cepas de *C. albicans* e 48 h para *Cryptococcus* spp. O FICI foi calculado somando o $\text{FIC}^{\text{P}} + \text{FIC}^{\text{F}}$, onde P representa o peptídeo e F o fluconazol. O FIC^{P} foi calculado com o CIM^{P} combinado/ CIM^{P} individual, enquanto que o FIC^{F} foi calculado CIM^{F} combinado/ CIM^{F} individual. Sinergismo foi definido como $\text{FICI} \leq 0,5$, efeito indiferente (aditivo) quando $0,5 < \text{FICI} \leq 4,0$, e antagonismo quando $\text{FICI} > 4,0$ (ODDS, 2003).

4.6 Ensaio da Curva do tempo de morte

A cinética do tempo de morte foi determinada frente a cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 90028) e os isolados clínicos de *C. albicans* LABMIC 0125 e *C. neoformans* (LABMIC 0405). Em placas de 96 poços, as suspensões de levedura, diluídas em meio RPMI-1640 com MOPS a 2%, foram tratadas com FLC, AMB e Ctn [15-34] em concentrações inibitórias e sub-inibitórias. Além disso, foi adicionado a concentração da combinação mínima inibitória do FLC e Ctn [15-34]. As placas foram incubadas (35 °C; 200 rpm), e alíquotas de 100 μl foram removidas no tempos predeterminados de 0, 4, 8, 10, 12 e 24 h. As alíquotas foram diluídas em série (10 vezes) em solução salina e semeadas em placas SDA. Os números de colônias foram contados após a incubação das

placas a 35 ° C por 24 h para *C. albicans* e 48 h para *Cryptococcus* spp. Paralelamente ao tempo de morte foram retiradas alíquotas de 2 µL de cada um dos tratamentos e adicionadas na superfície placas com SDA e, uma vez que as alíquotas foram secas as placas foram incubadas a 35°C por 48h. As colônias de fungos foram então fotografadas para observar sua morfologia e tamanho após a exposição ao peptídeo e aos medicamentos antifúngicos (KWOLEK-MIREK; ZADRAG-TECZA, 2014).

4.7 Viabilidade celular com BactiterGlo

Após a determinação das CIMs, Ctn [15-34] e FLC foram incubados novamente com a ATCC90028 e os isolados resistentes de *C.neoformans* (LABMIC 0405) e *C. albicans* (ATCC 0125). Em placas de microdiluição de 96 poços, foram adicionados 25 µl de suspensões de levedura contendo 2×10^6 ufc/mL (equivalente a 0,5 na escala de McFarland) a 25 µl do peptídeo e antifúngicos, com concentrações finais variando de 2,5 a 40 µM, e FLC em concentrações finais variando de 0,5 a 25 µM para cada cepa testada. Foi realizado o tratamento na concentração da combinação inibitória mínima determinada anteriormente pelo método do checkerboard. Após 48h de incubação a 30 °C, foram adicionados 50 µl do reagente BacTiter-Glo™ (Promega, Madison, WI) a cada poço e as placas foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente, sob agitação suave. A luminescência foi então medida no leitor de microplacas de detecção múltipla Synergy HT (Biotek, Winooski, VT). Utilizou-se suspensões de levedura sem tratamento como controles positivos (100% viabilidade) e poços contendo apenas meio RPMI 1640 para obter e subtrair valores de luminescência do meio. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.8 Perfil de expressão gênica em *C. albicans*

4.8.1 Extração de RNA total

Para avaliar diferenças no perfil de expressão de genes de *C.albicans* foram utilizadas uma cepa sensível e outra resistente a fluconazol. As cepas foram tratadas com 0,5xCIM do peptídeo e do fluconazol por 4h. Inicialmente, RNA total foi extraído a partir dos inóculos cultivados *overnight* a 37°C em caldo sabouraud. Após o cultivo, células entre 10^6 - 10^7 UFC.ml⁻¹ foram centrifugadas para remoção do meio de cultivo e o *pellet* ressuspenso em 80 µl do tampão de digestão. Foi então adicionado 5µl da enzima zimolase aos tubos e incubados a 37°C por 60min. Em seguida foi realizada a purificação

do RNA utilizando a cromatografia em colunas de sílica do kit de purificação RiboPure™-Yeast Kit (Life Technologies, USA). As amostras foram quantificadas utilizando o kit Qubit de RNA HS (Invitrogen).

4.8.2 Síntese de cDNA

Para a síntese de DNA complementar (cDNA), aproximadamente 1 µg de cada amostra de RNA total tratada com DNase I foi misturada com 500 ng de iniciadores aleatórios (Promega, Madison, WI, EUA) em um volume final de 10 µl. A mistura foi aquecida em termociclador a 70 ° C por 10 min e resfriado a 4 ° C.

Para completar a mistura de reação da transcriptase reversa, os seguintes componentes foram misturados com o RNA desnaturado em um volume final de 20 µl: 100 U da enzima transcriptase GoScript (Promega, Madison, WI, EUA), 1 mM de cada trifosfato de desoxinucleósido, MgSO₄ 2 mM, ditioneitol 1 mM e 20 U de inibidor de RNase. A mistura foi incubada a 42 ° C por 60 min e depois a 70 ° C por 15min para inativar a transcriptase reversa. O cDNA foi diluído dez vezes com TE (10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético) e alíquotas de 2 µl foram usadas para os experimentos de PCR em tempo real relativo e quantitativo (qPCR).

4.8.3 Análise do perfil de expressão gênica por RT-qPCR de *C. albicans*

A expressão dos genes relacionados à resistência e suscetibilidade de *C. albicans* frente ao Ctn[15-34] e fluconazol foi conduzida empregando a análise quantitativa relativa por qPCR. Logo após a síntese de cDNA fita simples, os genes em estudo foram amplificados em um único passo utilizando o sistema GoTaq 1-Step RT-qPCR System (Promega, USA). A tabela 2, a seguir, sumariza os genes que foram quantificados. Os genes clonados e mantidos em nosso laboratório, foram diluídos serialmente (com um fator de 10) para estabelecer curvas padrão para qPCR.

Tabela 2. Genes selecionados para o estudo de expressão de resistência versus susceptibilidade em *Candida* spp.

Gene	Gene number*	Primers Seq
ACT1	CAGL0K12694g	F: TTGGACTCTGGTGACGGTGTTA R: AAAATAGCGTGTGGCAAAGAGAA
CDR1	CAGL0M01760g	F: AGATGTGTTGGTTCTGTCTCAAAGAC

		R: CCGGAATACATTGACAAACCAAG
PGK1	CAGL0A00429g	F: CAAACGGTGAAAGAAACGAGAA R: CCGACACAGTCGTTCAAGAAAG
CYP1 (Set3)	gi 68470078	F:TCCCACAATTCATGCTTCAAGGTGGTGATT R: TGGACCAGCATTGGCCATAGACAACAAA
ERG4	CAGL0A00429g	F: CCCTCAATTAGGTGTCGTCATGT R: GGCACGATTAATTCTTCACCCTTA
ERG 10	CAGL0L12364g	F: GCCAGAACCCCAATTGGTT R: TGCAATGACACCTAGGTCAACAG
HSP90	>gi 994797:671-2794	F:AAGCTCAAGCTTTGAGAGACACCACCATGT R:ACGGTCTTGTCTTCAGCTCCATCGGTTTCA
HSP90 (Set3)	>gi 994797:671-2794	F: ACGAACCATCCAACCTTTGCCACAGAA R CAGCTGGTTCGTCAGTTGAGGCAGTAGTA:

*Genolevures: Yeast Genomes [www.genolevures.org/yeastgenomes.html]; gi: gene identifier of GenBank (NCBI); Todos os primers foram conforme publicados em Li et al. BMC Molecular Biology 2012, 13:22, exceto os oligonucleotídeos para CYP1 e HSP90

As séries de curvas-padrão foram realizadas em triplicatas. O gene de referência (*ACT1*) também está relacionado na tabela 2. As reações de qPCR e análise preliminar foram realizados utilizando o equipamento Rotor-Gene 3000, operado com o seu respectivo software versão 6.0.19 (Corbett Research, Mortlake, Austrália). As condições de amplificação foram basicamente 95°C por 30 s, 50°C por 30 s, 72°C por 30 s, no total de 45 ciclos. Curvas de “melting” seguidas das reações de qPCR foram obtidas. A fluorescência foi adquirida em 494-521 nm durante a fase de extensão.

4.8.4 Eletroforese em Gel de Agarose

Na fase inicial da padronização das reações de PCR, o produto das reações foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com brometo de etídio para validação dos primers utilizados. Uma segunda eletroforese foi realizada com os produtos de amplificação submetidos a purificação para confirmação da amplificação de um produto único, de tamanho definido e ausência de formação de produtos inespecíficos.

4.8.5 Análise estatística dos dados de qPCR

Para quantificar os níveis de expressão dos genes em estudo, o número de cópias de cada gene foi calculado de acordo com a equação: $n^{\circ} \text{ cópias} = [\text{quantidade de DNA (ng)} \times 6,022 \times 10^{23}] / [\text{Comprimento DNA (nt)} \times 1 \times 10^9 \times 650]$. Assim, por exemplo, 1 μg de cDNA de β -actina – *ACT1* (1131 pb) contém $8,19 \times 10^{11}$ moléculas. O “ponto de limiar” dos ciclos (Ct) foi determinado automaticamente pelo software Rotor Gene 6.0.19, usando parâmetros padrão. As eficiências foram calculadas a partir dos valores de inclinação (k) das curvas na fase exponencial da qPCR, dadas diretamente pelo software de análise (a saber: $E = 10^{-(1/k) - 1}$), onde k = coeficiente angular da curva. A linearidade foi expressa como quadrado do coeficiente de correlação de Pearson (r^2). Todas as medições foram obtidas como a média de pelo menos nove medições \pm desvio padrão (menos de 5% de erro). Para a normalização dos números de cópias dos genes expressos, o número médio de cópias de transcritos do gene de referência em cada amostra, equivalente a 1 μg de RNA do(s) gene(s) de referência foram determinados, e os resultados expressos como logaritmo do número de cópias. A análise estatística será realizada com software BioStat 5.0 (Ayres et al., 2007) ou GraphPad v6, utilizando-se ANOVA. Alternativamente, o método de Pfaffl (Pfaffl, 2001), para a análise relativa da expressão (RE) gênica poderá ser empregada de acordo com a seguinte equação: $RE = \frac{E_{\text{tratado}}^{\Delta Ct \text{ tratado (controle-tratado)}}}{E_{\text{referência}}^{\Delta Ct \text{ referência (controle-tratado)}}$.

4.9 Atividade antibiofilme de Ctn[15-34] frente a *C. albicans*

4.9.1 Preparação da cultura para os ensaios antibiofilme

Para os ensaios antibiofilme foram utilizadas uma cepa selvagem de *C. albicans* (ATCC 90028) e um isolado clínico (LABMIC 0125). Células em stock foram inoculadas em placas de ágar sabouraud glucose 4% (Sigma) e incubadas por 24h a 35°C. Uma colônia foi cultivada *overnight* em caldo sabouraud dextrose (Sigma) e incubadas a 35°C com agitação a 180 rpm. 100 μL da cultura overnight foram diluídos em 5mL de caldo sabouraud dextrose e incubados por 3h sob agitação a 35°C. A concentração das células foi mensurada pela densidade óptica a 660 nm.

4.9.2 Formação do biofilme

Para a formação de biofilme foi utilizado o RPMI 1640 com glicose a 2% e MOPS a 165 mM. Nesse ensaio foram utilizadas uma cepa selvagem de *C. albicans* (ATCC 90028) e um isolado clínico *C. albicans* (LABMIC 0125). O inóculo foi preparado como descrito acima nas seguintes concentrações: 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 ufc.ml⁻¹. 100 µl das suspensões de células de cada concentração foram colocados em placas de 96 poços de poliestireno/polipropileno com fundo redondo. Para evitar a evaporação das amostras, 100 µl de meio RPMI foram colocados ao redor de toda a placa. As placas foram incubadas por 12, 24, 48, 72 e 96 h a 37°C com agitação a 180 rpm. No final de cada período de incubação, o biofilme foi lavado três vezes com PBS 1x (pH 7,4) para remover células planctônicas. 100 µL de XTT-menadiona foram adicionados aos poços de cada placa e incubados no escuro por 2 h a 37 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para uma nova placa e a densidade óptica medida a 490 nm (PIERCE et al., 2008). O método tem como princípio a redução enzimática do substrato XTT em cristais de formazana, pelo metabolismo de células viáveis. A formazana é solúvel em água e gera uma coloração laranja intensa, que permite a leitura por densidade óptica. A menadiona é utilizada como um agente aclopador de elétrons para acelerar a reação.

4.9.3 Erradicação e inibição do biofilme por microscopia confocal

Para a inibição do biofilme, 300µL de cada uma das células diluídas em RPMI com glucose 2% foram tratadas com CIM, 10xCIM e 100xCIM do Ctn [15-34]. A concentração e o tempo de incubação das células foram determinados pelo ensaio de formação descrito acima. Foram utilizadas as placas de cultivo com 8 poços (ibid). Na erradicação, logo após o biofilme formado foram adicionados o peptídeo na concentração da CIM, 10xCIM e 100xCIM. Após os tratamentos, as placas foram incubadas por 24h. Todas as placas foram lavadas 10x com HEPES estéril filtrado. O Kit *Live/Dead FungaLight Yeast Viability* (Invitrogen) foi utilizado. Foram adicionado 2 ul dos marcadores SYTO 9 e Iodeto de propídeo em todas as placas e, em seguida, realizada a análise por microscopia confocal. A objetiva utilizada foi uma lente 40x com imersão em óleo. Para SYTO 9 foi utilizado a excitação a 480 nm e emissão em 500 nm, enquanto que para o iodeto de propídeo, a excitação foi de 490 nm e emissão em 635nm. As imagens foram processadas e analisadas com o software ImageJ.

4.9.4 Análise morfológica do biofilme de *C.albicans* utilizando AFM

Os biofilmes de *C. albicans* foram preparados como descrito para ensaios em Microscopia Confocal. Após tratamento do biofilme com e sem peptídeo, a massa celular foi cuidadosamente lavada com água milli-Q e seca ao ar a 25 °C. Imagens de leveduras não tratadas e tratadas foram conduzidas usando um JPK NanoWizard IV (Berlim, Alemanha) montado em um microscópio Zeiss Axiovert 200 invertido (Jena, Alemanha). As medições foram realizadas no modo de contato intermitente (ar) usando cantilevers de silício ACL (AppNano, Huntingdon, Reino Unido). As imagens de altura e erro foram gravadas com valores de parâmetros AFM semelhantes (ponto de ajuste, taxa de varredura e ganho). A taxa de varredura foi ajustada entre 0,3 e 0,6 Hz e o ponto de ajuste próximo a 0,3 V. As imagens foram analisadas com o software de processamento de imagem JPK v. 6.1.149.

4.10 Estudos do mecanismo de ação de Ctn [15-34] em *C. albicans*

Nos ensaios a seguir foram utilizados somente o fragmento Ctn [15-34] para elucidação dos mecanismos de ação com vesículas lipídicas. Para os estudos com células foram utilizados a cepa ATCC 90028.

4.10.1 Isolamento de protoplastos em *C. albicans*

As células cultivadas em ágar sabouraud dextrose foram inoculadas overnight em caldo YPG (glicose peptone, glucose, Sigma Aldrich, EUA) a 37°C. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação a 3.000xg por 10min, em temperatura ambiente. O pellet foi lavado com água destilada estéril e ressuspenso após centrifugação em meio de pré-incubação (EDTA 50 mM, pH 9,0; β-mercaptoetanol 35 mM). Posteriormente, as células foram incubadas por 30 min a 37°C com agitação a 180 rpm, centrifugadas novamente e lavadas com uma solução de sorbitol 1,2 M; EDTA 50 mM (pH 7,5) e outra solução de sorbitol 1,2 M; Tris 50 mM (pH 7,5). A concentração de células foi determinada por densidade óptica medida a 660 nm e ajustada para 5×10^6 UFC.mL⁻¹. As células então foram lavadas em tampão enzimático (sorbitol 1,2 M; Tris 50 mM; Ca²⁺ + acetato 0,1 mM; acetato de Mg²⁺ + 0,5 mM), ressuspenso em solução enzimática (tampão enzimático e 3 mg.mL⁻¹ de zimolase-20T) e incubadas por 2 h a 37 °C com agitação a 180 rpm. Os protoplastos foram verificados sob microscópio óptico

por coloração de gram. Após o isolamento, os protoplastos foram mantidos em HEPES por até 24h depois de isolados.

4.10.2 Preparação dos lipossomas

As vesículas unilamelares grandes (LUVs), com diâmetro de aproximadamente 100 nm, que mimetizam membranas das leveduras e seus hospedeiros foram obtidas por extrusão de vesículas multilamelares (MLVs) (MAYER et al., 1986). Para obtenção das MLVs, os lipídeos foram solubilizados em clorofórmio e misturados conforme proporção necessária para preparar as composições lipídicas definidas (Tabela 3). Em seguida foi realizada a evaporação do clorofórmio dessa solução e ressuspensão em tampão HEPES (pH 7,4) (fisiológico). Por fim, as soluções foram submetidas a 8 ciclos de quente e frio. Para extrusão foi utilizado o extrusor Avanti Polar Lipids equipado com membrana de policarbonato Nuclepore (GE Healthcare Life Science) de 100nm de diâmetro. Os lipídeos 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1-palmitoil A oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoinositol (POPI) e 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (POPS) foram obtidos na Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, EUA), enquanto que colesterol (Chol) e ergosterol (Erg) foram obtidos na Sigma (St. Louis, MO, EUA).

Tabela 3: Modelos de lipossomas e células utilizadas nos estudos de mecanismos de ação do peptídeo Ctn [15-34]

Sistema de vesículas lipídicas	Modelos
POPC	Controle
POPC:CHOL (70:30)	Células de mamíferos
POPC:ERG (70:30)	Modelo simples de levedura
POPC:POPE:ERG:POPI:POPS (32:21:13:3:4)	Membrana plasmática da levedura
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	-

**Membrane like*

4.10.3 Espectroscopia de fluorescência usando di-8-ANEPPS

As LUVs foram diluídas em HEPES para concentração de 500 µM e marcadas com 100 µM de di-8-ANEPPS por 1h sob agitação no escuro. As LUVs

marcadas foram tratadas com as concentrações de peptídeos por 1h. Foram utilizadas as seguintes concentrações: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 e 30 μM .

Para marcar as células, as suspensões de *C. albicans* (ATCC 90028) foram cultivadas *overnight*, com agitação, a 37 °C. No dia da medição, 100 μL de células foram diluídas em 5 mL de caldo de sabouraud e são deixadas a 37 °C sem agitar a 180 rpm por 3 horas. Depois as células foram lavadas três vezes em meio sabouraud e centrifugadas a 4000xg a 10 °C por 25 min para remover células em suspensão. A densidade óptica foi medida a 600 nm (OD600nm). As células (concentração final de 10^5 cells.mL⁻¹) foram diluídas em tampão HEPES com 0,1% de Pluronic F-127 e marcadas com di-8-ANEPPS (concentração final de 100 μM). Esta solução foi deixada no escuro sob agitação por 1h. Para as medições, as células marcadas foram diluídas no volume final de 500 μL (concentração final de 10^4 cells.mL⁻¹) e incubadas com as concentrações de peptídeos por uma hora. A partir do espectro de excitação do Di-4-ANEPPS, é possível calcular o valor de R, sendo este uma razão entre os valores de intensidade de fluorescência a 420 e 520 nm do espectro de excitação, com emissão a 635 nm. A variação de R para as concentrações testadas do peptídeo foi analisada utilizando a seguinte equação.

$$\frac{R}{R_0} = 1 + \frac{\frac{R_{min}}{R_0} \cdot [Peptídeo]}{K_d + [Peptídeo]}$$

Onde o valor de R é normalizado por R₀, sendo esse a amostra sem o tratamento com peptídeo. R_{min}, representa valor mínimo assintótico de R e K_d é a constante de dissociação.

4.10.4 Dispersão dinâmica de luz (DLS)

DLS foi realizado para elucidar as possíveis interações do peptídeo Ctn[15-35] em vesículas lipídicas em termos de tamanho das LUVs. As vesículas foram diluídas em HEPES na concentração de 200 μM . As vesículas foram filtradas em filtro 0,45 μm . As vesículas foram tratadas com 5, 10 e 50 μM do peptídeo. Foi utilizado um controle não tratado. Todas as medições foram obtidas a 25°C foram obtidas um conjunto de 15 medidas de cada um dos tratamentos. Os resultados apresentados correspondem a média de três medidas independentes. As medições foram obtidas utilizando o equipamento Malvern Zetasize Nano ZS (Malvern Instruments, Worcertershire, Reino Unido).

4.10.5 Zeta potencial

As LUVs foram diluídas em HEPES na concentração de 200 μm e filtradas em filtro de 0,45 μm de diâmetro. As vesículas foram tratadas com 5, 10 e 50 μM do peptídeo. Para mensurar a carga das células, as suspensões de *C. albicans* em fase exponencial de crescimento foram lavadas 3x em caldo sabouraud e centrifugadas a 20°C/4000 rpm por 15min para remover células em suspensão. Após a centrifugação o pellet foi resuspendido em meio sabouraud e a concentração foi mensurada pela densidade óptica a 660 nm. Após a contagem, as células foram diluídas para concentração de $5,0 \times 10^5$ UFC.ml⁻¹ em tampão HEPES (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4). Os protoplastos foram mensurados também na concentração de $5,0 \times 10^5$ UFC.ml⁻¹ em tampão HEPES.

As medições foram obtidas utilizando o equipamento Malvern Zetasize Nano ZS (Malvern Instruments, Worcerthershire, Reino Unido). Foram obtidas um conjunto de 15 medidas de cada um dos tratamentos. As amostras foram mensuradas utilizando as cubetas DTS1070 (Malver instruments). Os resultados foram analisados utilizando o valor do zeta potencial e contagem da média total mensurados no software. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

5. RESULTADOS

5.1 Atividade antifúngica e modulatória das crotalidinas

As propriedades físico-químicas do peptídeo crotalidina e de seus fragmentos, Ctn[1-14] e Ctn[15-34] estão apresentadas na tabela 4. A carga positiva (habilidade para interagir com membranas carregadas negativamente), momento hidrofóbico (tendência para se inserir na membrana e causar lise), hidrofobicidade (propensão para formar α -helices anfipáticas) e tamanho são as principais características que distinguem os análogos curtos do peptídeo parental.

Tabela 4. Propriedades físico-químicas da crotalidina (Ctn) e seus fragmentos N-terminal (Ctn[1-14] e C-terminal (Ctn[15-34])

^a Código 2MWT de acesso ao banco de dados PDB; Ctn completo é α -helicoidal; o

Peptídeo ^{a,b}	Tamanho (nr resíduos)	Experimental PM ^b	Carga total ^c	Hidrofobicidade, H ^d	Momento hidrofóbico, μ_H^d
Ctn	34	4151,41	+16	0,263	0,440
Ctn[1-14]	14	1797,30	+9	-0,012	0,763
Ctn[15-34]	20	2371,10	+8	0,455	0,311

fragmento N-terminal, Ctn [1-14] também adota estrutura α -helicoidal; o peptídeo dissecado no C- terminal, Ctn [15-34], não é estruturado em solução.

^b Peso Molecular (PM) como determinado por Cromatografia líquida- Espectrometria de massas.

^c Calculado com o “Peptide property calculator software” (<http://pepcalc.com>)

^d Calculado com o “Heliquist software” (<http://heliquist.ipmc.cnrs.fr/>)

Após a síntese, purificação e caracterização dos peptídeos, a atividade antifúngica foi determinada. Inicialmente foram determinadas a CIM de leveduras resistentes a anfotericina B e/ou fluconazol. Foram utilizados como parâmetros para estabelecer a resistência os breakpoints do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e CLSI disponíveis para *C. albicans*. Desde a padronização, esses valores também tem sido adaptados para espécies de *Cryptococcus* (LEE et al., 2012).

As CIMs de Ctn, Ctn[1-14] and Ctn[15-34] para *C. albicans* e *C. laurentii*, *C. neoformans* estão distribuídos na tabela 5, bem como as CIM para os fármacos FLC e AMB, aos quais apresentam CIM entre 3,12 e >200 μ M (1 to > 64 μ g ml⁻¹) e entre 1 to >

16 μM (1 to $>16 \mu\text{g mL}^{-1}$), respectivamente. Segundo os *breakpoints*, *C. albicans* (LABMIC 0125) foi resistente para FLC, com CIM de $8 \mu\text{g mL}^{-1}$, acima do permitido para essa droga ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$) (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2015). *C. neoformans* apresentou resistência para ambos os antifúngicos até a maior concentração testada. *C. laurentii* foram sensíveis tanto para os peptídeos como para os agentes antifúngicos testados. Diante disso, para os ensaios que seguem foram utilizadas somente cepas que mostraram alguma resistência para AMB e/ou FLC além da cepa selvagem ATCC 90028 como controle.

Tabela 5. Determinação da concentração mínima inibitória (CIM) do Ctn e dos peptídeos derivados Ctn[1-14] and Ctn[15-34] frente a leveduras resistentes a AMB e/ou FLC.

Cepas	Origem	CIM - μM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
		Ctn[1-14]	Ctn[15-34]	Ctn	AMB	FLC
<i>C. albicans</i>						
ATCC 90028	Coleção de cultura	20 (35,95)	10 (23,7)	20 (83)	1 (1)	3,12 (1)
LABMIC 0125*	Lesão tecidual	10 (17,98)	10 (23,7)	10 (41,5)	1 (1)	25 (8)
<i>C. laurentii</i>						
LABMIC 0403	Hemocultura	20 (35,95)	20 (47,4)	20 (83)	4 (4)	6,25 (2)
LABMIC 0402	Hemocultura	10 (17,98)	10 (23,7)	20 (83)	4 (4)	6,25 (2)
<i>C. neoformans</i>						
LABMIC 0405	Líquor	5 (8,98)	5 (11,85)	1,25 (5,19)	$>16 (>16)$	$>200 (>64)$
LABMIC 0406	Líquor	20 (35,95)	10 (23,7)	2,5 (10,38)	$>16 (>16)$	$>200 (>64)$

*Cepa resistente de acordo com os pontos de corte do EUCAST (<http://clincalc.com/eucast/>) e CLSI (*Performance standards for antifungal susceptibility of yeasts, 1st Ed. CLSI supplement M60. ISBN 1-56238 – 828 – 2 [Print]*) que estabelecem CIM $> 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para cepas de *C. albicans* resistente a fluconazol.

Ctn, Ctn [1-14] e Ctn [15-34] apresentaram atividade contra todas as cepas testadas, com CIM variando de 1,25 a $20 \mu\text{M}$. Curiosamente, as cepas mais suscetíveis aos peptídeos, com CIMs na faixa baixa de μM ($\leq 10 \mu\text{M}$), foram principalmente as mesmas cepas resistentes à AMB e FLC, exceto *C. neoformans* (LABMIC 0406) tratado com Ctn [1-14]. Portanto, os demais estudos foram realizados com *C. neoformans*

cl clinicamente isolados (LABMIC 0405) e *C. albicans* (LABMIC 0125), que eram resistentes aos controles, e a cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 90028).

Um próximo passo foi avaliar a atividade antifúngica de Ctn e seus fragmentos quando combinados com FLC. Os resultados da associação de cada peptídeo com FLC contra *C. neoformans* (LABMIC 0405), *C. albicans* (LABMIC 0125; ATCC 990028) são mostrados na Tabela 6. Estudos anteriores demonstraram que a associação de Ctn ou Ctn [1-14] ou Ctn [15-34] com AMB resultaram em sinergismo contra as cepas testadas de *C. albicans* (Cavalcante et al. 2017; Cavalcante et al. 2018). Quando esses mesmos peptídeos foram combinados separadamente com FLC contra diferentes cepas de *C. albicans*, houve uma redução de até 8 vezes nas CIM FLC contra *C. albicans* resistente a FLC (LABMIC 0125). No entanto, os índices FICs (FICIs) para cada associação peptídeo-FLC contra LABMIC 0125 estão dentro da faixa indiferente ($0,5 < \text{FICI} \leq 4,0$). A mesma faixa de FICI (indiferente) também foi obtida quando qualquer peptídeo foi combinado com FLC contra *C. neoformans*, mas, neste caso, não foi observada redução na CIM de FLC e/ou peptídeos (Tabela 6).

Tabela 6. Determinação do índice FIC (FICI) para *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* resistentes a fluconazol

Combinações	ATCC 90028			LABMIC 0125			LABMIC 0405		
	CIM (μM)		FICI	CIM (μM)		FICI	CIM (μM)		FICI
	Sozinho	combinado		Sozinho	combinado		Sozinho	combinado	
Ctn [1-14]	20	5	1,25	10	5	0,62	5	5	2(I)
Fluconazol	3,25	3,12	(I)	25	3,12	(I)	>200	>200	
Ctn [15-34]	10	2,5	1,25	10	5	0,62	5	5	2(I)
Fluconazol	3,12	3,12	(I)	25	3,12	(I)	>200	>200	
Ctn	20	10	1,5	10	5	0,62	1,25	1,25	2(I)
Fluconazol	3,25	3,12	(I)	25	3,12	(I)	>200	>200	

O sinergismo (S) foi definido com o índice $\text{FICI} \leq 0,5$, indiferente (I) $0,5 > \text{FICI} \geq 4,0$ e antagonism (A) $\text{FICI} > 4,0$.

Como anteriormente observado, Ctn [15-34] mostrou atividade antifúngica (Cavalcante et al. 2017; Cavalcante et al. 2018) e uma toxicidade muito baixa em

comparação ao peptídeo parental e meia-vida mais longa no soro humano vs. Ctn e Ctn [1-14]. Diante desses dados, associados aos resultados de atividade contra leveduras resistentes apresentados nesse estudo, utilizamos apenas o Ctn[15-34] nos ensaios seguintes.

A atividade modulatória dos peptídeos com o fluconazole foi determinada através do método checkerboard (Tabela 6). Para corroborar com esses resultados, testamos a viabilidade das cepas tratadas fluconazol com o peptídeo que apresentou até o momento atividade mais promissora, o fragmento Ctn [15-34], quando utilizados isoladamente ou em combinação. As viabilidades foram medidas com base na quantidade de ATP liberado a partir de células viáveis, que é utilizada por uma enzima luciferase para gerar luz na presença de seu substrato luciferina. As viabilidades relativas foram calculadas a partir das leveduras não tratadas (Fig.8).

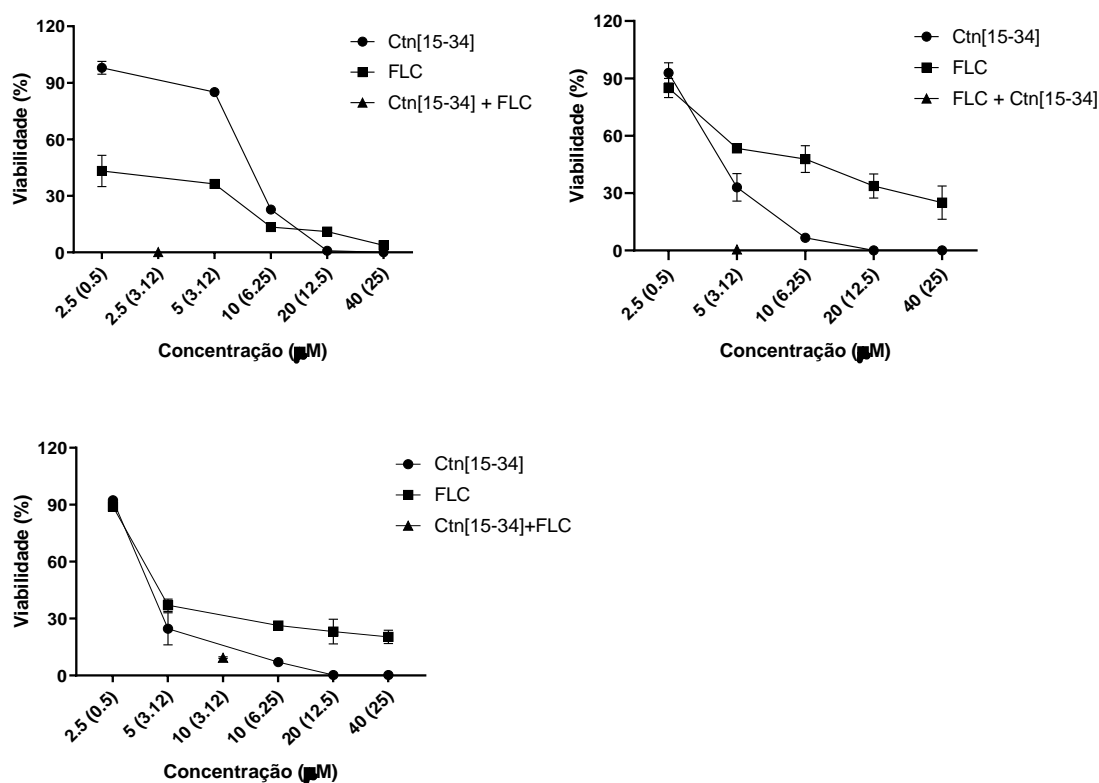
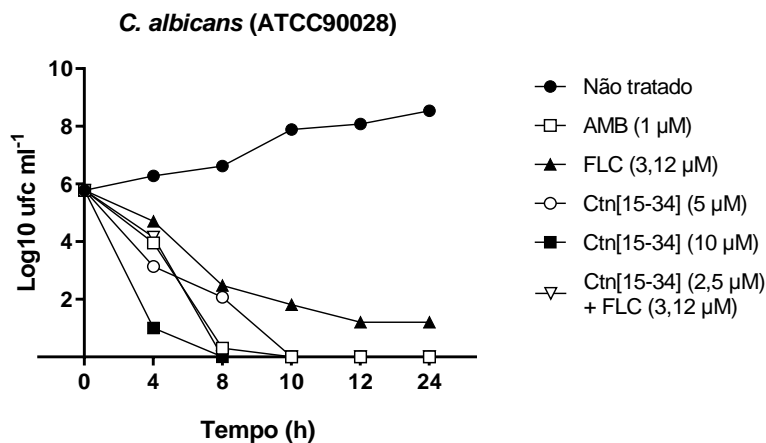


Figure 8. Viabilidade relativa de *C. albicans* (Cepa selvagem) (A), *C. albicans* (isolado clínico) (B), and *C. neoformans* (isolado clínico) (C) depois do tratamento com concentrações crescentes de Ctn[15-34], fluconazol (FLC) e a combinação de Ctn[15-34] e FLC. Números entre os parênteses indicam as concentrações de FLC. Ensaio foi realizado em triplicata.

No geral, a Figura 8 mostra que todas as cepas perderam viabilidade à medida que a concentração de Ctn [15-34] ou FLC aumentou. Para Ctn [15-34], houve acentuadas diminuições na viabilidade antes que os valores de CIM observados anteriormente fossem alcançados, seguidos de ligeiras diminuições após as CIMs. Como esperado, as cepas de *C. albicans* resistentes a FLC (LABMIC 0125) e *C. neoformans* (LABMIC 0405) reduziram não mais que 50% na viabilidade, mesmo nas concentrações mais altas de FLC. Vale ressaltar que a associação de Ctn [15-34] com FLC permitiu uma redução de pelo menos 90% nas viabilidades dessas cepas avaliadas. Para o mesmo efeito apenas com o Ctn [15-34], foi necessário usar 2xCIM do peptídeo. Em *C. neoformans* a associação dos compostos foi indiferente, não modificando a CIM de nenhum dos compostos associados.

Finalmente, os perfis microbicidas foram determinados para essas leveduras posteriores após tratamento com Ctn [15-34] ou AMB ou FLC. As concentrações de cada medicamento (peptídeo ou antifúngico) utilizado foram equivalentes às CIMs encontradas anteriormente (Fig. 9).



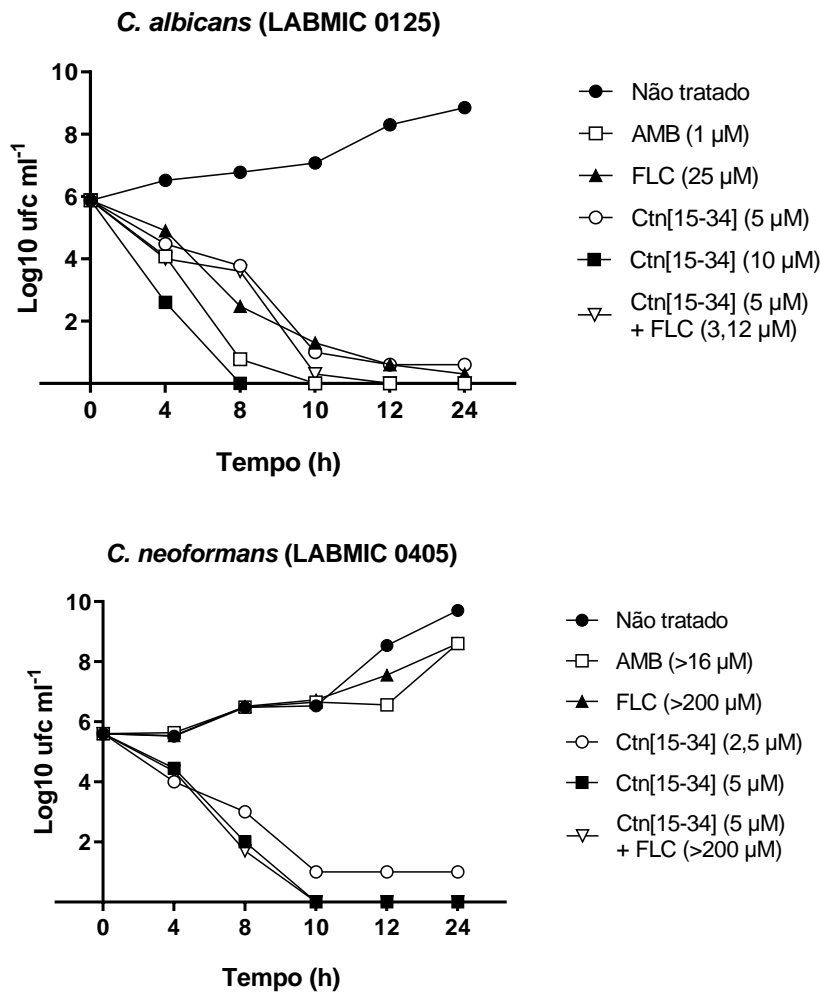


Figura 9. Cinética de morte de *C. albicans* (ATCC 90028) (A), *C. albicans* (isolado clínico) (B) e *C. neoformans* (isolado clínico) (C) tratados com Ctn[15-34], AMB, FLC e Ctn [15-34] combinado with FLC. Experimento realizado em triplicata.

De acordo com a Figura 9, Ctn [15-34] sozinho em sua respectiva CIM poderia inibir o crescimento de *C. albicans* padrão e clínico, após 8 h de tratamento, bem como de cepas clínicas de *C. neoformans*, após incubação por 10 h. Por outro lado, AMB e FLC isoladamente inibiram apenas as cepas de *C. albicans*. Notavelmente, a associação de Ctn [15-34] com FLC foi capaz não apenas de inibir o crescimento de todas as cepas após principalmente o mesmo período de tratamento (8 e 10 h) que o peptídeo isolado, mas também de restaurar a eficácia do FLC contra esses FLC- cepas resistentes.

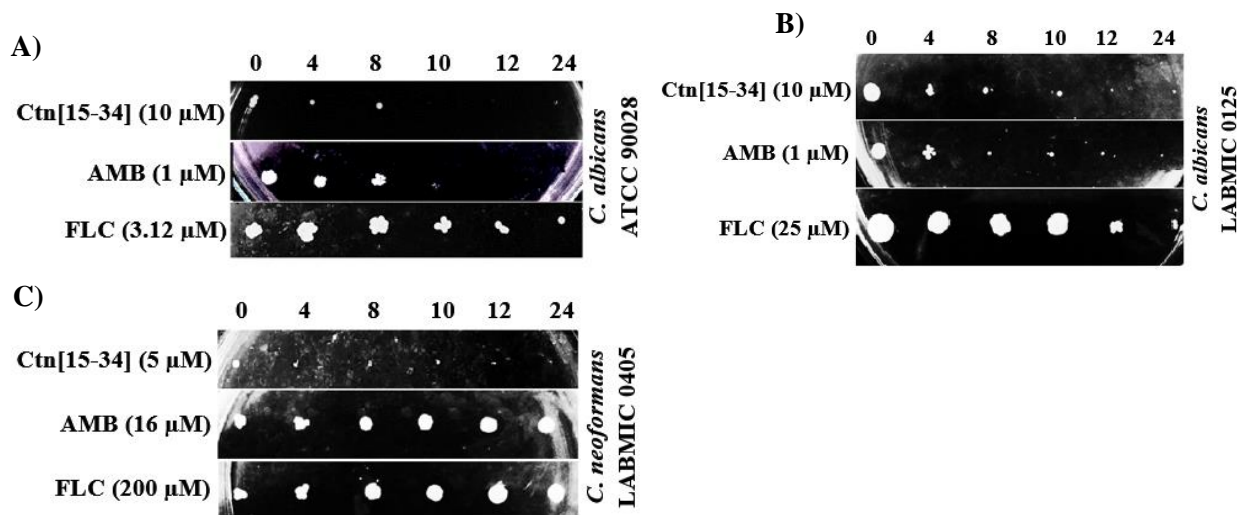


Figure 10. Formação das colônias de leveduras em SDA depois do tratamento com Ctn [15-34], AMB and FLC após 24h de incubação. Alíquotas de 2 μ l do teste de microdiluição foram adicionados na superfície das placas com ágar, incubados overnight a 35°C e fotografados em seguida.

A capacidade fungicida de peptídeos e fármacos contra essas leveduras também foi corroborada por meio de um ensaio de detecção direta (Figura 10). Neste ensaio, as células viáveis formam colônias agrupadas que diminuem de tamanho e aumentam a rugosidade de maneira dependente do tempo quando expostas a peptídeos e fármacos. Na Figura 10A, a cepa padrão de *C. albicans* foi suscetível ao Ctn [15-34] e aos antifúngicos, especialmente AMB. Na Figura 10B, a cepa clínica de *C. albicans* realmente mostrou resistência ao FLC mesmo a 25 μ M do fármaco azol. Na Figura 10C, *C. neoformans* era definitivamente resistente a AMB e FLC. Ctn [15-34] foi o único tratamento eficaz contra essas cepas resistentes a FLC e AMB, que causaram aumento da rugosidade e diminuição da viabilidade celular das leveduras nas 24 h de tratamento.

5.2 Perfil de expressão gênica em *C. albicans* sensível e resistente a fluconazol

Para avaliar diferenças nos perfis de expressão gênica entre as cepas de padrão e isolado clínico de *C. albicans* utilizadas nesse estudo foram realizadas ensaios de qPCR. Os genes avaliados e a função de cada um estão descritos na tabela 7.

Tabela 7. Genes e suas respectivas proteínas relacionadas a resistência em *Candida* spp.

Genes	Produto gênico	Referência
ACT1 (<i>β-actin</i>)	Proteína estrutural do citoesqueleto	LI; SKINNER; BENNETT, 2012
ERG 4 (<i>Ergosterol</i>)	Codifica enzima delta 24(24-1) esterol redutase, importante no final da biossíntese do ergosterol	HENRY; NICKELS; EDLIND, 2010
ERG 10 (<i>Ergosterol</i>)	Codifica a enzima acetilcoenzima A acetiltransferase, utilizada no início da via da biossíntese do ergosterol	HENRY; NICKELS; EDLIND, 2010
UBC (<i>Ubiquitin</i>)	Codifica proteína precursora (E2) da poliubiquitina	KIMURA; TANAKA, 2010
PGK1 (<i>Phosphoglycerate kinase</i>)	Importante na via do metabolismo dos carboidratos. Codifica enzima glicolítica fosfoglicerato kinase 1.	MAZZONI et al., 2006
CYP13 (<i>Cyclophilin</i>)	Peptidil-prol cis-trans isomerase, classe de proteínas que compreende as ciclofilinas (proteínas de ligação às ciclosporinas).	LI; SKINNER; BENNETT, 2012
CDR1 (<i>Candida Drug Resistance</i>)	Expressão de transportadores multidrogas da família ABC (proteínas transmembranares).	PRASAD et al.,1995
HSP90 e HSP90/3 (<i>Heat Shock Protein</i>)	Proteínas de choque térmico. Podem funcionar como chaperonas, que são capazes de prevenir a desnaturação e/ou promover a renaturação de enzimas em células submetidas ao stress termal.	WANG; ZHU, 2000

Inicialmente foi realizada a validação de todos os primers. Os produtos da amplificação foram submetidos a uma eletroforese, que confirmou a amplificação de todos os primers testados e ausência de formação de produtos inespecíficos.

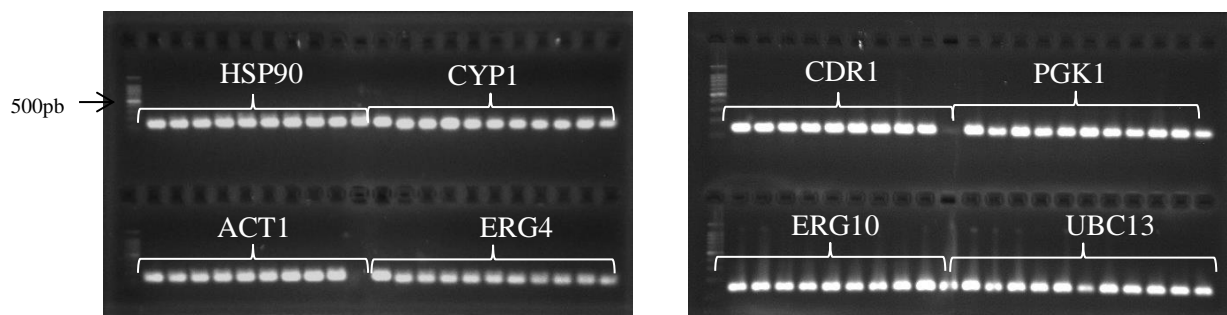


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose com produtos de amplificação do PCR.

A superexpressão dos genes foi considerada superior quando a expressão na cepa resistente foi estatisticamente superior ao da cepa sensível. Portanto, os genes que apresentaram uma superexpressão no isolado clínico resistente foram ERG4, ERG10 e CYP13.

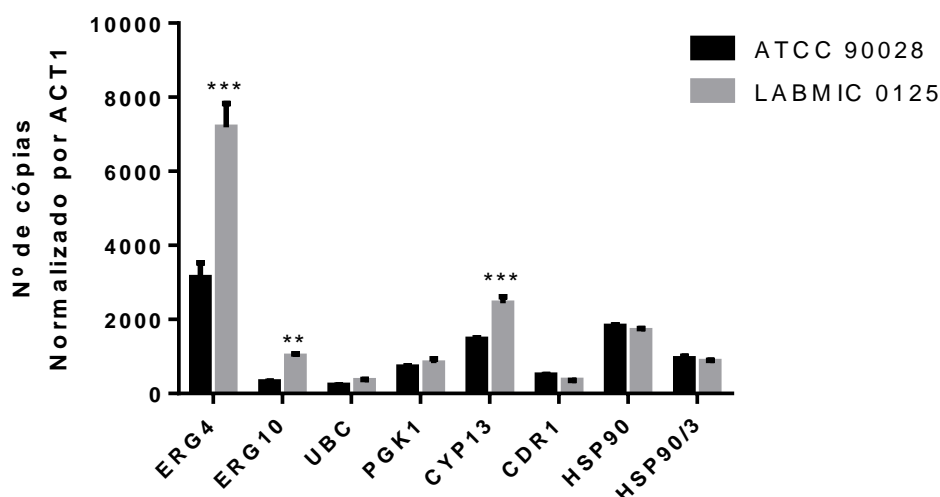


Figura 12. Perfil de expressão gênica em *C. albicans* resistente a fluconazol. Os asteriscos representam diferenças de expressão dos genes entre a cepa sensível (ATCC90028) e resistente (LABMIC 0125) a fluconazol, onde ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.3 Atividade antibiofilme frente *C. albicans*

A capacidade antibiofilme do Ctn [15-34] também foi avaliada frente espécies de *C. albicans*. Utilizamos duas cepas para verificar se existem diferenças na formação do biofilme de isolados resistentes e sensíveis a antifúngicos. O isolado resistente apresentou melhor formação com 72 de incubação e 10^7 UFC.ml⁻¹, enquanto

que a cepa padrão precisou do mesmo tempo no entanto um concentração menor, 10^4 UFC.ml⁻¹.

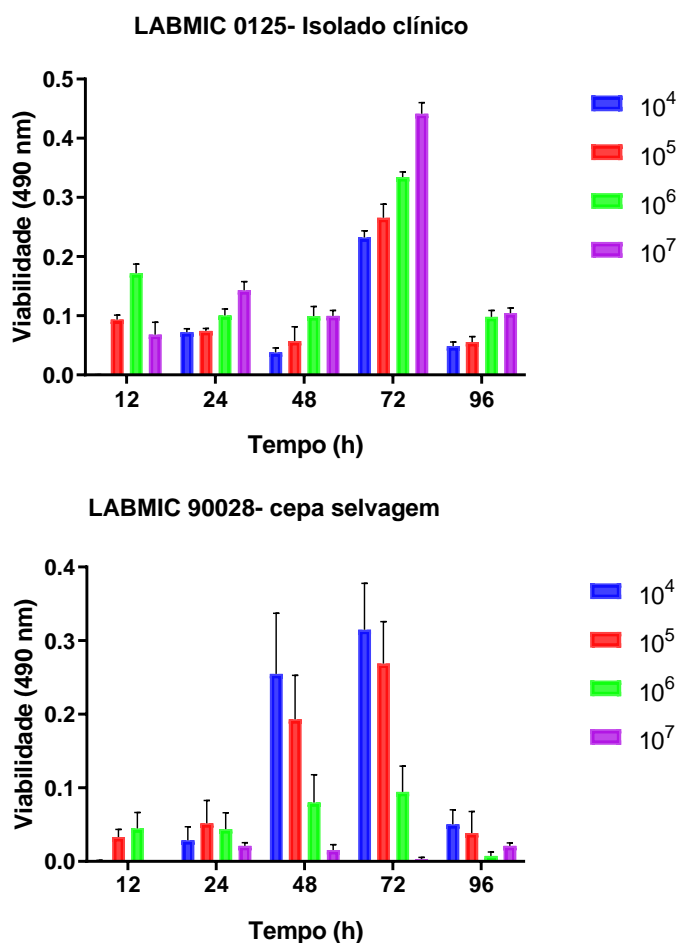
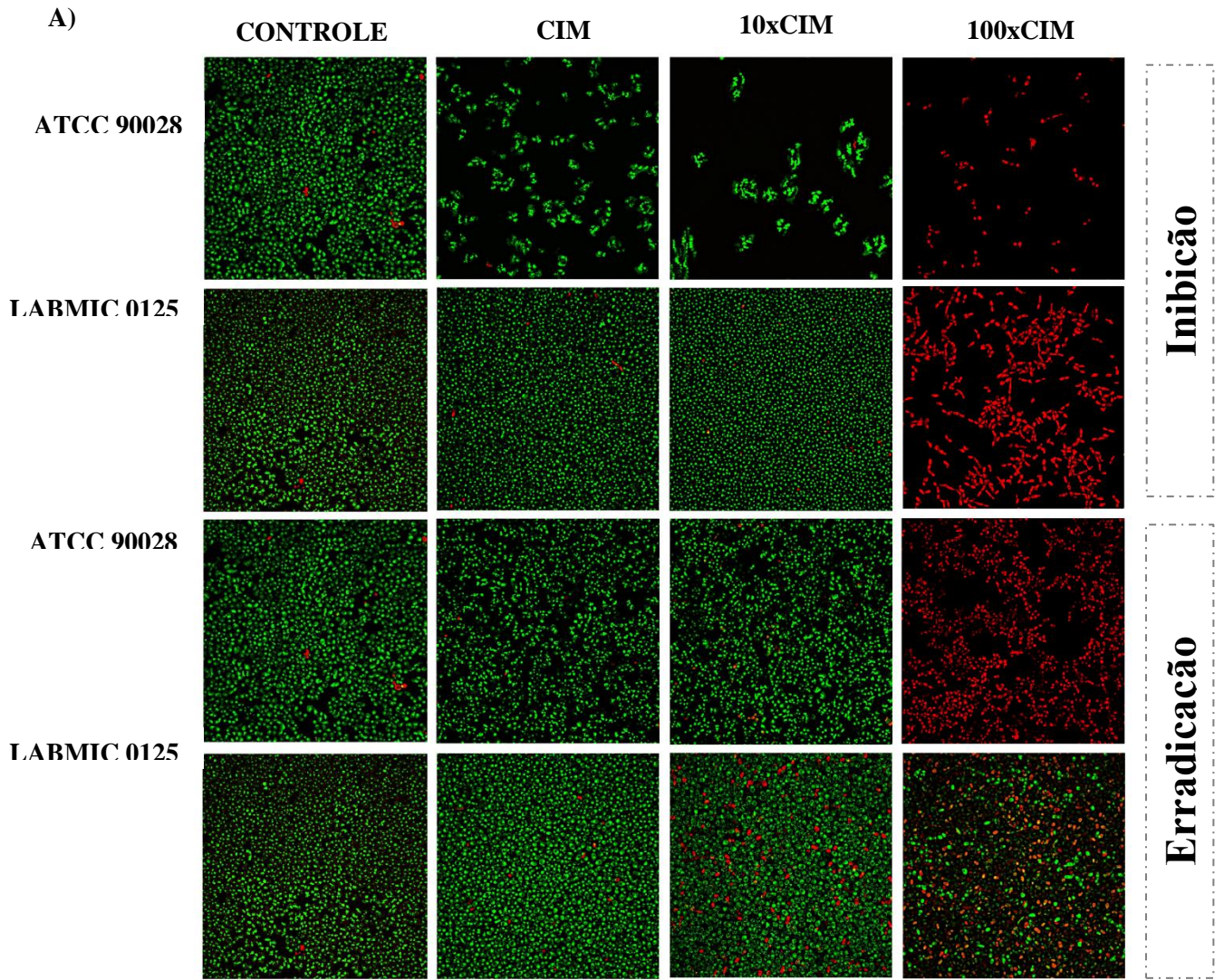


Figura 13. Formação de biofilme em diferentes concentrações e tempos de incubação

Depois de determinar as melhores condições (tempo, concentração) para formação do biofilme, a próxima etapa foi avaliar a atividade de Ctn[15-34] na inibição do biofilme em formação e na erradicação do biofilme maduro. Para isso foram utilizadas as concentrações da CIM, determinadas anteriormente pelo ensaio de microdiluição nessas mesmas cepas na forma planctônicas, 10xCIM e 100xCIM. O método utilizado foi a microscopia confocal. Depois de obter as imagens dos biofilmes antes e depois de tratados, as imagens foram processadas e com auxílio do processador fizemos a quantificação da redução do biofilme após a exposição ao peptídeo.



B)

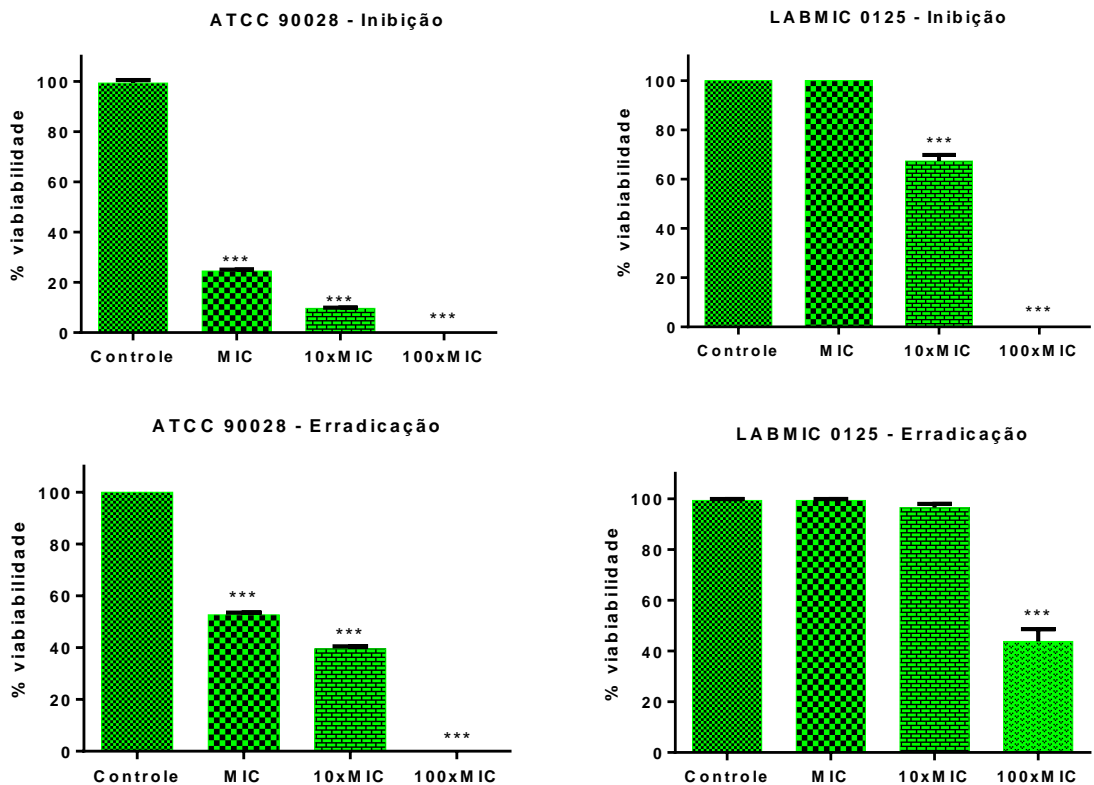


Figura 14. Atividade antibiofilme de Ctn[15-34] frente *C. albicans*. Imagens obtidas através de microscopia confocal de varredura a laser depois de 72hs de incubação das cepas. Aumento: 400x. Lasers: 488 nm (SYTO9) para células viáveis; 561 nm (iodeto de propídio) para células mortas (A). Quantificação das células viáveis obtidas através da avaliação das imagens. Barras representam média \pm desvio padrão. *** $p < 0,001$ em relação ao controle (células sem tratamento).

A atividade antibiofilme de Ctn[15-34] apresentou diferenças entre a cepa padrão (sensível ao fluconazol) e o isolado clínico (resistente ao fluconazol). Os tratamentos foram realizados com base na CIM determinada anteriormente para células planctônicas. Na inibição as concentrações de 10 μ M (CIM) e 100 μ M (10xCIM) reduziram consideravelmente o biofilme na cepa sensível, enquanto que na cepa resistente não ocorreu alteração na redução da massa de células. Com 1000 μ M (100xCIM) ocorreu completa inibição da formação do biofilme.

Na erradicação ambas as cepas só apresentaram resultados quando tratadas com 100xCIM, apresentando diferenças também entre a cepa sensível e a cepa resistente. Na cepa padrão (ATCC 90028) o peptídeo erradicou totalmente o biofilme enquanto que no isolado clínico resistente (LABMIC 0125) ocorreu erradicação de parte do biofilme, que continuou apresentando células viáveis.

O AFM foi utilizado para observar o efeito do peptídeo sobre a morfologia das células do biofilme. Foi realizado o mesmo desenho experimental da microscopia confocal. As células do biofilme da cepa do isolado clínico (LABMIC 0125) (Fig.15E-H, M-P) apresentaram-se morfologicamente mais ovais que a cepa ATCC 90028 (Fig.15A-D, I-L). No entanto, nenhuma das imagens revelou a presença de pseudohifas, que ocorre quando há um alongamento de várias dessas células (blastoconídeos) unidas entre si. Tampouco foi revelada a presença de hifas. Além da forma, as cepas apresentam diferenças na superfície, com a cepa padrão revelando uma superfície mais lisa que o isolado clínico. O efeito do peptídeo sobre o biofilme é observado somente na concentração 100xCIM. A inibição do biofilme na cepa padrão revela a presença de somente uma célula isolada do biofilme, que aparece com irregularidades na superfície, acompanhada de extravasamento de conteúdo intracelular (Fig. 15D). No tratamento do

biofilme pré-formado (erradicação), essa cepa apresentou uma superfície irregular e pequenas bolhas sobre e ao redor da massa celular (Fig.15H).

A inibição do biofilme do isolado clínico tratado com 100xCIM do peptídeo parece não ter alterado a massa celular, no entanto as células apresentam-se descamadas (Fig.15E). No biofilme pré-formado foi observado somente pequenas vesículas ao redor da superfície das células (Fig.15F).

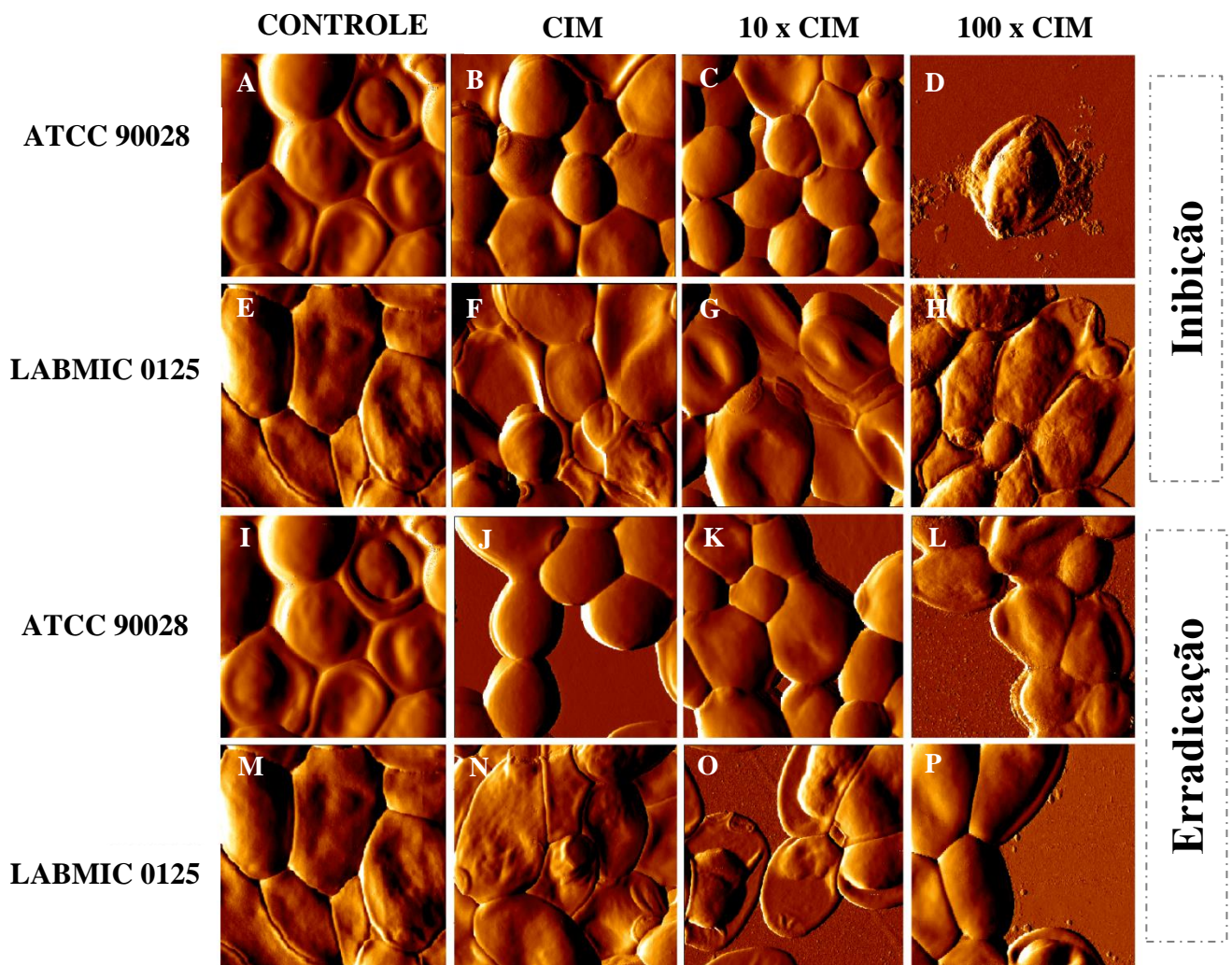


Figura 15. Imagens AFM de biofilmes de *C. albicans*. Foram realizados ensaios de formação, erradicação e inibição para as células ATCC e isolado clínico. Imagens de microscopia de força atômica mostraram o efeito do peptídeo antimicótico em *C. albicans*, com diferentes concentrações de peptídeos (ausência, CIM, 10xCIM e 100xCIM). Área total de digitalização para cada imagem: $10 \times 10 \mu\text{m}^2$.

5.4 Mecanismos de ação de Ctn[15-34] utilizando membranas lipídicas

Para caracterização dos mecanismos de ação do Ctn[15-34] em *C. albicans* foi, inicialmente realizado o estudo do potencial dipolar das membranas lipídicas e das células tratadas com concentrações crescentes do peptídeo (Fig. 16). Não foi possível observar interação com os sistemas de membranas utilizados. No entanto, as células apresentaram constante de dissociação 14.5 ± 5.639 , o que mostra uma interação do peptídeo com a membrana das leveduras.

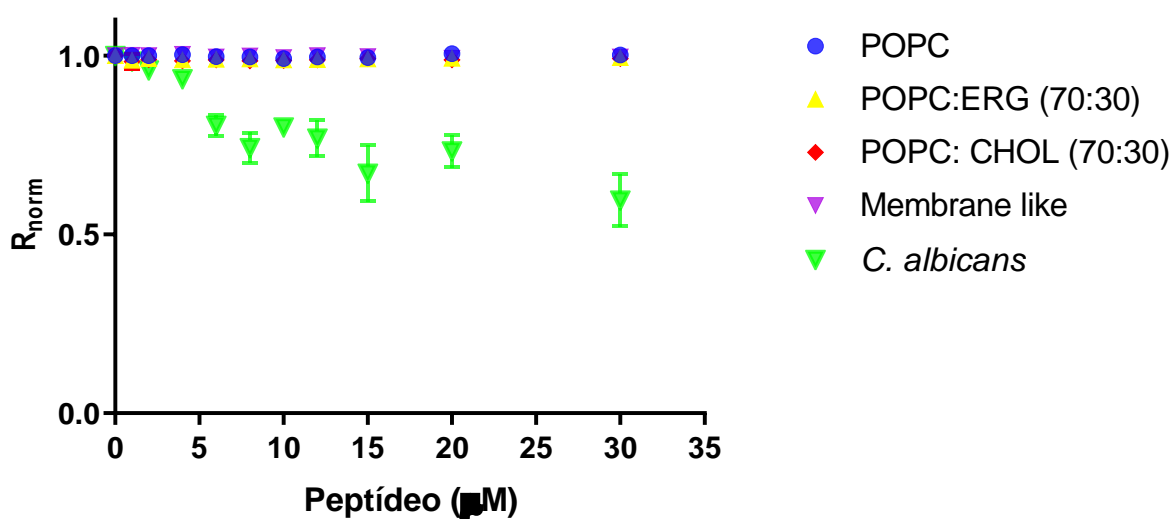


Figura 16- Potencial de membrana dipolar em sistemas de membranas lipídicas e células de *C. albicans*.

Para avaliar mudanças físico-químicas nas biomembranas foram avaliados o diâmetro hidrodinâmico e a carga das vesículas. POPC utilizado como controle não apresentou diferenças em termos de tamanho e carga quando tratados com o peptídeo. POPC:Chol, vesículas que mimetizam a membrana do hospedeiro e POPC:Erg, um modelo simples que mimetiza lipídeos da membrana das leveduras também não apresentaram modificações frente ao tratamento com o peptídeo. Em *membrane like*, composição que mimetiza a membrana celular das leveduras, o peptídeo promoveu agregação na concentração de 50 µM (Fig.17A) e apesar de não neutralizar a carga da levedura, este mostrou uma redução de $-25,1 \pm 2,4$ para $-10,28 \pm 2,6$ no potencial zeta (Fig.18).

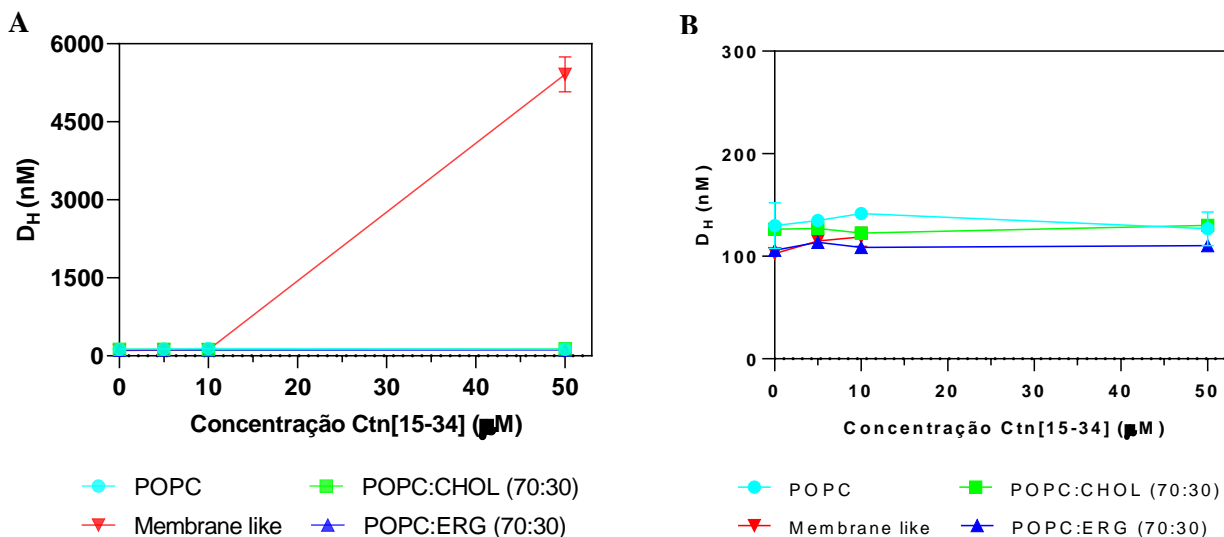


Figura 17. Diâmetro hidrodinâmico das diferentes vesículas lipídicas tratadas com concentrações crescentes do peptídeo Ctn[15-34]. (A) Escala de 6000 μM devido a grande aglomeração apresentada na concentração de 50 μM para membrane like (B) Detalhe dos dados para as vesículas que apresentaram tamanho em escala < 150 μM, sem a concentração de 50 μM para membrane like.

Os agentes antifúngicos atuam em várias estruturas da célula, como estruturas da parede celular e núcleo. No entanto, a maioria desses agentes possuem mecanismos que envolve a membrana plasmática. Portanto, além dos lipossomas, estudamos aqui o efeito da interação do peptídeo na neutralização da carga de protoplastos de *C. albicans*. Essas células apresentaram carga de $-12,37 \pm 0,22$ e o tratamento com 5xCIM do peptídeo reduziu a carga para $-5,9 \pm 0,87$ (Fig.18). Uma alteração discreta também foi observada em *membrane like*. Não foram observadas alterações na carga das vesículas zwitteriônicas (POPC e POPC:Chol) e menos aniônicas como POPC:ERG. Não houve alteração também sobre as células de leveduras que apresentaram potencial zeta de $-4,32$ mV.

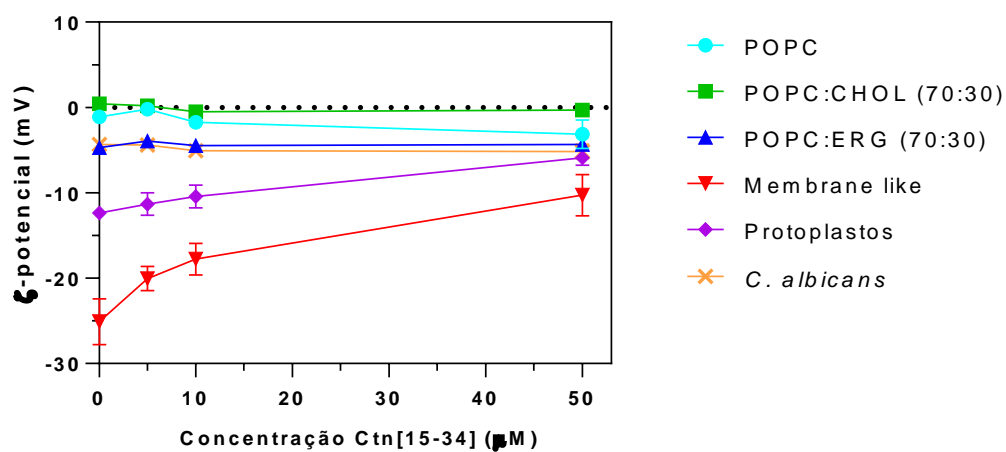


Figura 18- Potencial zeta das vesículas lipídicas, de protoplastos e células de *C. albicans*. Foram utilizadas vesículas na concentração de 200 µM e células na concentração de 10^5 UFC.ml⁻¹.

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novos medicamentos anti-infecciosos é um grande desafio para superar o aumento e a disseminação da resistência aos medicamentos, à medida que mais cepas estão tornando-se menos suscetíveis aos antifúngicos atuais. À exemplo dessa resistência a medicamentos, esse estudo apresenta cepas clínicas de *C. neoformans* inativas a FLC e AMB até as concentrações testadas (Tabela 5), embora a resistência natural à AMB e o surgimento de resistência a esse medicamento tenha sido pouco relatada (JOSEPH-HORNE et al., 1995) esse fenótipo à AMB ainda é considerado raro (VANDEPUTTE et al., 2008; EDDOUZI et al., 2013), mas ocorre principalmente em cepas de espécies emergentes como *Candida* não-*albicans* (McCARTHY et al., 2017).

As crotalidinas, Ctn e seus fragmentos, particularmente o Ctn [15-34], vem demonstrando ter potencial agente anti-infeccioso, com um amplo espectro de atividades. Suas propriedades físico-químicas, ou seja, tamanho curto, carga positiva, alta hidrofobicidade e momento hidrofóbico intermediário, conferem à Ctn [15-34] um perfil de atividade-estrutura bem equilibrado que o torna eficaz contra bactérias, certas linhas de células tumorais, protozoários tripanossomáticos (*T. cruzi*) (BANDEIRA et al., 2017; MELO et al., 2017) e um vírus de RNA que infecta camarão marinho (VIEIRA-GIRÃO et al., 2017). Em estudos anteriores, relatamos as propriedades antifúngicas de Ctn, Ctn [1-14] e Ctn [15-34] contra cepas padrão e clínicas também suscetíveis aos medicamentos de escolha (CAVALCANTE et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2018). Aqui, examinamos mais detalhadamente o potencial antifúngico do Ctn e seus fragmentos contra isolados clínicos de *C. albicans* e *C. neoformans* resistentes à FLC e AMB. No geral, esses peptídeos apresentaram atividade antifúngica com CIMs no mesmo intervalo das descobertas anteriores. Entre as cepas recém-testadas, foi intrigante que as mais suscetíveis aos peptídeos fossem essencialmente as cepas de *C. albicans* e *C. neoformans* resistentes a FLC e (FLC + AMB), respectivamente (Tabela 5). Assim, sugere-se que esses peptídeos anfipáticos carregados positivamente interagem com alvos não modificados ou mais fáceis de alcançar/interagir nessas cepas resistentes, como a membrana celular de *C. albicans*. Uma possível explicação é que os níveis reduzidos de ergosterol, um dos principais mecanismos de resistência a medicamentos antifúngicos (VANDEPUTTE et al., 2008; VINCENT et al., 2013; MESA-ARANGO et al., 2016),

tornam as membranas celulares das chamadas cepas resistentes mais carregadas negativamente e, conseqüentemente, mais propensas a interagir com peptídeos anfipáticos catiônicos. Os ensaios de qPCR revelaram uma superexpressão dos genes ERG4 e ERG10 na cepa de *C. albicans* resistente. Esses genes codificam enzimas envolvidas em etapas críticas na via da biossíntese do ergosterol (Tabela 7) e, provavelmente, esse perfil de superexpressão leva a alterações nessa via ocasionando perda da susceptibilidade ao fluconazol. Outro gene que apresentou superexpressão foi o CYP13, que codifica enzima ciclofilina, importante na via da calcinerina, considerada essencial para a tolerância de *C. albicans* ao fluconazole (AKINS, 2005). Em *Cryptococcus* spp., as bases moleculares da resistência antifúngica são menos conhecidas. O desenvolvimento de cepas com fenótipos resistentes a antifúngicos pode ser adicionalmente associado a fatores como pressão ambiental e condição de saúde do hospedeiro (MAUBON et al., 2014; SANGULARD, 2016).

Pacientes com infecções causadas por *Candida* spp. ou *Cryptococcus* spp. são geralmente tratados com dois ou mais medicamentos antifúngicos para melhorar o resultado terapêutico e evitar a resistência (SMITH et al., 2015; BULUSU et al., 2016). Diante disso, a atividade do Ctn e seus fragmentos quando combinados com o FLC foi examinada. Embora em estudos anteriores a combinação com AMB tenha mostrado efeitos sinérgicos contra cepas suscetíveis de *C. albicans* (CAVALCANTE et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2018), a associação da FLC com qualquer um dos peptídeos não resultou em sinergismo, de acordo com os valores obtidos pelo FICI. No entanto, ficou claro que a adição de Ctn, Ctn [1-14] ou Ctn [15-34] ao FLC poderia reduzir os valores de CIM azol (8 vezes) contra *C. albicans* resistente a FLC (LABMIC 0125) (Tabela 6) de volta à faixa suscetível (abaixo do ponto de corte), de acordo com as diretrizes EUCAST e CLSI (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2015).

A diminuição dos valores de CIM para FLC em associação com o peptídeo Ctn[15-34], no caso dos isolados clínicos resistentes, nos leva a avaliar ainda mais a associação dos peptídeos com a droga azol. Ctn [15-34] foi o peptídeo escolhido porque é menos tóxico (por exemplo, menos hemolítico) e tem uma meia-vida sérica longa (> 12 h) em comparação com Ctn (~ 1 h) e Ctn [1-14] (~ 0,5 h). Em um cenário de infecção sistêmica por *Candida* sp. ou *Cryptococcus* spp., Ctn [15-34] seria o único peptídeo que, sem modificação química ou conjugação/encapsulamento (MALIK et al., 2007;

VLIEGHE et al., 2010), seria realmente capaz de permanecer em circulação por tempo suficiente para interagir e matar essas leveduras.

A avaliação de Ctn [15-34] em associação ao FLC contra as estirpes de *C. albicans* e *C. neoformans* resistentes a FLC e (FLC + AMB) destaca a importância do uso combinado do peptídeo com o fármaco azol. Nos ensaios de viabilidade celular (Fig. 8), Ctn [15-34] + FLC, nas CIMs derivadas dos experimentos de checkerboard (Tabela 6), matou $\geq 90\%$ de células, incluindo não apenas o tipo selvagem, mas, o que é mais importante, ambos os isolados clínicos resistentes. Nos ensaios de curva do tempo de morte (Figs. 9 e 10), os únicos tratamentos que inibiram o crescimento de todas as cepas foram Ctn [15-34] na sua CIM e na combinação peptídeo + FLC. Portanto, Ctn [15-34] parece ser uma alternativa eficaz como adjuvante no tratamento contra essas leveduras, resgatando a atividade FLC contra essas cepas resistentes, especialmente *C. albicans* (LABMIC 0125), embora os valores de FICI (Tabela 6) sugiram um efeito indiferente. De fato, embora os valores de FICI sejam importantes na triagem de interações/combinções de medicamentos em experimentos de checkerboard, nossos resultados enfatizam que um valor não-sinérgico de FICI não deve desencorajar os pesquisadores clínicos da exploração experimental real de regimes de tratamento que podem salvar a vida dos pacientes.

O fato de Ctn [15-34] possuir atividade intrínseca anti-Cryptococcus in vitro abre caminho para o desenvolvimento biofarmacêutico; O complexo *C. neoformans/C.gattii* causa infecções com risco de vida, como meningite criptocócica, e embora várias classes de quimioterápicos antifúngicos estejam disponíveis (MOURAD e PERFECT, 2018), não existem medicamentos eficazes para combater a criptococose. Em um modelo de infecção pulmonar de murinos (MUKAREMERA et al., 2018), *C. neoformans* mostra desenvolver uma cápsula extracelular, reticulada por quitina, quitosana, glucanas, fibrilas mananas e outros componentes, que converte as células fúngicas em células Titan virulentas capazes de modulação e fuga ao sistema imunológico do hospedeiro. Enquanto essas células Titan diferem na composição da parede celular, no conteúdo citoplasmático e no tamanho das células típicas cultivadas in vitro de *C. neoformans*, elas compartilham uma cápsula de polissacarídeo (MUKAREMERA et al., 2018), alvo para peptídeos anfipáticos catiônicos que, como primeiro passo em seu mecanismo de ação ligam-se eletrostaticamente a membrana das

células ou ainda a heteropolissacarídeos carregados negativamente na matriz extracelular, como observado em células tumorais (por exemplo, glucosaminoglicanos) (TAKECHI-HARAYA et al., 2018), ou ainda a lipopolissacarídeos, ácidos lipoteicóicos e proteoglicanos da parede celular de bactérias (MUNCH e SAHL, 2015). Outros peptídeos antimicrobianos têm comportamento de penetração celular (DEL RIO et al., 2017) que permite a interação intracelular com ácidos nucléicos. Todos esses fatos enfatizam a importância de nossos achados em relação à Ctn [15-34] como agente anti-Cryptococcus capaz de matar eficientemente cepas clínicas in vitro de *C. albicans* resistentes a FLC, além de ser ativo contra suscetíveis e resistentes à AMB *C. neoformans*

O potencial de Ctn[15-34] também foi testado frente ao biofilme de *C. albicans*. O biofilme de leveduras difere das células planctônicas por apresentar maior capacidade de virulência, melhor aderência as células de mamíferos e maior resistência aos antifúngicos, especialmente aos azólicos (UPPULURI et al., 2018).

Embora todas as espécies de *Candida* sejam capazes de formar biofilme, cada espécie possui suas particularidades, como preferência para substrato, melhor pH, tempo e temperatura para sua formação. O mesmo ocorre com cepas de mesma espécie, que podem apresentar padrões de formação como temperatura e número de células diferentes para seu desenvolvimento. Aqui testamos uma cepa padrão e uma cepa resistente a fluconazol de *C. albicans*. O melhor tempo de crescimento para o biofilme foi de 72h para ambas as cepas, diferindo somente a concentração de células, com a cepa padrão precisando de 3logs menos de células para sua formação. Embora a capacidade desses micro-organismos em formar biofilme seja bastante reconhecida na clínica, sabe-se que nem todas as cepas de isolados clínicos de *Candida* possuem a capacidade de formar biofilme e, muitas outras possuem uma capacidade baixa de formação (SHERRY et al., 2014; SILVA-DIAS et al., 2015). Uma das características associadas a isso é a hidrofobicidade da superfície celular. Em *C. albicans*, estudos apontam que quanto mais hidrofóbicas são essas superfícies, maior é a capacidade de produzir o biofilme. Isso poderia justificar o fato do isolado clínico precisar de mais células para formar o biofilme que a cepa padrão.

A maioria dos medicamentos antibiofilme atuam no estágio inicial da formação do biofilme, impedindo a adesão das células e consequente formação. Aqui testamos a capacidade das drogas na inibição, ou seja, na formação do biofilme e a

erradicação, quando o biofilme já está no estágio de maturação. A atividade do biofilme ocorreu com 100xCIM do peptídeo, inibindo ambas as cepas nessa concentração. No entanto, a erradicação completa do biofilme só ocorreu na cepa ATCC 90028 (sensível ao fluconazol). O AFM revelou diferenças na morfologia entre a cepa padrão e o isolado clínico além de mostrar alterações como vesículas, bolhas e disrupção de membrana causada pelo peptídeo no biofilme tratado com 100xCIM.

Os mecanismos pelos quais Ctn[15-24] atua sobre micro-organismos são ainda pouco compreendidos. Estudos com bactérias propõem um modelo de disrupção de membrana, no qual o peptídeo interage com as células por interação eletrostática, acumula-se na célula e por fim causa danos que resultam na lise celular (PEREZ-PEINADO et al., 2018). Em leveduras estudos preliminares mostram que Ctn[15-34] causa a ruptura da membrana celular de *C. albicans*, confirmada por vazamento de lactato desidrogenase e biomarcadores de morte celular mediada por necrose (CAVALCANTE et al., 2017). Mecanismos secundários, como ligação ao DNA também podem estar envolvidos.

Diante da ausência de fluorescência intrínseca do peptídeo, causada pela falta de resíduos de triptofano e tirosina, estudos de interação molécula/lipídeo foram realizadas utilizando somente a emissão de fluorescência por di-8-ANEPPS. Esta sonda é sensível a alteração no potencial dipolar da membrana, de modo que é possível quantificar possíveis alterações dessa natureza causadas pela ligação do peptídeo. Não foi verificada interação com as membranas testadas, no entanto em células de *C. albicans* o ensaio revelou uma discreta interação.

Para medir o tamanho das vesículas foi utilizada a técnica de espalhamento de luz dinâmica ou DLS, que tem como princípio o movimento browniano das partículas, de modo que a intensidade da luz espalhada por estas segue um padrão de movimento que depende do tamanho das vesículas. Partículas menores se movimentam mais rapidamente e causam rápidas modificações no espalhamento da luz. Por outro lado, partículas de maior diâmetro, as quais possuem menores coeficientes de difusão, resultam em menores flutuações na intensidade do espalhamento da luz. Ctn[15-34] promoveu intensa agregação de *membrane like* com 50 µM. Foi testada uma concentração intermediária de 20 µM para determinar a partir de qual concentração o peptídeo é capaz de agregar as

vesículas. No entanto o resultado foi semelhante ao encontrado com 50 uM, mostrando que esse é um efeito que esse ocorre rapidamente a partir de um limite de concentração.

O potencial zeta foi utilizado para determinar a carga das células de *C. albicans* e das vesículas não tratadas e tratadas com o peptídeo. Além disso, nesse ensaio utilizamos também os protoplastos de *C. albicans* para verificar o efeito do peptídeo diretamente sobre a membrana. Ensaio com protoplastos são limitados porque quando incubadas, essas células possuem capacidade de regenerar novamente a parede celular. Além disso, observamos que depois de isolados, os protoplastos permanecem viáveis por somente cerca de 24h.

O método do potencial zeta consiste numa microeletroforese, onde é aplicado um campo elétrico através da amostra. Com isso, as partículas carregadas se deslocam com velocidades distintas induzindo deslocamentos da frequência do feixe de luz incidente, gerando um espectro de frequências, que são então utilizadas para os cálculos das velocidades, as quais são convertidas para valores de mobilidades eletroforéticas (FREIRE et al., 2011). Foi observado efeito do peptídeo sobre a carga somente nos protoplastos e *membrane like*.

Sabe-se que os PAMs podem assumir mais de uma orientação na membrana, inserindo-se dentro da bicamada lipídica ou são orientados na superfície da bicamada lipídica. No caso de Ctn[15-34], o potencial zeta menos negativo de *membrane like* e protoplastos sugere que o peptídeo incorpora-se na superfície da bicamada lipídica contribuindo para uma carga superficial menos aniônica.

7. CONCLUSÕES

As crotalidinas apresentaram atividade antifúngica comprovada in vitro contra cepa de *C. albicans* resistente a fluconazol e *C. neoformans* resistente a fluconazol e anfotericina, com CIMs na mesma faixa que os apresentados para cepas sensíveis.

A análise de expressão gênica mostrou superexpressão de genes de resistência em cepa com fenótipo de resistência para fluconazol.

As crotalidinas não apresentaram efeito sinérgico quando associadas com fluconazol frente a cepas de *C. albicans* e *C. neoformans*.

Ctn[15-34] inibiu o biofilme de *C. albicans*, tanto sensível como resistente ao fluconazol. No entanto, erradicação do biofilme pré-formado só ocorreu na cepa sensível. Microscopia de força atômica revelou que Ctn[15-34] causa alterações na morfologia da célula, inclusive disrupção de membrana.

Os ensaios espectroscópicos mostraram que o peptídeo causa alteração no potencial de membrana. A redução da carga de *membrane like* e protoplastos mostram que o peptídeo é capaz de despolarizar a membrana. Portanto, os achados indicam que o peptídeo exerce sua atividade antifúngica principalmente por via de penetração na membrana celular possivelmente causando danos na superfície celular.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, G.; DELGADO, C.; CORRALES, I.; IZQUIERDO, A.; GRACIA, E.; MORENO, T.; ROMERO, E.; FERRANDO, C. *et al.* Epidemiology of invasive candidiasis in a surgical intensive care unit: an observational study. **BMC Res Notes**, v.8, p.491, 2015.
- AKINS, R.A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. **Med. Mycol.** v.43, p.285-318, 2005.
- ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; MELHEM, M.S.; BONFIETTI, L.X.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. **Rev Inst de Med Trop São Paulo**. 57 Suppl 19, p.57-64, 2015.
- AL-FATTANI, M.A.; DOUGLAS, L.J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **J Med Microbiol.** v.55, n.Pt8, p.999–1008, 2006.
- ASHBEE, H.R.; GILLEECE, M.H. **Pharmacogenomics of antifungal agentes. In: Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine.** Elsevier. Cap.38. p. 879-900, 2014.
- ARAUJO, G.R.S.; SOUZA, W.; FRASES, S. The hidden pathogenic potential of environmental fungi. **Future Microbiol.** v.12, p.1533-1540, 2017.
- BANERJEE, P.; HAIDER, M.; TREHAN, V.; MISHRA, B.; THAKUR, A.; DROGA, V.; LOOMBA, P. *Cryptococcus laurentii* fungemia. **Indian J Med Microbiol.** v.31, n.1, p.75-77, 2013.
- BANDEIRA, I.C.J.; BANDEIRA-LIMA, D.; MELLO, C.P.; PEREIRA, T.P.; MENEZES, R.R.P.P.B.; SAMPAIO, T.L.; FALCÃO, C.B.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; MARTINS, A.M.C. Antichagasic effect of crotalicidin, a cathelicidin-like viperacidin, found in *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake's venom gland. **Parasitology.** v.145, n.8, p.1-6, 2017.
- BECHINGER, B.; GORR, S.U. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. **J Dent Res.** v.96, n.3, p.254–260, 2017.
- BONDARYK, M.; STANISZEWSKA, M.; ZIELINSKA, P.; URBANCZYK-LIPKOWSKA, Z. Natural antimicrobial peptides as inspiration for design of a new generation antifungal compounds. **J Fungi.** v.3, n.3, pii: E46, 2017.
- BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R.O.; DENNING, D.W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **Fungi.** v.3, n.4, 2018.
- BOUZA, E.; GUINEA, J.; GUEMBE, M. The Role of Antifungals against *Candida* Biofilm in Catheter-Related Candidemia. **Antibiotics.** v.4, n.1, p.1-17, 2015.

BRANDENBURG, L.; MERRES, J.; ALBRECHT, L.; VAROGA, D. PUFE, T. Antimicrobial Peptides: Multifunctional Drugs for Different Applications. **Polymers** v.4, p.539-560, 2012.

BULBAKE, U.; DOPPALAPUDI, s.; KOMMINENI, N.; KHAN, W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. **Pharmaceutics**. v.9, n.2, P.1-33, 2017.

BULUSU, K.C.; GUHA, R.; MASON, D.J.; LEWIS, R.P.; MURATOV, E.; KALANTAR, M.Y.; COKOL, M.; BENDER, A. Modelling of compound combination effects and applications to efficacy and toxicity: state-of-the-art, challenges and perspectives. **Drug Discov Today**. v.21, n.2, p.225-238, 2016.

CASADEVAL, A.; COELHO, C.; ALANIO, A. Mechanisms of *Cryptococcus neoformans*-Mediated Host Damage. **Front Immun**. v.9, n.855, 2018.

CAVALCANTE, C.S.; FALCAO, C.B.; FONTENELLE, R.O.; ANDREU, D.; RADIS-BAPTISTA, G. Anti-fungal activity of Ctn[15-34], the C-terminal peptide fragment of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin. **J Antibiot**. v.70, n.3, p.231-237, 2017.

CAVALCANTE, C.S.P.; DE AGUIAR, F.L.L.; FONTENELLE, R.O.S; MENEZES, R.R.P.P.B.; MARTINS, A.M.C.; FALCÃO, C.B.; ANDREU, D.; RADIS-BAPTISTA, G. Insights into the candidacidal mechanism of Ctn[15-34] - a carboxyl-terminal, crotalicidin-derived peptide related to cathelicidins. **J Med Microbiol**. v.67, n.1, p.129-138, 2018.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M.C. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. **Front Med**. v.5, n.28, p. 1-28, 2018.

CHEN, Y.; FARRER, R.A.; GIAMBERARDINO, C.; SAKTHIKUMAR, S.; JONES, A.; YANG, T.; TENOR, J.L.; WAGIH, O., et al. Microevolution of Serial Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *C. gattii*. **MBio**. v.8, n.2, p.1-18, 2017.

CHENG, M.F.; CHIOU, C.C.; LIU, Y.C.; WANG, H.Z.; HSIEH, K.S. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. **J Clin Microbiol**. v.39, n.4, p.1608-1611, 2001.

Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast**. Third Edition: Approved Standard M27-A3. CLSI: Wayne, PA, USA, 2008.

DEBNATH, S.; ADDYA, S. Structural basis for heterogeneous phenotype of ERG11 dependent Azole resistance in *C.albicans* clinical isolates. **Springerplus**. v.3, n.660, p.1-16, 2014.

DEL RIO, G.; KLIPP, E.; HERRMANN, A. Using Confocal Microscopy and Computational Modeling to Investigate the Cell-Penetrating Properties of Antimicrobial Peptides. **Methods Mol Biol**. v.1548, p.191-199, 2017.

DEORUKHKAR, S.; ROUSHANI, S. Virulence Traits Contributing to Pathogenicity of *Candida* Species. **Microbiol Exp.** v.5, n.1, p.1-5, 2017.

DEORUKHKAR, S.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. **Int J Microbiol.** v.2014, n.1, p.1-6, 2014.

DESTOUMIEUX-GARZON, D.; ROSA, R.D.; SCHMITT, P.; BARRETO, C.; VIDAL-DUPIOL, J.; MITTA, G.; GUEGUEN, Y.; BACHÉRE, E. Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. **Philos Trans R Soc Lond B Bio Sci.** v.371, n.1695, p.1-11, 2016.

DUBOS, R.J. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: I. Preparation of the agent. Its activity *in vitro*. **J. Exp. Med.** v.70, p.1–10, 1939.

EDDOUZI, J.; PARKER, J.E.; VALE-SILVA, L.A.; COSTE, A.; ISCHER, F.; KELLY, S.; MANAI, M.; SANGLARD, D. Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from Tunisian hospitals. **Antimicrob Agents Chemother.** v.57, n.7, p.3182-3193, 2013.

ENOCH, D.A.; YANG, H.; ALIYU, S.H.; MICALLEF, C. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. **Methods Mol Biol.** v.1508, p.17-65, 2017.

ESHER, S.K.; ZARAGOZA, O.; ALSPAUGH, J.A. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 113, n.7, p.1-15, 2018.

FALCAO, C.B.; DE LA TORRE, B.G.; PEREZ-PEINADO, C.; BARRON, A.E.; ANDREU, D.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Viperacidins: a novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers. **Amino acids,** v.46, n.11, p.2561-2571, 2014.

FALCAO, C.B.; PEREZ-PEINADO, C.; DE LA TORRE, B.G.; MAYOL, X.; ZAMORA-CARRERAS, H., JIMÉNEZ, M.A., RÁDIS-BAPTISTA, G., ANDREU, D. Structural Dissection of Crotalicidin, a Rattlesnake Venom Cathelicidin, Retrieves a Fragment with Antimicrobial and Antitumor Activity. **J Med Chem.** v.58, n.21, p.8553-8563, 2015.

FREIRE, J.M.; DOMINGUES, M.M.; MELO, M.N.; CASTANHO, M.A.R.B. Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes. **Eur Biophys.** v.40, n.4, p.481-487, 2011.

GALOCHA, M.; PAIS, P.; CAVALHEIRO, M.; PEREIRA, D.; VIANA, R.; TEIXEIRA, M.C. Divergent Approaches to Virulence in *C. albicans* and *C. glabrata*: Two Sides of the Same Coin. **Int J Mol Sci.** v.20, n.9, p. 2019.

GIULIANI, A.; PIRRI, G.; BOZZI, A.; DI GIULIO, A.; ASCHI, M.; RINALDI, A.C. Antimicrobial peptides: natural templates for synthetic membrane-active compounds. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.65, p. 2450-2460,2008.

GU, W.; XU, D.; SUN, D. In vitro models to study *Candida albicans* biofilm. **J Pharmaceuticals Drugs Development**. v.3, n.3, p.1-11, 2015.

HASHIMOTO, S. Micafungin: a sulfated echinocandin. **J Antibiot.** v. 62, n.1, p.27-35, 2009.

HENRY, K.W.; NICKELS, J.T.; EDLIND, T.D. Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. **Antimicrob Agents Chemother.** v.44, n.10, p.2693–2700, 2000.

HORI, Y.; SHIBUYA, S. Role of FKS in the susceptibility of pathogenic fungi to echinocandins. **J Med Mycol.** v. 59E, p.E31-E40, 2018.

JOSEPH-HORNE, T.; HOLLOMON, D.; LOEFFLER, R.S.; KELLY, S.L. Cross-resistance to polyene and azole drugs in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.39, n.7, p.1526-1529, 1995.

KANG, S.J.; PARK, S.J.; MISHIG-OCHIR, T.; LEE, B.J. Antimicrobial peptides: therapeutic potentials. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.12, n.12, p.1477-86, 2014.

KARTSONIS, A.; NIELSEN, J.; DOUGLAS, C.M. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. **Drug Resistance Updates.** v.6, p.197–218, 2003.

KATHIRAVAN, M. K., SALAKE, A. B., CHOTHE, A. S., DUDHE, P. B., WATODE, R. P., MUKTA, M. S., & MURATA, M.: The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic Medic Chem.**v.20, n.19, p.5669-5677, 2012.

KWOLEK-MIREK, M.; ZADRAG-TECZA, R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. **FEMS Yeast Res.** v.14, n.7, p.1068-1079, 2014.

KIMURA, Y.; TANAKA, K. Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. **J Biochem.** v.147, n.6, p. 793–798, 2010.

KOO, H.B.; SEO, J. Antimicrobial peptides under clinical investigation. **Pept Scien.** v.111, n.5, 2019.

KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J.N.; STRAUS, S.K. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. **Biomolecules.** v.8, n.1, p.1-24, 2018.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E.; WICKES, B.L.; MEYER, W.; CUOMO, C.A. *et al.* A. The Case for Adopting the “Species Complex” nomenclature for the etiologic agents of Cryptococcosis. **MSphere.** v.2, pii: e00357-16, 2017.

LEE, C.H.; CHANG, T.Y.; LIU, J.W.; CHEN, F.J.; CHIEN, C.C.; TANG, Y.F.; LU, C.H. Correlation of anti-fungal susceptibility with clinical outcomes in patients with cryptococcal meningitis. **BMC Infect Dis.** v.12, n.361, p.1-9, 2012.

LI, Q. Q.; SKINNER, J.; BENNETT, J.E. Evaluation of reference genes for real-time quantitative PCR studies in *Candida glabrata*. **BMC Molecular Biology.** v.13, n.22, p.1-13, 2012.

LOFFLER, J.; EINSELE, H.; HEBART, H.; SCHUMACHER, U.; HRASTNIK, C.; DAUM, G. Phospholipid and sterol analysis of plasma membranes of azole-resistant *Candida albicans* strains. **FEMS Microbiol Lett.** v.185, n.1, p.59-63, 2000.

MADA, P.K.; JAMIL, R.T.; ALAM, M.U. Cryptococcus (Cryptococcosis) [Atualizado em agosto de 2019]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019.

MALIK, D.K.; BABOOTA, S.; AHUJA, A.; HASAN, S.; ALI, J. Recent advances in protein and peptide drug delivery systems. **Curr Drug Deliv.** v.4, n.2, p.141-151, 2007.

MALLAPRAGADA, S.; WADHWA, A.; AGRAWAL, P. Antimicrobial peptides: The miraculous biological molecules. **J Indian Soc Periodontol.** v.21, n.6, p.434-438, 2017.

MANFREDI, R.; FULGARO, C.; SABBATANI, S.; LEGNANI, G.; FASULO, G. Emergence of amphotericin B-resistant *Cryptococcus laurentii meningoencephalitis* shortly after treatment for *Cryptococcus neoformans meningitis* in a patient with AIDS. **AIDS Patient Care STDS.** v.20, n.4, p.227-232, 2006.

MANZINI, M.C.; PEREZ, K.R.; RISKE, K.A.; BOZELLI JR., J.C.; SANTOS, T.L.; SILVA, M.A.; SARAIVA, G.K.V.; POLITI, M.J.; VALENTE, A.P.; ALMEIDA, F.C.L.; CHAIMOVICH, H.; RODRIGUES, M.; BEMQUERER, M.P.; SCHREIER, S.; CUCCOVIA, J.M. Peptide:lipid ratio and membrane surface charge determine the Mechanism of action of the antimicrobial peptide BP100. Conformational and functional studies. **Biochim Biophys Acta.** v.1838, n.7, p.1985–1999, 2014.

MATEJUK, A.; LENG, Q.; BEGUM, M.D.; WOODLE, M.C.; SCARIA, P.; CHOU, S.T.; MIXSON, A.J. Peptide-based Antifungal Therapies against Emerging Infections. **Drugs Future.** v.35, n.3, p.1-35, 2010.

MAUBON, D., GARNAUD, C., CALANDRA, T., SANGLARD, D., CORNET, M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? **Intensive Care Med.** v.40, n.9, p.1241-1255, 2014.

MAZZONI, C.; TORELLA, M.; PETRERA, A.; PALERMO, V.; FALCONE, C. PGK1, the gene encoding the glycolytic enzyme phosphoglycerate kinase, acts as a multicopy suppressor of apoptotic phenotypes in *S. cerevisiae*. **Yeast.** v.26, n.1, p.31–37, 2009.

MCCARTHY, M., O'SHAUGHNESSY, E.M., WALSH, T.J. Amphotericin B: Polyene Resistance Mechanisms. In: **Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug**

Resistance; MAYERS, D.L., SOBEL, J.D., OUELLETTE, M., KAYE, K.S., MARCHAIM, D., pp.387-395. Cham: Springer International Publishing, 2017.

MELLO, C.P., LIMA, D.B., MENEZES, R.R., BANDEIRA, I.C., TESSAROLO, L.D., SAMPAIO, T.L., FALCÃO, C.B., RÁDIS-BAPTISTA, G., MARTINS, A.M. (2017) Evaluation of the antichagasic activity of batroxicidin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in *Bothrops atrox* venom gland. **Toxicon**. v.130, p.56-62, 2017.

MESA-ARANGO, A.C., RUEDA, C., ROMAN, E., QUINTIN, J., TERRÓN, M.C., LUQUE, D., NETEA, M.G., PLA, J., ZARAGOZA. O. Cell Wall Changes in Amphotericin B-Resistant Strains from *Candida tropicalis* and Relationship with the Immune Responses Elicited by the Host. **Antimicrob Agents Chemother**. v.60, n.4, p.2326-2335, 2016.

MOJSOKA, B.; JENSSEN, H. Peptides and Peptidomimetics for Antimicrobial Drug Design. **Pharmaceuticals**, v.8, p.366-415, 2015.

MOLINA-LEYVA, A., RUIZ-CARRASCOSA, J.C., LEYVA-GARCIA, A., HUSEIN-ELAHMED, H. Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in an immunocompetent child. **Int J Infec Dis**. v.17, n.12, e1232-3, 2013.

MONTEIRO, D.R.; FERESIN, L.P.; ARIAS, L.S.; BARÃO, V.A.R.B.; BARBOSA, D.B.; DELBEM, A.C.B. Effect of tyrosol on adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to acrylic surfaces. **Med Mycol**. v.53, n.7, p.656-665, 2015.

MOURAD, A., PERFECT, J.R. Tolerability profile of the current antifungal armoury. **J Antimicrob Chemother**. v.73, i26-i32, 2018.

MUKAREMERA, L.; LEE, K.K.; WAGENER, J.; WIESNER, D.L.; GOW, N.A.R.; NIELSEN, K. Titan cell production in *Cryptococcus neoformans* reshapes the cell wall and capsule composition during infection. **Cell Surf**. v.1, p.15-24, 2018.

MUNCH, D.; SAHL, H.G. Structural variations of the cell wall precursor lipid II in Gram-positive bacteria - Impact on binding and efficacy of antimicrobial peptides. **Biochim Biophys Acta**. v.1848, n.11 Pt B, p.3062-3071, 2015.

NEVES, R.P.; LIMA NETO, R.G.; LEITE, M.C.; SILVA, V.K.; SANTOS, F.A.; MACÊDO, D.P. *Cryptococcus laurentii* fungaemia in a cervical cancer patient. **Braz J Infect Dis**. v.19, n.6, p.660-663, 2015.

NICOLA, A.M.;ALBUQUERQUE, P.; PAES, H.C.; FERNANDES, L.; COSTA, F.F.; KIOSHIMA, E.S.; ABADIO, A.K.R.; BOCCA, A.R.; FELIPE, M.S. Antifungal drugs: New insights in research & development. **Pharmacology and Therapeutics**. v.195, p.21-38, 2018.

NOBILE, C.J.; JOHNSON, A.D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annu Rev Microbiol**.v.69, p.71-92, 2015.

O' MEARA, T.R.; ALSPAUGH, J.A. The *Cryptococcus neoformans* Capsule: a Sword and a Shield. **Clin Microbiol Rev.** v.25, n.3, p. 387–408, 2012.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J Antimicrob Chemother.** v.52, n.1, p.1, 2003.

OLIVA, R.; DEL VECCHIO, P.; GRIMALDI, A.; NOTOMISTA, E.; CAFARO, V.; PANE, K.; SCHUABB, V.; WINTER, R.; PETRACCONE, L. Membrane disintegration by the antimicrobial peptide (P)GKY20: lipid segregation and domain formation. **Phys Chem Chem Phys** v.21, n.7, p.3989-3998, 2019.

PAL, M.; DAVE, P. Cryptococcosis: An Emerging Airborne Mycosis of Global Concern. **Air Water Borne Dis.** v.5, p.127, 2016.

PASUPULETI, M.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. **Crit Rev in Biotechnol.**v.32, n.2, p.143–171, 2011.

PFALLER, M.A.; PAPPAS P.G.; WINGARD, J.R. Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends Epidemiology of Invasive Mycoses. **Clin Infect Dis.** v.43, p.S3–14, 2006.

PFALLER, M.A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **Am J Med.** v.125, 2012.

PRASAD, R.; RAWAL, M.K.; SHAH, A.H. *Candida* Efflux ATPases and Antiporters in Clinical Drug Resistance. **Adv Exp Med Biol.** v.892, p.351-376, 2016.

PRASAD, R.; De WERGIFOSSE, P.; GOFFEAU, A.; BALZI, E. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. **Curr Genet.** v.27, n.4, p.320-9, 1995.

PURI, S.; EDGERTON, M. How Does It Kill?: Understanding the Candidacidal Mechanism of Salivary Histatin 5. **Eukaryot Cell.** v.13, n.5, p. 958 –964, 2014.

PEREZ-PEINADO, C.; DIAS, S.A.; DOMINGUES, M.M.; BENFIELD, A.H.; FREIRE, J.M.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; GASPAR, D, CASTANHO, M.A.R.B.; CRAIK, D.J. et al. Mechanisms of bacterial membrane permeabilization by crotalicidin (Ctn) and its fragment Ctn(15-34), antimicrobial peptides from rattlesnake venom. **J Biol Chem.** v.293, p.1536-1549, 2018.

RÁDIS-BAPTISTA, G., KERKIS, A., PRIETO-SILVA, A. R., HAYASHI, M.A.F., Kerkis, I., Yamane, T. Membrane-active peptides and toxins: from nature to the bedside. **J. Brazil. Chem. Soc.** v.19, n.2, p.211-225, 2008.

RIZZA, M.D., DELLAVALLE, P.D., NARANCIO, R., CABRERA, A., FERREIRA, F. Biomolecules as host defense weapons against microbial pathogens. **Recent Pat DNA Gene Seq.** v.2, p.82-96, 2008.

RODRÍGUEZ, D.A.; PINILLA, A.P. *Cryptococcus laurentii* infection of central catheter in critically ill child: in regards to a case and literature review. **Infec.** v.16, n.1, p.72-74, 2012.

RONCEVIC, T.; PUIZINA, J.; TOSSI, A. Antimicrobial Peptides as Anti-Infective Agents in Pre-Post-Antibiotic Era?. **Int J Mol Sci.** v.22, n.20, 2019.

SARDI, J.C., SCORZONI, L., BERNARDI, T., FUSCO-ALMEIDA, A.M., MENDES GIANNINI, M.J. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J Med Microbiol.** v.62, p.10-24, 2013.

SANGLARD, D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. **Front Med.** v.3, v.11, p.1-10, 2016.

SEBAA, S.; BOUCHERIT-OTMANI, Z.; COURTOIS, P. Effects of tyrosol and farnesol on *Candida albicans* biofilm. **Molecular medicine reports.** v.19, p.3201-3209, 2019.

SHERRY, L.; RAJENDRAN, R.; LAPPIN, D.F.; BORGHI, E.; PERDONI, F.; FALLENI, M.; TOSI, D.; SMITH, k.; WILLIAMS, C.; JONES, B.; NILE, C.J.; RAMAGE, G. Biofilms formed by *Candida albicans* bloodstream isolates display phenotypic and transcriptional heterogeneity that are associated with resistance and pathogenicity. **BMC Microbiology.** v.14, n.182, p.1-14, 2014.

SILVA-DIAS, A.; MIRANDA, I.M.; BRANCO, J.; MONTEIRO-SOARES, M.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. v.8, p.1-8, 2015.

SILVA, S.; RODRIGUES, C.F.; ARAÚJO, D.; RODRIGUES, M.E.; HENRIQUES, M. *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. **J.Fungi.** v.3, n.8, p.1-17, 2017

SMITH, K.D.; ACHAN, B.; HULLSIEK, K.H.; MCDONALD, T.R.; OKAGAKI, L.H.; ALHADAB, A.A.; AKAMPURIRA, A.; RHEIN, J.R., *et al.* Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. **Antimicrob Agents Chemother.** v.59, p.7197-7204, 2015.

SMITH, N., SEHRING, M., CHAMBERS, J., PATEL, P. Perspectives on non-neoformans cryptococcal opportunistic infections. **J Community Hosp Intern Med Perspect.** V.7, p.214-217, 2017.

SULEYMAN, G.; ALANGADEN, J. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. **Infect Dis Clin North Am.** v.30, n.4, p.1023-1052, 2016.

TAKECHI-HARAYA, Y.; SAITO, H. Current Understanding of Physicochemical Mechanisms for Cell Membrane Penetration of Arginine-rich Cell Penetrating Peptides: Role of Glycosaminoglycan Interactions. **Curr Protein Pept Sci.** v.19, p.623-630, 2018.

TSCHERNER, M.; SCHWARZMULLER, T.; KUCHLER, K. Pathogenesis and Antifungal Drug Resistance of the Human Fungal Pathogen *Candida glabrata*. **Pharmaceuticals**. v.4, p.169-186, 2011.

TSUI, C.; KONG, E.F.; JABRA-RIZK, M.A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and Disease**. v.74, ftw018 2016.

UPPULURI, P.; ZALDÍVAR, M.A.; ANDERSON, M.Z.; DUNN, M.J.; BERMAN, J.; RIBOT, J.L.L.; KÖHLER, J.R. *Candida albicans* Dispersed Cells Are Developmentally Distinct from Biofilm and Planktonic Cells. **MBio**. v.9, n.4, pii: e01338-18, 2018.

VANDEPUTTE, P.; TRONCHIN, G.; LARCHER, G.; ERNOULT, E.; BERGÈS, T.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J.P. A nonsense mutation in the ERG6 gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*. **Antimicrob Agents Chemother**. v.52, p.3701-3709, 2008.

VIEIRA-GIRAO, P.R.N.; FALCÃO, C.B.; ROCHA, I.; LUCENA, H.M.R.; COSTA, F.H.F.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Antiviral Activity of Ctn[15-34], A Cathelicidin-Derived Eicosapeptide, Against Infectious Myonecrosis Virus in *Litopenaeus vannamei* Primary Hemocyte Cultures. **Food Environ Virol**. v.9, p.277-286, 2017.

VINCENT, B.M.; LANCASTER, A.K.; SCHERZ-SHOVAL, R.; WHITESELL, L.; LINDQUIST, S. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. **PLoS Biol**. v.11, e1001692, 2013.

VLIEGHE, P.; LISOWSKI, V.; MARTINEZ, J.; KHRESTCHATISKY, M. (2010) Synthetic therapeutic peptides: science and market. **Drug Discov Today**. v.15, p.40-56, 2010.

WANG, G. Improved Methods for Classification, Prediction and Design of Antimicrobial Peptides. **Methods Mol Biol**. v.1268, p.43–66, 2015.

WANG, L.; ZHU, X. Heat-shock protein 90 in *Candida albicans*. **Chinese Science Bulletin**. v. 45, n.6, p.481- 484, 2000.

WATSON, H. Biological membranes. **Essays Biochem**. v.59, p.43–70, 2015.

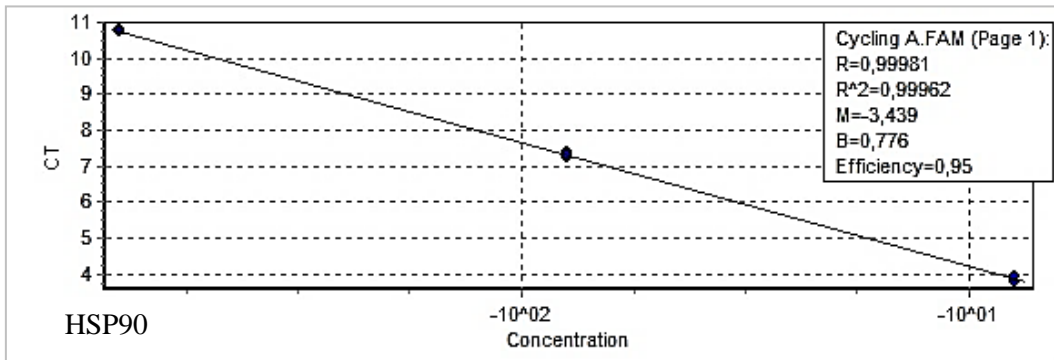
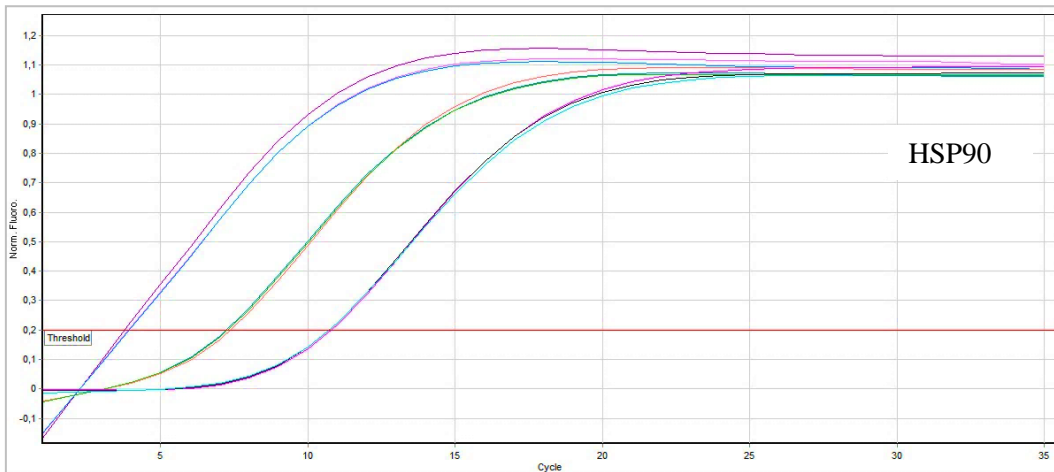
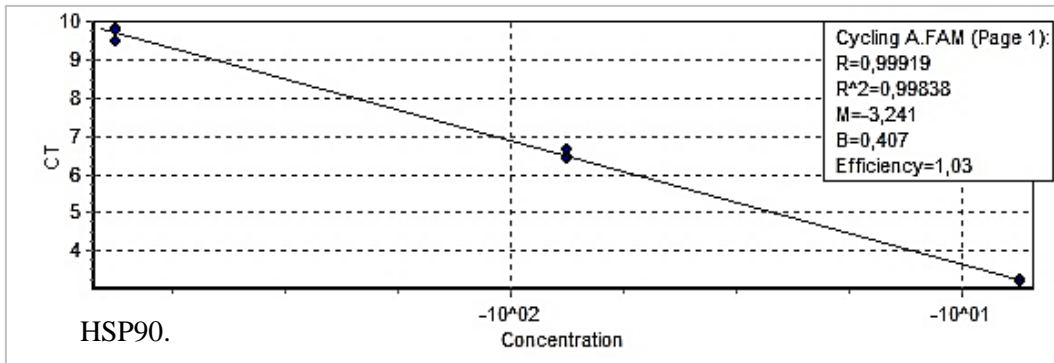
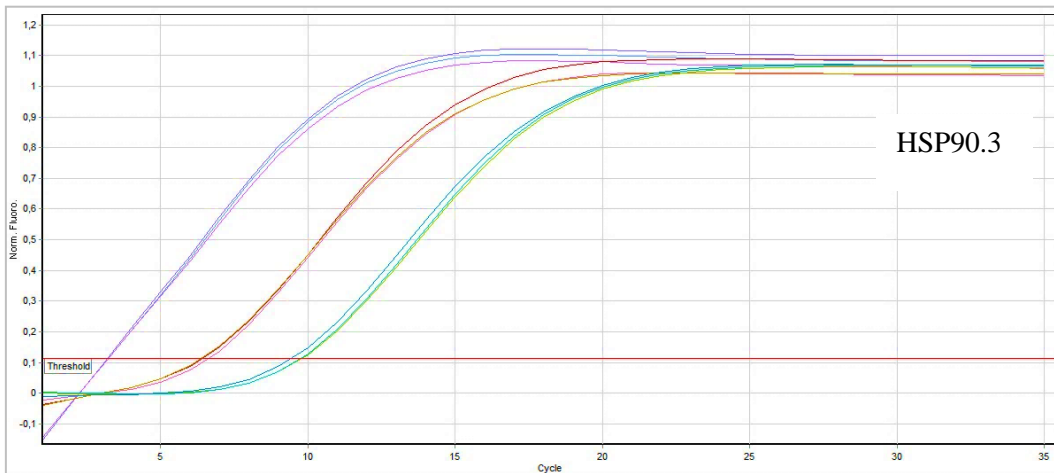
YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Ther Clin Risk Manag**. v.10, p.95-105, 2014.

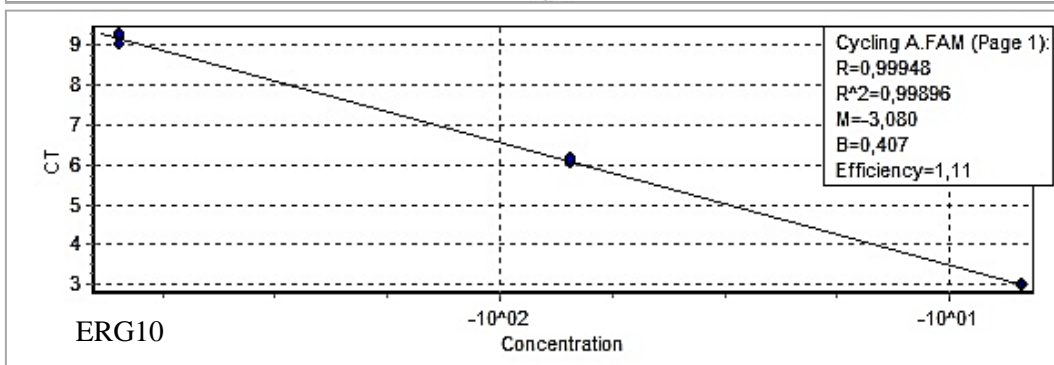
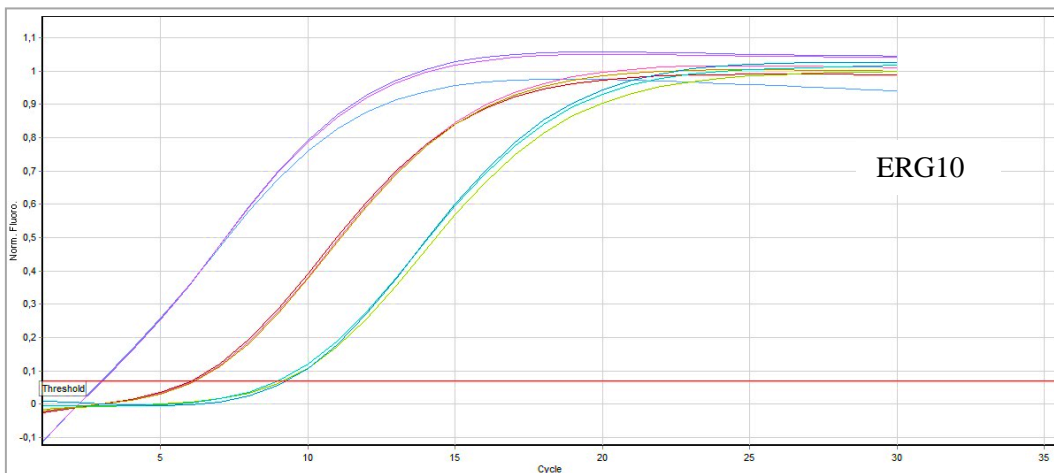
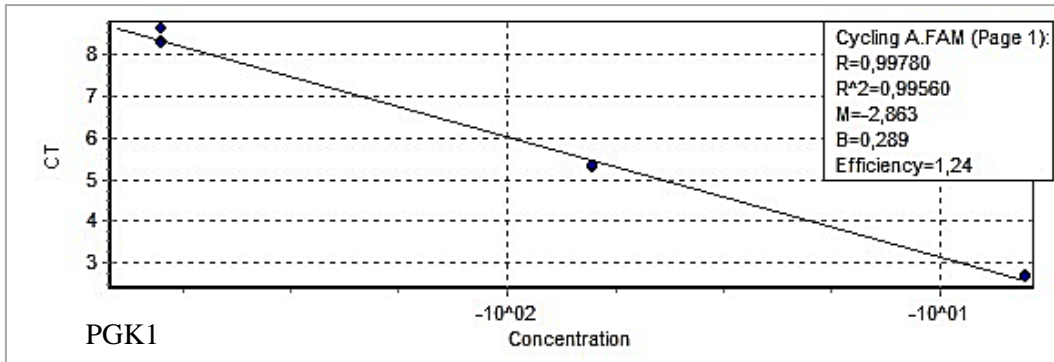
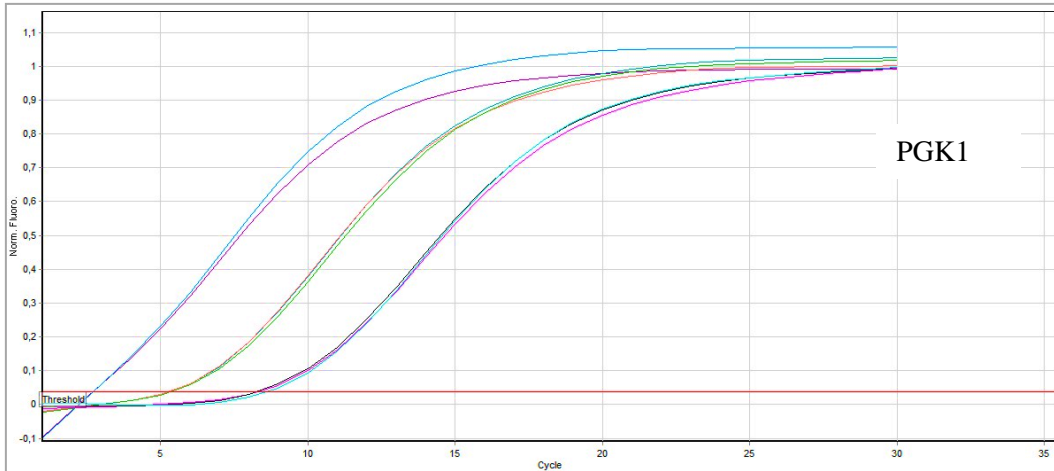
ZANG, J.; LI, L.; QUANZHEN, L.V.; LAN, Y.; YAN, W.; YUANYING, J. The Fungal CYP51s: Their Functions, Structures, Related Drug Resistance, and Inhibitors. **Front Microbiol**. v.10, p.1-17, 2019.

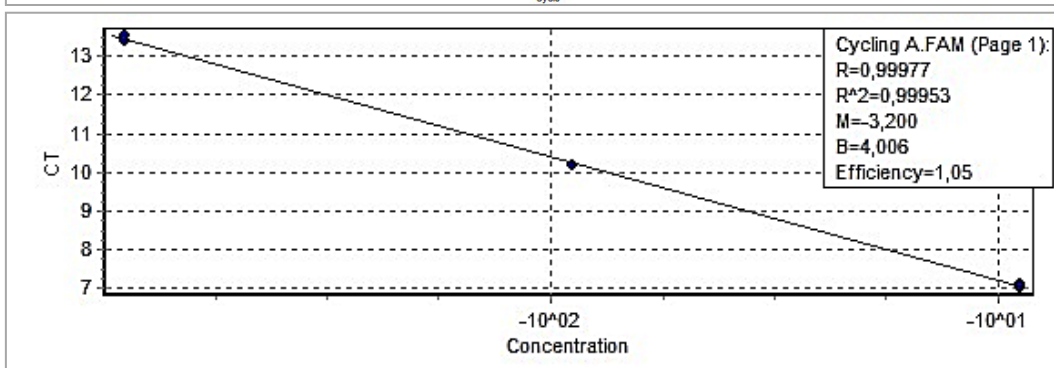
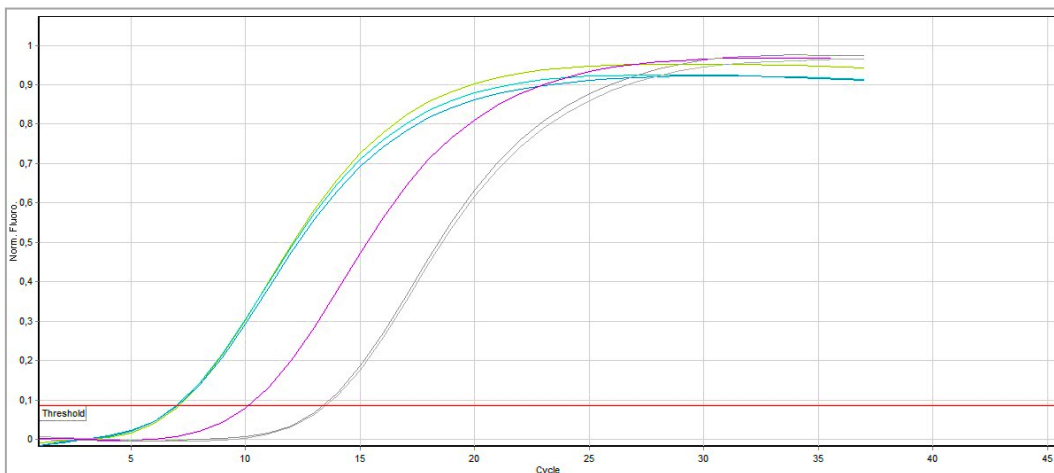
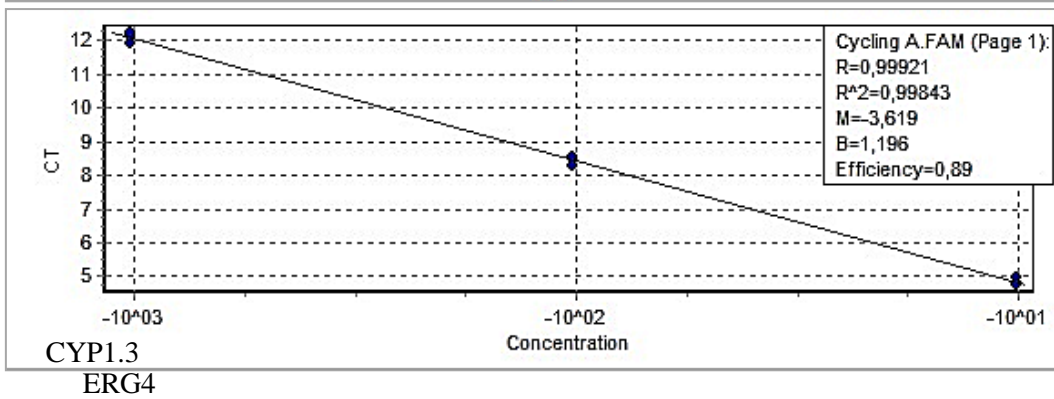
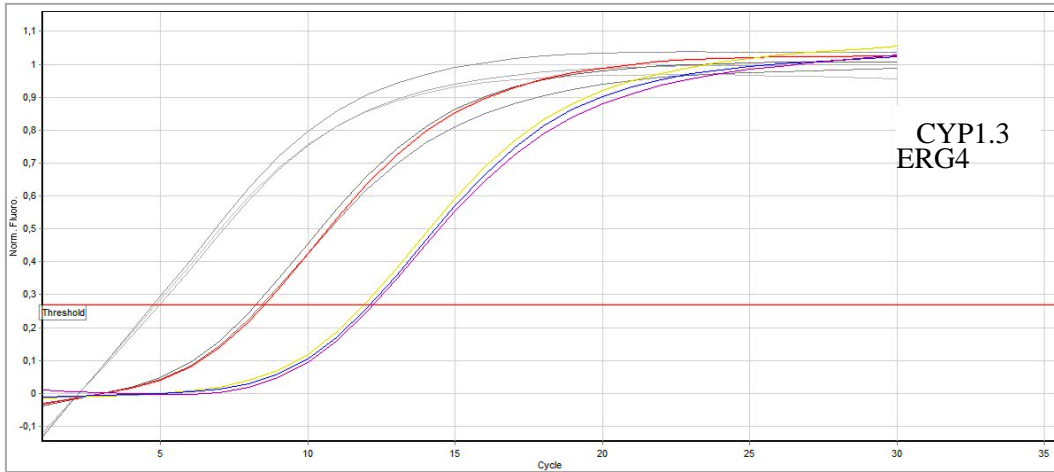
APÊNDICES

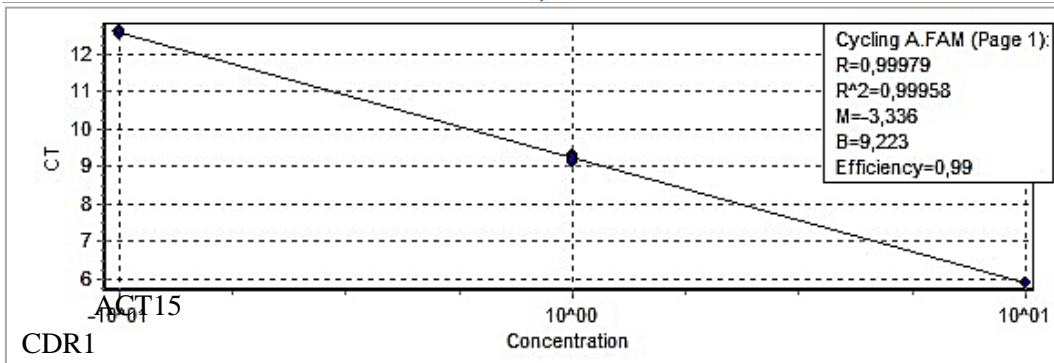
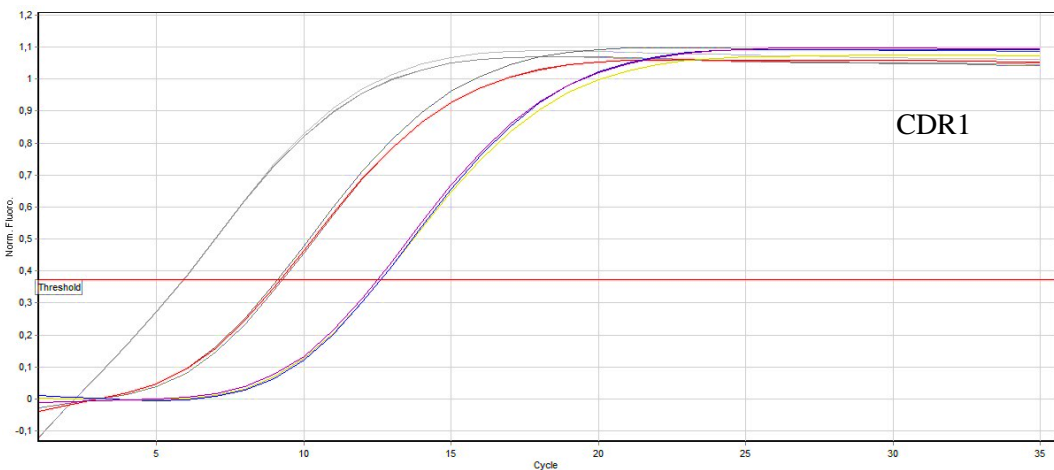
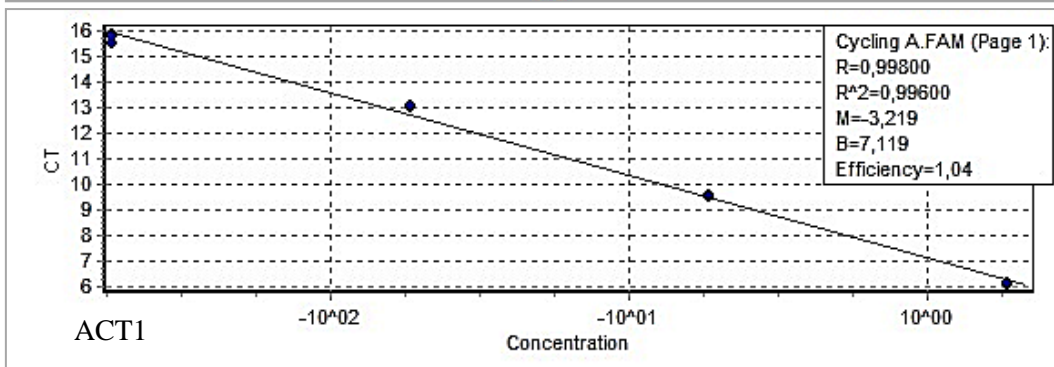
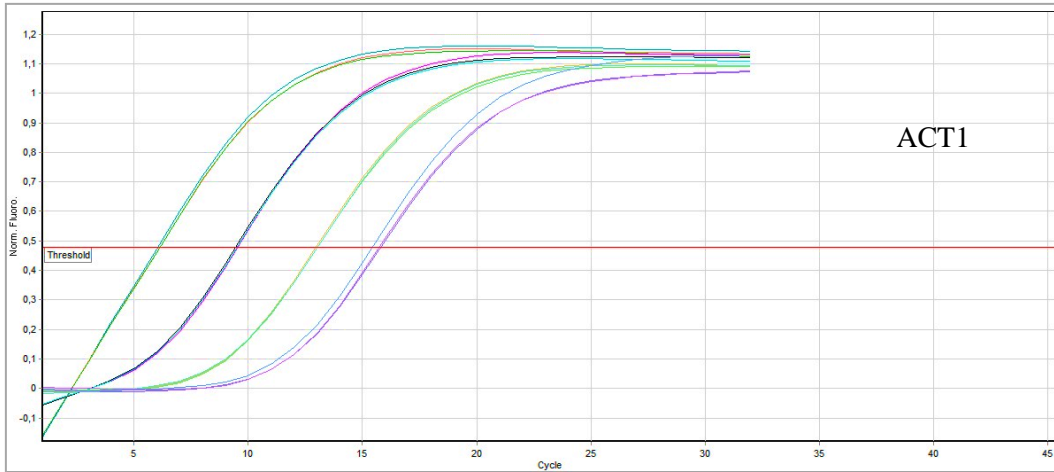
APÊNDICE A

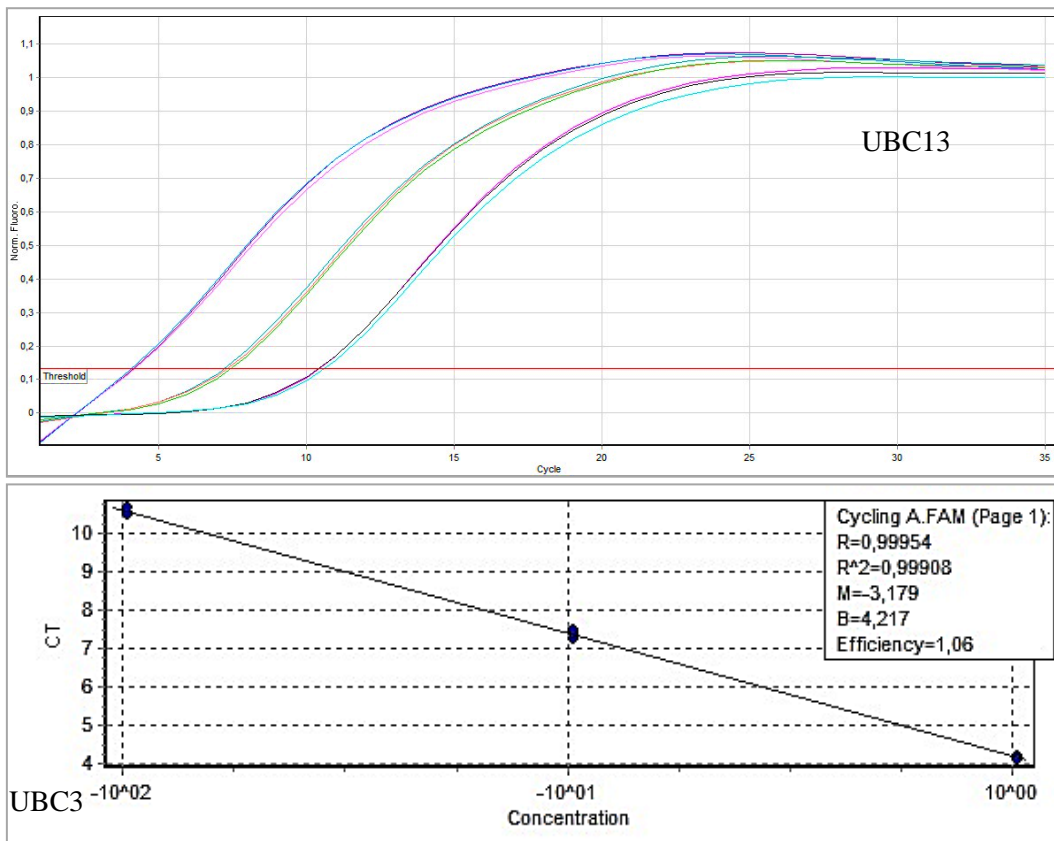
Curvas Padrão de qPCR











Curvas de titulação para as concentrações de cDNA de *C. albicans*. Os gráficos representam a fluorescência detectada em função do número de ciclos para cada um dos genes alvo.

ORIGINAL ARTICLE

The antiproliferative peptide Ctn[15-34] is active against multidrug-resistant yeasts *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*

F.L.L.deAguiar^{1,2}, C.S.d.P. Cavalcante^{2,3}, R.O.dosSantos Fontenelle^{3,4}, C.B. Falcão^{1,2} ,
D. Andreu⁵  and G. Rádis-Baptista^{1,2} 

- 1 Laboratory of Biochemistry and Biotechnology, Institute of Marine Sciences, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil
- 2 Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil
- 3 Center for Science and Technology, State University of Ceará, Fortaleza, Brazil
- 4 Center for Agricultural and Biological Sciences, Acaraú Valley State University, Sobral, Brazil
- 5 Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona Biomedical Research Park, Barcelona, Spain

Keywords

antimicrobial peptide (AMP), *C. albicans*, clinical isolates, crotalidicin peptides, *Cryptococcus neoformans*, drug-resistant yeasts.

Correspondence

Gandhi Rádis-Baptista, Institute for Marine Sciences, Federal University of Ceará, Av. da Abolição, 3207, Meireles, 60165081 Fortaleza-Ceara, Brazil.
E-mail: gandhi.radis@ufc.br

2019/0423: received 9 March 2019, revised 18 September 2019 and accepted 5 October 2019

doi:10.1111/jam.14493

Abstract

Aims: Crotalidicin (Ctn), a cathelicidin-related antimicrobial peptide from the South American rattlesnake venom gland, and its C-terminal Ctn[15-34] fragment, have exhibited important activities against micro-organisms, trypanosomatid protozoa and certain lines of tumour cells. Herein, the activity against clinical strains of fluconazole-resistant *Candida albicans* and of amphotericin B and fluconazole-resistant *Cryptococcus neoformans* was investigated.

Methods and Results: Microdilution and luminescent cell viability tests were used to evaluate and compare the susceptibility of pathogenic yeasts to these peptides. The time–kill curves of the most active Ctn[15-34] alone or in combination with fluconazole against drug-resistant yeasts were determined. Concomitantly, the fungicidal and/or fungistatic effects of Ctn[15-34] were visualized by the spotting test. The peptides were active against all strains, including those resistant to antifungal agents. The association of fluconazole with both Ctn and Ctn[15-34], although not synergic, was additive. In contrast, such pattern was not observed for *C. neoformans*.

Conclusions: Overall, Ctn and Ctn[15-34] are potential antifungal leads displaying anti-yeast activities against clinical isolates endowed with drug resistance mechanisms.

Significance and Impact of the Study: The effective peptide activity against resistant strains of pathogenic yeasts demonstrates that crotalidicin-derived peptides are promising templates to develop new antifungal pharmaceuticals.

Introduction

Over the past decades there has been a significant increase in the incidence of invasive fungal infections in humans, mainly immunocompromised patients who are recognized as a risk group, such as transplanted and diabetic and AIDS patients (Enoch *et al.* 2017). *Candida* and *Cryptococcus* species are among the main aetiological agents involved in this type of opportunistic fungal infection. The genus *Candida* is composed of a heterogeneous

group of micro-organisms, with over a hundred known species (Yapar 2014). *Candida* yeasts are part of the endogenous human microbiota that usually colonize the skin and mucous membranes of the digestive, urinary and reproductive tracts (Sardi *et al.* 2013). However, the *C. albicans* species is the causative agent of most cases of candidiasis, accounting for at least 60% of the clinical isolates (Aguilar *et al.* 2015). For its part, *Cryptococcus*, the aetiological agent of opportunistic cryptococcosis, it comprises *C. gattii* and *C. neoformans* complexes, the

latter being involved in most cases of cryptococcosis worldwide, mainly in patients with AIDS (Kwon-Chung *et al.* 2017). One reason why these pathogenic yeasts can cause life-threatening infections is that they develop *in vivo* an extracellular crosslinked capsule which reshapes the fungal cell into a more virulent version capable of modulating and evading the already compromised host immune system (Mukaremera *et al.* 2018). Unlike *Candida*, *Cryptococcus* is not a part of the natural flora of the human body. These pathogenic yeasts are broadly distributed in the environment, and can frequently be isolated from soil and birds, especially pigeons (Columbidae); they also colonize several tree species. In humans, host invasion by *Cryptococcus* occurs via inhalation and causes pulmonary infection that can subsequently lead to meningitis, encephalitis or meningoencephalitis (Araujo *et al.* 2017; Chen *et al.* 2017). Although less common, *Cryptococcus* infection caused by species other than *C. neoformans* and *C. gattii*, such as *C. albidus* and *C. laurentii*, has been reported (Pal and Dave 2016). Infection caused by *C. laurentii*, in addition to inhalation, can also be vehiculated through the digestive tract and lesions in the skin. In the last 5 years, reported cases of *Cryptococcus*-related diseases include cryptococcal meningitis in HIV carriers (Manfredi *et al.* 2006), primary cutaneous cryptococcosis (Molina-Leyva *et al.* 2013), central catheter-associated infection (Rodríguez and Pinilla 2012), fungaemia in premature neonates (Cheng *et al.* 2001), infection of cancer patients (Neves *et al.* 2015), cardiovascular disease (Banerjee *et al.* 2013) and infection of immunocompromised patients (Smith *et al.* 2017).

Current chemotherapeutic strategies for invasive infections caused by these eukaryotic pathogens include azoles, amphotericin B (AMB) or echinocandins. Despite their efficacy, these agents are still far from ideal, each having drawbacks that limit optimal clinical responses. Disadvantages range from drug toxicity to drug interactions that eventually culminate in treatment interruption and failure, exposing patients' lives and contributing to the development of drug-resistant microbes (Black and Baden 2007). It is clear that efficacious, novel antifungals are required to counteract multidrug resistance and the spreading of such as untreatable microbial infections.

Antimicrobial peptides (AMPs) are gene-encoded constituents of the innate immune system of vertebrates and invertebrates, active against diverse kinds of micro-organisms, like fungi, bacteria, viruses and parasites (Rizza *et al.* 2008; Destoumieux-Garzon *et al.* 2016; Mallapragada *et al.* 2017). Their relatively broad spectrum, including action against multidrug-resistant micro-organisms, has raised interest in their potential application as antifungal candidates. Despite substantial structural diversity,

AMPs display common features such as cationicity (net positive charge) and amphipathicity (alternance of hydrophobic and positively charged amino acids residues) that underlie a general mechanism of action, namely the targeting of the plasma membrane through electrostatic and/or hydrophobic interaction, allowing the formation of pores causing extravasation of intracellular content occur and eventual microbial cell death. The relative simplicity of this mechanism also underscores the low tendency of AMPs to develop microbial resistance, although this eventually occurs for some peptide sequences and certain class of microbes, as seen in *Neisseria meningitidis* (Tzeng and Stephens 2015). In addition to pore formation and membrane disruption, AMPs exert their action by nonmembranolytic mechanisms, which rely on AMP internalization and subsequent interaction with intracellular targets (DNA, RNA and protein), nonlytic release of ATP and modulation of potassium ion efflux, to mention a few examples (Bechinger and Gorr 2017; Bondaryk *et al.* 2017). These multimodal mechanisms of action of AMPs, plus their ability to bypass biochemical and genetic mechanisms of resistance, make AMPs promising resources for the development of new antifungal agents.

Recently, crotalidin (Ctn), a 34 residue-long, linear α -helical peptide that belongs to the group of viperidins within the cathelicidin family of vertebrate antimicrobial peptides, was characterized from the venom gland of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, and its antiproliferative activity was demonstrated *in vitro* against bacteria (Falcao *et al.* 2014). Activity against trypanosomatid protozoa was also shown for Ctn, as well as for a highly conserved congener, bathroxicidin, which differs from Ctn by eight noncritical amino acid residues (Bandeira *et al.* 2017; Mello *et al.* 2017). Ctn was structurally dissected into two fragments, the 14-residue, N-terminal Ctn[1-14] and the 20-residue, C-terminal Ctn[15-34], the latter retaining most of the activity of the full-length peptide against Gram-negative bacteria and some tumour cell lines (Falcao *et al.* 2015). In Gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, the mechanism of action of Ctn[15-34] relies on membrane perturbation, cytoplasmic internalization and interaction with nucleic acids (Perez-Peinado *et al.* 2018). Additionally, Ctn[15-34] was also effective *in vitro* as an antiviral against infection myonecrosis virus (IMNV), an RNA virus that affects shrimp farms (Vieira-Girao *et al.* 2017). The antifungal properties of these peptides were also recently demonstrated against AMB-susceptible strains of yeasts and dermatophytes (Cavalcante *et al.* 2017), with the Ctn[15-34] killing mechanism shown to involve membrane disruption and induction of early apoptosis and late necrosis (Cavalcante *et al.* 2018).

Due to the broad spectrum displayed by this class of AMPs, the objective of the present study was to evaluate the *in vitro* activity of Ctn and its two fragments against drug-resistant, clinical isolates of *C. albicans*, *Cryptococcus laurentii* and *C. neoformans*. We show here that Ctn[15-34] is active against both AMB- and fluconazole (FLC)-resistant yeasts, even when the drugs-of-choice are proved inefficient against these eukaryotic pathogens.

Material and methods

Peptides

Ctn (KRFKFFKVKVSVKRLKKIFKKPMVIGVTIPF-amide; MW 4151.4), Ctn[1-14] (KRFKFFKVKVSV-amide; MW 1797.3) and Ctn[15-34] (KKRLKKIFKKPMVIGVTIPF-amide; MW 2371.1) (Table 1) were synthesized by solid phase methods, purified to >95% homogeneity by HPLC and characterized by mass spectrometry as previously described (Falcao *et al.* 2015). Peptide 1 mmol l⁻¹ stock solutions were prepared with sterile deionized water and kept at 4°C for up to 6 weeks or maintained frozen at -20°C until use.

Yeast strains

The standard *C. albicans* strain was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC90028). Clinical isolates of *C. albicans* (LABMIC 0125) and *C. laurentii* (LABMIC 0402 and 0403) were from Santa Casa de Misericórdia Hospital, Sobral (Ceará, Brazil) and *C. neoformans* (LABMIC 0405 and 0406) were from the São José Hospital, Fortaleza (Ceará, Brazil) Table 2. *Cryptococcus* spp. strains were presumptively identified by observing the presence of the polysaccharide capsule in direct microscopic examination with India ink. Urease activity and l-canavanine glycine bromothymol blue (CGB) agar was used for genus confirmation and species differentiation. To identify *C. albicans* strains, CHROMagar-

Candida medium (BD Diagnostics, Heidelberg, Germany) was used. Subsequently all yeasts were subjected to automated identification by the Vitek 2 system (BioMérieux Vitek, Hazelwood, France) and confirmed by PCR-polyacrylamide gel electrophoresis analysis whenever necessary. These strains were stored in the microbiology laboratory of the Acaraú Valley State University (CE, Brazil), where they were maintained on Sabouraud-dextrose agar, SDA (Difco, Detroit, MI) and kept between 4 and 8°C. This study was authorized by the Research Ethics Committee of the Acaraú Valley State University under reference number 644.365.

Inoculum preparation for antifungal susceptibility tests

The inoculum was prepared from cells cultured on SDA and incubated at 35°C for 24 h (*C. albicans*) and 48 h (*Cryptococcus* spp.). Yeast colonies were transferred to tubes containing sterile PBS to obtain suspensions with a turbidity equivalent to 0.5 on the McFarland scale (c. 10⁶ CFU per ml). These suspensions were then diluted 1 : 2000 with RPMI 1640 medium, supplemented with L-glutamine. The pH was adjusted to 7.4 with 0.165 mol l⁻¹ morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), in agreement with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 2008 directions.

In vitro antifungal assays—Broth microdilution method

The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of the peptides against the yeast strains were determined by the broth microdilution method using 96-well plates according to CLSI M27-A3 document A serial dilution covering the 0.03–71.9 µg ml⁻¹ (0.02 to 40 µmol l⁻¹) concentration range in RPMI 1640 medium with L-glutamine (pH 7.4) was prepared from the peptide stock solution. As standard drug controls, FLC in the range of 0.03–64 µg ml⁻¹ (0.1–200 µmol l⁻¹) and AMB, from 0.007 to 16 µg ml⁻¹

Table 1 Physicochemical data of crotalidin (Ctn) and its N- and C-terminal dissected fragments (Ctn[1-14] and Ctn[15-34])

Peptide ^{*,†}	Size (nr residues)	Experimental (calculated) MW [‡]	Net Charge [§]	Hydrophobicity, H [¶]	Hydrophobic moment, µH [¶]
Ctn	34	4151.39	+16	0.263	0.440
Ctn[1-14]	14	1797.31	+9	-0.012	0.763
Ctn[15-34]	20	2371.11	+8	0.455	0.311

*C-terminal amidated peptides.

†PDB Data Bank accession code 2MWT; Full-length Ctn is α-helical; the N-terminal fragment, Ctn[1-14] also adopts α-helical structure; the C-terminal dissected peptide, Ctn[15-34], is unstructured in solution.

‡Molecular weight (MW) as determined by LC-MS.

§Calculated with the 'Peptide property calculator' software (<http://pepcalc.com>).

¶Calculated with the 'Heliquist' software (<http://heliquist.ipmc.cnrs.fr/>).

Table 2 Minimum inhibitory concentration (MIC) of the Ctn and derived peptides (Ctn[1-14] and Ctn[15-34]) against amphotericin B- and fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Cryptococcus* spp

Strains	Source	MIC - $\mu\text{g ml}^{-1}$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)				
		Ctn[1-14]	Ctn[15-34]	Ctn	AMB	FLC
<i>Candida albicans</i>						
ATCC 90028	Culture collection	20 (35-95)	10 (23-7)	20 (83)	1 (1)	3-12 (1)
LABMIC 0125*	Deep tissue injury	10 (17-98)	10 (23-7)	10 (41-5)	1 (1)	25 (8)
<i>Cryptococcus laurentii</i>						
LABMIC 0403	Haemoculture	20 (35-95)	20 (47-4)	20 (83)	4 (4)	6-25 (2)
LABMIC 0402	Haemoculture	10 (17-98)	10 (23-7)	20 (83)	4 (4)	6-25 (2)
<i>Cryptococcus neoformans</i>						
LABMIC 0405	Cerebrospinal fluid	5 (8-98)	5 (11-85)	1-25 (5-19)	>16 (>16)	>200 (>64)
LABMIC 0406	Cerebrospinal fluid	20 (35-95)	10 (23-7)	2-5 (10-38)	>16 (>16)	>200 (>64)

*Resistant strain according to the breakpoints of EUCAST (<http://clincalc.com/eucast/>) and CLSI (Performance standards for antifungal susceptibility of yeasts, 1st Ed. CLSI supplement M60. ISBN 1-56238 – 828 – 2 [Print]) which establish MIC >4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for fluconazole-resistant *Candida albicans* strains.

(0.007–16 $\mu\text{mol l}^{-1}$) were used. The microplates were incubated at 35°C and the fungal growth and/or inhibition was observed after 24 h. The MIC was defined as the lowest concentration where no visual growth (no turbidity) was observed corresponding to 90% inhibition of fungal growth. In turn, the MFC was determined after transference of 100 μl of the contents from the wells without turbidity into capped test tubes containing SDA at 35°C. The MFC was calculated in accordance with fungal growth in the culture medium after 48 h. Each experiment was performed in duplicate.

Checkerboard assays

The antifungal activities of the peptides combined with conventional antifungals were determined by the checkerboard technique, in which the interaction of Ctn, Ctn[1-14] and Ctn[15-34] with fluconazole (FLC), in particular, was estimated by calculating the fractional inhibitory concentration index (FICI). The turbidities of the fungal suspensions were adjusted to 0.5 on the McFarland scale ($c.10^6$ CFU per ml). In 96-well plates, twofold serial dilutions of each peptide were prepared as described above with RPMI medium at a volume of 50 μl per well. Then, twofold serial dilutions of FLC were added to the plates. Finally, 100 μl of inoculum was added to each well. Final concentration ranges were, 0.03–71.9 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (0.02 to 40 $\mu\text{mol l}^{-1}$) for the peptides, and 0.03–64 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (0.2 to 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$) for FLC respectively. Cells treated only with each peptide individually or FLC alone, at their respective MIC values (Table 2), along with untreated fungal suspensions, were used as controls. The plates were incubated at 35°C for 24 h (*C. albicans* strains) or for 48 h (*Cryptococcus* spp). The MIC was defined as the lowest concentration in which no visual growth (absence of turbidity) was observed. The FICI was

calculated by the sum of $\text{FIC}^{\text{P}} + \text{FIC}^{\text{F}}$, where P represents one of the peptides and F fluconazole. In turn, FIC^{P} was calculated from MIC^{P} combined/ MIC^{P} alone, while FIC^{F} was calculated from MIC^{F} combined/ MIC^{F} alone. Synergism was defined as $\text{FICI} \leq 0.5$, while no interaction was annotated when $0.5 < \text{FICI} \leq 4.0$, and antagonism when $\text{FICI} > 4.0$ (Odds 2003; Johnson and Perfect 2010).

Microbial cell viability assays

Strains of drug-resistant *C. neoformans* and *C. albicans* were exposed to the most active and relatively less cytotoxic peptide, Ctn[15-34], and FLC to confirm the yeast viability after peptide treatment. The yeast suspensions (50 μl) containing 2×10^6 CFU per ml were added to 50 μl of twofold serial dilutions of either Ctn[15-34] or FLC in 96-well microtitre plates, at the inhibitory and subinhibitory concentrations, as previously demonstrated by the antifungal assays. After incubation for 24 h or 48 h at 35°C, 50 μl of BacTiter-Glo microbial cell viability assay reagent (Promega, Madison, WI) was added to each well, and the plates were re-incubated for 15 min at room temperature with gentle shaking. Luminescence was then measured in a Synergy HT microplate reader (Bio-Tek, Winooski, VT). Relative cell viability was calculated with cells treated with only RPMI as controls ($c. 100\%$ viability). Assays were carried out in triplicate.

Time-kill assay

The killing times after treatment with Ctn[15-34] or conventional antifungal drugs were determined for the clinical yeast isolates. In 96-well plates, the yeast suspensions were treated with either FLC or AMB at their respective MICs or Ctn[15-34] at its MIC (Fig. 2) or $0.5 \times \text{MIC}$. In

addition, the killing kinetics of FLC and Ctn[15-34] when combined at the same concentrations found at the checkerboard assays (Table 2) was also evaluated. The 96-well plates were incubated at 35°C, and 100 μ l aliquots were removed at predetermined time points (0, 4, 8, 10, 12 and 24 h). The aliquots were serially diluted (10-fold) in saline and then seeded on SDA plates. Colony numbers were counted after incubating the SDA plates at 35°C for 48 h for both *C. albicans* and *C. neoformans*. The assays were performed in triplicate. In parallel, a spotting test (Kwolek-Mirek and Zdrag-Tecza, 2014) was performed along with the time-kill kinetics. For this test,

undiluted 2 μ l aliquots from each time point of the killing kinetics assays were withdrawn and spotted on the surface of SDA plates and, once the 2 μ l droplets dried, they were incubated at 35°C for 48 h. The fungal colonies were then photographed to observe their morphology and size after exposure to the peptide and the antifungal drugs.

Results

The physicochemical properties of Ctn and its N- and C-terminal fragments Ctn[1-14] and Ctn[15-34], respectively, are shown in Table 1. Their positive net charge (ability to

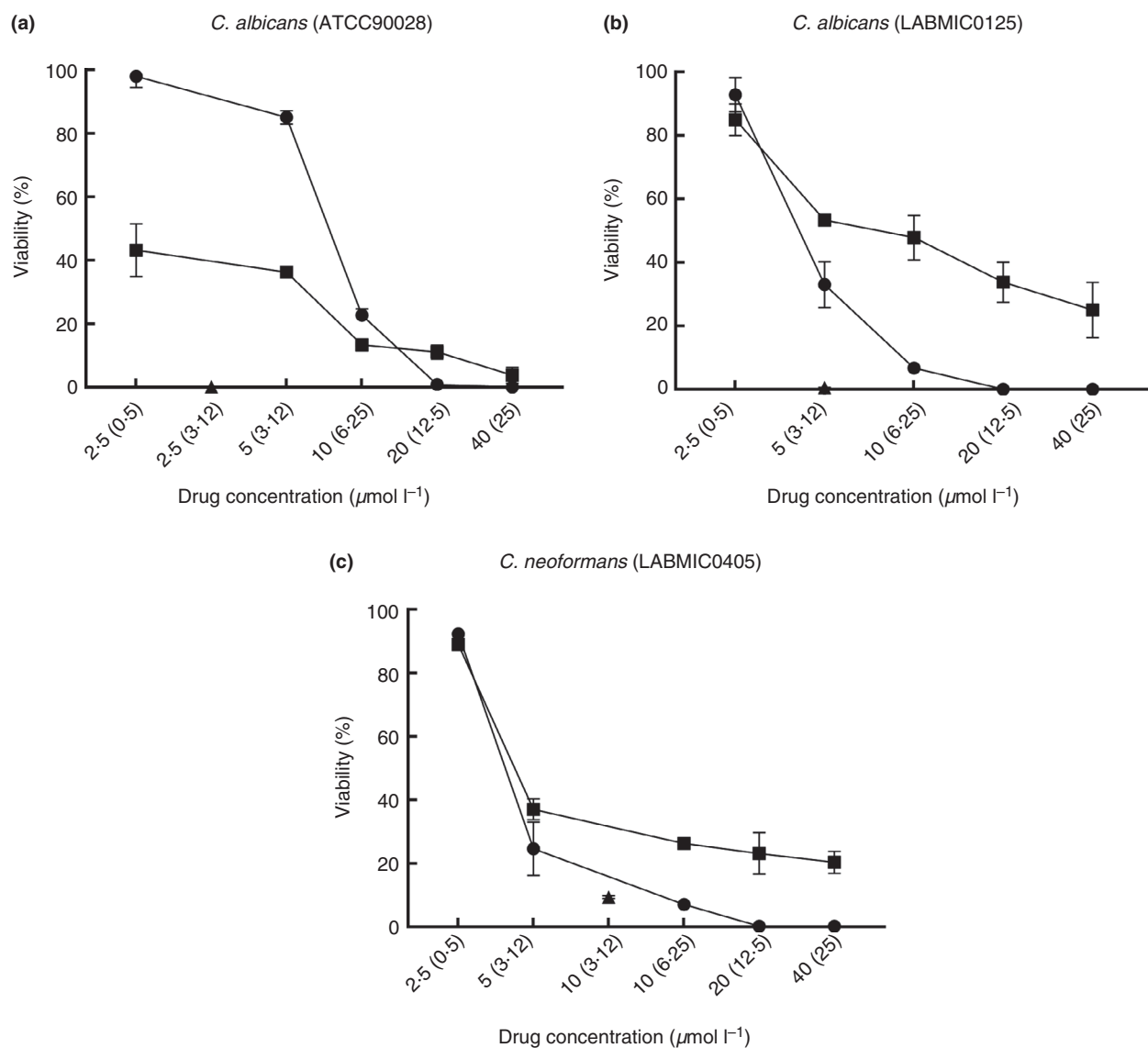


Figure 1 Relative viability of *Candida albicans* (wild-type) (a), *C. albicans* (clinical isolate) (b), and *Cryptococcus neoformans* (clinical isolate) (c) after treatment with Ctn[15-34] (●), fluconazole (FLC) (■) at increasing concentrations and combination of Ctn[15-34] and FLC (▲). Numbers within parentheses are FLC concentrations. Assay was performed in triplicates.

interact with negatively charged membranes, hydrophobicity (tendency to insert into membranes and cause lysis), hydrophobic moments (propensity to form amphipathic α -helices) and size are the main distinguishing features between the short analogues and the full-length, parental Ctn. The antifungal assay was initially developed for determining MIC values in *Candida* species, with susceptible and resistant breakpoints for *C. neoformans* based on *Candida* spp. data (Smith *et al.* 2015). Once the standardization is conducted with *C. albicans*, the assay is adapted successfully for use in *C. neoformans* (Lee *et al.* 2012). The MICs of Ctn, Ctn[1-14] and Ctn[15-34] against *C. albicans* and *Cryptococcus* spp. strains are summarized in Table 2, as well as the MICs of the current drugs-of-choice, FLC and AMB, which displayed MICs ranging from 1 to $>64 \mu\text{g ml}^{-1}$ (3.12 to $>200 \mu\text{mol l}^{-1}$) and from 1 to $>16 \mu\text{g ml}^{-1}$ (1 to $>16 \mu\text{mol l}^{-1}$) respectively. These MIC values for conventional antifungal agents indicated that *C. albicans* (LABMIC 0125) was resistant to FLC, since these drug concentrations are above the breakpoints established by CLSI and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), namely greater than $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($>12.5 \mu\text{mol l}^{-1}$) for FLC (Alastruey-Izquierdo *et al.* 2015). *Cryptococcus neoformans* strains were similarly resistant to both antifungal agents (Table 2).

The full-length Ctn and the Ctn [1-14] and Ctn [15-34] fragments displayed activity against all tested strains, with MICs ranging from 1.25 to $20 \mu\text{mol l}^{-1}$. Interestingly, the strains that were most susceptible to the peptides, with MICs in the low $\mu\text{mol l}^{-1}$ range ($\leq 10 \mu\text{mol l}^{-1}$), were mainly those coincidentally resistant to AMB and FLC, except *C. neoformans* (LABMIC 0406) treated with Ctn[1-14] (the less active peptide). Therefore, the remaining studies were performed with the clinically isolated *C. neoformans* (LABMIC 0405) and *C. albicans* (LABMIC 0125), which were resistant to the controls, the drugs-of-choice. The evaluation also continued with the inclusion of a standard strain of *C. albicans* (ATCC 90028). The strains of *C. laurentii* were also

sensitive to both Ctn and Ctn[15-34] peptides and the conventional antifungal agents in the *in vitro* tests. For the following assays, only strains that showed some resistance to AMB and/or FLC, as well as the wild-type ATCC 90028, were used as controls.

The next step was to assess the antifungal activity of Ctn and fragments when in combination with AMB or FLC. The results of the association of each peptide with FLC against *C. neoformans* (LABMIC 0405), *C. albicans* (LABMIC 0125; ATCC 990028) strains are shown in Table 3. Previous studies demonstrated that the association of one of the crotalidins peptides (Ctn, Ctn[1-14] or Ctn[15-34]) with AMB resulted in synergism against the tested strains of *C. albicans* (Cavalcante *et al.* 2017; Cavalcante *et al.* 2018). Here, when the same peptides were separately combined with FLC against different strains of *C. albicans*, there was a reduction of up to eightfold in FLC MICs against FLC-resistant *C. albicans* (LABMIC 0125). Nevertheless, the calculated FIC indexes (FICIs) for each peptide-FLC association against LABMIC 0125 fell within the range of no interaction ($0.5 < \text{FICI} \leq 4.0$). The same FICI range (no interaction) was also obtained when either peptide was combined with FLC against *C. neoformans*, but, in this case, in contrast with *C. albicans*, no reduction in the MIC values for FLC or peptides was observed (Table 3).

Given that (i) Ctn[15-34] had previously demonstrated antifungal activity against *Candida* spp. (Cavalcante *et al.* 2017; Cavalcante *et al.* 2018) and now against *Cryptosporidium*, and (ii) Ctn[15-34] displays a lower cytotoxicity compared to parental Ctn and a much longer half-life in human serum versus Ctn and Ctn[1-14] (Falcao *et al.*, 2015), the remaining studies were conducted only with Ctn[15-34].

Thus, to further corroborate the MIC values for Ctn [15-34] and FLC, when used either alone or in combination, the same yeast strains in the above checkerboard experiments were evaluated for cell viability. This was measured with a methodology based on the amount of

Table 3 Determination of FIC indices (FICI) for fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*

Combinations	ATCC 90028			LABMIC 0125			LABMIC 0405		
	MIC ($\mu\text{mol l}^{-1}$)		FICI	MIC ($\mu\text{mol l}^{-1}$)		FICI	MIC ($\mu\text{mol l}^{-1}$)		FICI
Individual	Combined	Individual		Combined	Individual		Combined		
Ctn [1-14]	20	5	1.25 (I)	10	5	0.62 (I)	5	5	2 (I)
Fluconazole	3.12	3.12		25	3.12		>200	>200	
Ctn [15-34]	10	2.5	1.25 (I)	10	5	0.62 (I)	5	5	2 (I)
Fluconazole	3.12	3.12		25	3.12		>200	>200	
Ctn	20	10	1.5 (I)	10	5	0.62 (I)	1.25	1.25	2 (I)
Fluconazole	3.12	3.12		25	3.12		>200	>200	

The synergism (S) was defined as the FICI index ≤ 0.5 , indifferent (I) FICI >1.0 and ≤ 4.0 and FICI (A) antagonism >4.0 .

ATP released from viable cells, which is consumed by the luciferase enzyme in a reaction to generate light in the presence of its substrate, luciferin. Relative viabilities were calculated with nontreated yeasts as controls and results are presented in Fig. 1.

Overall, Fig. 1 shows that all strains lost viability in a concentration-dependent manner, both for Ctn[15-34]- and FLC-treated yeast cells. For Ctn[15-34], there were sharp decreases in viability before the observed MIC values were reached, followed by slight decreases after the MIC values. As expected, the FLC-resistant *C. albicans* (LABMIC 0125) and *C. neoformans* (LABMIC 0405) strains achieved only 50% reduction in viability even at the highest FLC concentrations ($200 \mu\text{mol l}^{-1}$). The association of Ctn[15-34] with FLC was reduced in approximately 90% the viability of tested FLC-resistant strains. The same level of reduction in yeast viability is reached only with $2 \times \text{MIC}$ when Ctn[15-34] peptide is used alone. The association of the compounds against *C. neoformans* did not modify the MIC of any of the associated compounds, as confirmed by the cell viability test. Finally, microbicidal profiles as a function of time were determined after treatment with either Ctn[15-34] and AMB or FLC. The concentrations of each drug (peptide or antifungal) used were equivalent to their previously found MICs. Additionally, Ctn[15-34] at subinhibitory concentration and the best concentration for Ctn[15-34] associated with FLC, from the checkerboard assay (Table 3), were also evaluated. Results of the killing kinetic curves (microbicidal activity along the time of exposure) are displayed in Fig. 2. Accordingly, Ctn[15-34] alone at its respective MIC could inhibit the growth of standard and clinical *C. albicans*, after 8 h treatment, as well as deter clinical *C. neoformans* strains after 10 h incubation. In contrast, AMB and FLC alone only inhibited *C. albicans* strains at longer incubation times. Remarkably, the association of Ctn[15-34] with FLC was not only able to inhibit the growth of all strains within a period of 8–10 h, but also make these resistant-yeast strains susceptible again to FLC. The fungicidal ability of peptides against these yeasts was also corroborated using a direct spotting assay (Fig. 3). In this assay, the viable cells form clustered colonies that decrease in size and increase in rugosity in a time-dependent manner when exposed to peptide and/or efficacious drugs. While the standard *C. albicans* strain was susceptible to both Ctn [15-34] and antifungal drugs, especially AMB (Fig. 3a), the clinical isolate of *C. albicans* showed resistance to the azole drug, FLC, even at $25 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Fig 3). In the spotting test, *C. neoformans* was definitely resistant to both AMB and FLC (Fig. 3). Ctn[15-34] was the only compound in this set of experiments that effectively killed FLC- and AMB-resistant strains, causing increase of

rugosity and decrease in yeast cell viability within the 24-h treatment.

Discussion

The development of new anti-infective drug leads is a major challenge to overcome the surge and spread of drug resistance, as more strains are becoming less susceptible to the drugs-of-choice and current antifungal agents. Nowadays, examples of drug-resistant microbes are becoming more common and disseminated worldwide, although natural resistance of *C. neoformans* towards AMB has been scarcely reported (Joseph-Horne *et al.* 1995). In fact, this kind of AMB-resistant phenotype of *Cryptococcus* is still considered rare (Vandeputte *et al.* 2008; Eddouzi *et al.* 2013), but it has frequently occurred mainly in emerging species such as non-albicans like *Candida* (McCarthy *et al.* 2017). Herein, in addition to the pathogenic yeast isolate from hospitalized patients, such as drug-resistant *Cryptococcus*, the activity of crotalidicin (Ctn)-related peptides was demonstrated against susceptible and multidrug-resistant isolates.

Ctn and its fragments, particularly Ctn[15-34], have been recognized as versatile anti-infective peptide sequences with a broad spectrum of activities. Physico-chemical properties, namely short size, positive charge, high hydrophobicity and intermediate hydrophobic moment, endow Ctn[15-34] with a well-balanced structure–activity profile that makes it effective against bacteria, certain tumour cell lines, trypanosomatid protozoa (*T. cruzi*) and a kind of RNA virus that infects marine shrimp (Vieira-Girao *et al.* 2017). In the previous studies, we have reported the antifungal profile of Ctn, Ctn[1-14] and Ctn[15-34] against standard and clinical strains that are susceptible to the drugs-of-choice (Cavalcante *et al.* 2017; Cavalcante *et al.* 2018). Here, we have further examined the antifungal performance of Ctn and its fragments against multidrug-resistant, clinical isolates of *Candida* and *Cryptococcus*. Overall, these peptides displayed antifungal activity with MICs in the same range of values previously found for standard nondrug-resistant strains. Among the newly tested yeast strains, it was intriguing that those most susceptible to the peptides were essentially the FLC-susceptible and, importantly, the (FLC + AMB)-resistant *C. albicans* and *C. neoformans* strains (Table 2). Thus, it appears that these positively charged, amphipathic peptides interacted preferentially with yeasts with a drug-resistance phenotype, supposedly due to affinity to modified cell membrane. In fact, a possible explanation for the mechanism of antifungal drug resistance in yeasts is due to the reduced level of ergosterol (Vandeputte *et al.* 2008; Vincent *et al.* 2013; Mesa-Arango *et al.* 2016), making the cell membranes of these

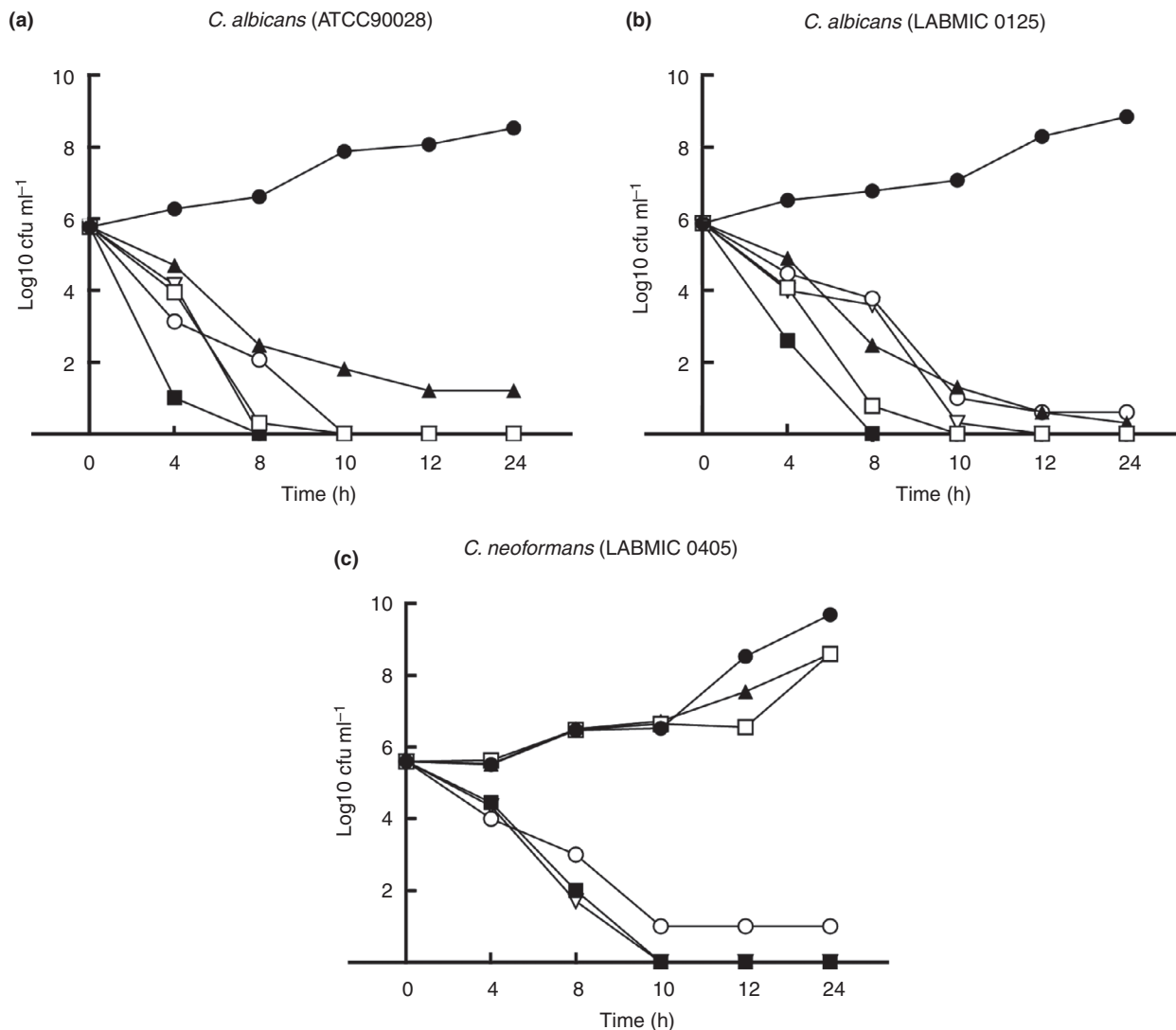


Figure 2 Time-kill kinetics of *Candida albicans* (ATCC 90028) (a), *C. albicans* (clinical isolate) (b) and *Cryptococcus neoformans* (clinical isolate) (c) treated with Ctn[15-34], AMB, FLC and Ctn [15-34] combined with FLC. Samples were withdrawn at the indicated times and evaluated for colony forming units (CFUs). Data represent growth controls (●), AMB-MIC (□), FLC-MIC (▲), Ctn [15-34]- 0.5× MIC (○), Ctn [15-34]- MIC (■), Ctn[15-34]+FLC (▼). Assay was performed in triplicates.

resistant strains more negatively charged and, consequently, making them prone to interact with cationic and amphipathic peptides. In *Cryptococcus* spp., the molecular basis of antifungal resistance is less known. Moreover, environmental factors and host health conditions contribute to the development of strains with antifungal-resistant phenotypes (Maubon *et al.* 2014; Sanglard 2016).

Since patients with either *Candida* spp. or *Cryptococcus* spp. infections are generally treated with two or more antifungal drugs to improve the therapeutic outcome and avoid resistance (Smith *et al.* 2015; Bulusu *et al.* 2016),

the activity of Ctn and its fragments when combined with FLC was examined. Although in our previous studies the combination of peptides with AMB resulted in synergic effects against susceptible *C. albicans* strains (Cavalcante *et al.* 2017; Cavalcante *et al.* 2018), here, the association of FLC with crotalicidin peptides did not result in synergism, according to the obtained FICI values. However, it was clear that combination of Ctn, Ctn[1-14] or Ctn[15-34] with FLC reduced the MIC values (eightfold) for this azole drug for the FLC-resistant *C. albicans* (LABMIC 0125) (Table 3), and this value of MIC was reduced to the level of yeast susceptibility range (below the

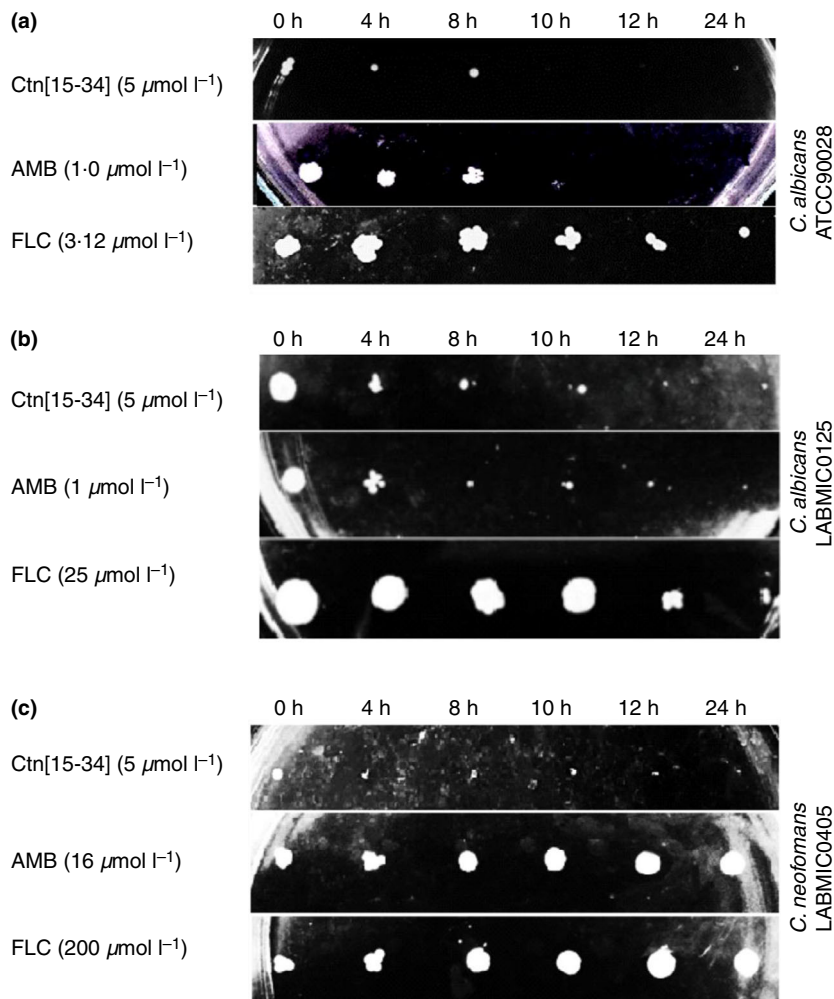


Figure 3 Spotting test. The formation of yeast colonies in SDA after treatment with Ctn [15-34], AMB and FLC up to 24h. Aliquots of 2 μl from microdilution tests were spotted on the surface of PDA plates, incubated at 35°C, overnight and photographed.

breakpoint), according to the EUCAST and CLSI guidelines (Alastruey-Izquierdo *et al.* 2015).

The decreased MIC values for FLC in association with Ctn [15-34], in the case of the FLC-resistant, clinical isolates of *C. albicans* and *C. neoformans*, prompted us to further evaluate the association of the peptides with the azole drug. Ctn [15-34] was the chosen peptide because it is less cytotoxic to healthy eukaryotic cells (e.g. human erythrocytes, fibroblast and kidney cells) and has a long (>12 h) serum half-life compared to Ctn (*c.* 1 h) and Ctn [1-14] (*c.* 0.5 h) (Falcao *et al.* 2015). Indeed, the unusual stability of Ctn [15-34] in the presence of human serum was further studied for structural and biochemical details (Pérez-Peinado *et al.* 2019). In a scenario of systemic infection by *Candida* or, importantly, by *Cryptococcus*, Ctn [15-34] would be the only peptide that, without chemical modification or conjugation/encapsulation (Malik *et al.* 2007; Vlieghe *et al.* 2010), would realistically be capable of remaining in circulation long enough to interact with and kill these yeasts at subclinical level.

Despite the lack of synergism, the evaluation of Ctn [15-34] in association with FLC highlights the importance of the combined use of the peptide with the azole drug against difficult-to-treat FLC- and (FLC + AMB)-resistant *C. albicans* and *C. neoformans* strains. In the cell viability assays (Fig. 1), Ctn [15-34] + FLC, at the MICs derived from the checkerboard experiments (Table 3), killed ≥90% cells, including not only wild-type but, importantly, both clinical drug-resistant strains. In the time-kill assays (Figs 2a2, 3c and 2, 3a2, 3c), the treatments that inhibited the growth of all strains were with Ctn [15-34] at its MIC and the combination of peptide + FLC at their sub-MIC. Therefore, Ctn [15-34] appears to be an effective alternative as adjuvant in the treatment against these yeasts by restoring the FLC-susceptibility of these drug-resistant strains, even though the FICI values (Table 3) suggest a neutral combinatorial effect. Indeed, though FICI values are important in screening for drug interactions/combinations in checkerboard experiments, our results emphasize that a

nonsynergic FICI value should not discourage clinical researchers from actual experimental exploration of treatment regimens that might save patients' lives.

The fact that Ctn[15-34] has intrinsic anti-*Cryptococcus* activity *in vitro* paves the way for a prospective biopharmaceutical development of peptide formulations; *C. neoformans/C.gattii* complex causes life-threatening infections such as cryptococcal meningitis, and while several classes of antifungal chemotherapeutics are available (Mourad and Perfect 2018), no efficacious drugs to fight cryptococcosis exist. In a murine lung infection model (Mukaremera *et al.* 2018), *C. neoformans* is shown to develop an extracellular capsule, crosslinked by chitin, chitosan, glucans, mannan fibrils and other components, that converts the fungal cells into virulent Titan cells capable of modulating and evading the host immune system. While these Titan cells differ in cell wall composition, cytoplasmic content and size from typical *in vitro*-grown *C. neoformans* cells, they share a polysaccharide capsule (Mukaremera *et al.* 2018) that might be targeted by cationic and amphipathic peptides. In fact, as a first step in their mechanism of action, antimicrobial peptides are known to bind electrostatically to negatively charged membranes and heteropolysaccharides on the extracellular matrix of tumour cells (e.g. glucosaminoglycans) (Takechi-Haraya and Saito 2018), as well as to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and proteoglycans of the cell wall of bacteria (Munch and Sahl 2015). All these facts together emphasize the importance of our findings regarding Ctn[15-34] as an anti-*Cryptococcus* agent able to kill efficiently *in vitro* clinical strains of (FLC + AMB)-resistant *C. neoformans*, in addition to being active against AMB-susceptible and -resistant *C. albicans*. Moreover, the beneficial associations of crotalicidin-derived peptides with antifungal drugs-of-choice motivate one to prepare pharmaceutical formulations potentially useful to counteract the proliferation of multidrug-resistant yeasts.

Acknowledgements

The authors are grateful for the Federal and State funding agencies for financial support. F.L.L.A. is recipient of a doctoral fellowship from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the Ministry of Education and Culture (MEC), Federal Government of Brazil. C.S.P.C. is the associate researcher from the program of young scientists from the State Funding Agency (FUNCAP). Research at the Acaraú Valley State University was funded by FUNCAP to R.O.S. C.B.F. is an associate researcher from the National Program for Post-Doctorates (CAPES/MEC) at the Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Dentistry, and Nursing, the

Federal University of Ceara. G.R.B. is thankful to The National Council for the Scientific and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology, Federal Government of Brazil, for endorsement of research projects. Research at Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain, was funded by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) grants AGL2014-52395-C2, AGL2017-84097-C2-2-R and the 'María de Maeztu' Program for Units of Excellence in R&D (MDM-2014-0370).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Aguilar, G., Delgado, C., Corrales, I., Izquierdo, A., Gracia, E., Moreno, T., Romero, E., Ferrando, C. *et al.* (2015) Epidemiology of invasive candidiasis in a surgical intensive care unit: an observational study. *BMC Res Notes* **8**, 491.
- Alastruey-Izquierdo, A., Melhem, M.S., Bonfietti, L.X. and Rodriguez-Tudela, J.L. (2015) Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. *Rev Inst de Med Trop Sao Paulo* **57**(Suppl 19), 57–64.
- Araujo, G.R.S., Souza, W. and Frases, S. (2017) The hidden pathogenic potential of environmental fungi. *Future Microbiol* **12**, 1533–1540.
- Bandeira, I.C.J., Bandeira-Lima, D., Mello, C.P., Pereira, T.P., Menezes, R.R.P.P.B., Sampaio, T.L., Falcão, C.B., Rádiz-Baptista, G. *et al.* (2017) Antichagasic effect of crotalicidin, a cathelicidin-like viperacidin, found in *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake's venom gland. *Parasitology* **145**, 1–6.
- Banerjee, P., Haider, M., Trehan, V., Mishra, B., Thakur, A., Droga, V. and Loomba, P. (2013) *Cryptococcus laurentii* fungemia. *Indian J Med Microbiol* **31**, 75–77.
- Bechinger, B. and Gorr, S.U. (2017) Antimicrobial peptides: mechanisms of action and resistance. *J Dent Res* **96**, 254–260.
- Black, K.E. and Baden, L.R. (2007) Fungal infections of the CNS: treatment strategies for the immunocompromised patient. *CNS Drugs* **21**, 293–318.
- Bondaryk, M., Staniszevska, M., Zielinska, P. and Urbanczyk-Lipkowska, Z. (2017) Natural antimicrobial peptides as inspiration for design of a new generation antifungal compounds. *J. Fungi* **3**, 46.
- Bulusu, K.C., Guha, R., Mason, D.J., Lewis, R.P., Muratov, E., Kalantar, M.Y., Cokol, M. and Bender, A. (2016) Modelling of compound combination effects and applications to efficacy and toxicity: state-of-the-art, challenges and perspectives. *Drug Discov Today* **21**, 225–238.

- Cavalcante, C.S., Falcao, C.B., Fontenelle, R.O., Andreu, D. and Radis-Baptista, G. (2017) Anti-fungal activity of Ctn [15-34], the C-terminal peptide fragment of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin. *J Antibiot* **70**, 231–237.
- Cavalcante, C.S.P., de Aguiar, F.L.L., Fontenelle, R.O.S., Menezes, R.R.P.P.B., Martins, A.M.C., Falcão, C.B., Andreu, D. and Radis-Baptista, G. (2018) Insights into the candidacidal mechanism of Ctn[15-34] - a carboxyl-terminal, crotalicidin-derived peptide related to cathelicidins. *J Med Microbiol* **67**, 129–138.
- Chen, Y., Farrer, R.A., Giamberardino, C., Sakthikumar, S., Jones, A., Yang, T., Tenor, J.L., Wagih, O. *et al.* (2017) Microevolution of serial clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *C. gattii*. *MBio* **8**, 1–18.
- Cheng, M.F., Chiou, C.C., Liu, Y.C., Wang, H.Z. and Hsieh, K.S. (2001) *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. *J Clin Microbiol* **39**, 1608–1611.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast*, 3rd edn: Approved Standard M27–A3. CLSI: Wayne, PA, USA.
- Destoumieux-Garzon, D., Rosa, R.D., Schmitt, P., Barreto, C., Vidal-Dupiol, J., Mitta, G., Gueguen, Y. and Bachère, E. (2016) Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Bio Sci* **371**, 20150300.
- Eddouzi, J., Parker, J.E., Vale-Silva, L.A., Coste, A., Ischer, F., Kelly, S., Manai, M. and Sanglard, D. (2013) Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from Tunisian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 3182–3193.
- Enoch, D.A., Yang, H., Aliyu, S.H. and Micallef, C. (2017) The changing epidemiology of invasive fungal infections. *Methods Mol Biol* **1508**, 17–65.
- Falcao, C.B., de La Torre, B.G., Perez-Peinado, C., Barron, A.E., Andreu, D. and Rádis-Baptista, G. (2014) Viperidins: a novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers. *Amino Acids* **46**, 2561–2571.
- Falcao, C.B., Perez-Peinado, C., de la Torre, B.G., Mayol, X., Zamora-Carreras, H., Jiménez, M.A., Rádis-Baptista, G. and Andreu, D. (2015) Structural dissection of crotalicidin, a rattlesnake venom cathelicidin, retrieves a fragment with antimicrobial and antitumor activity. *J Med Chem* **58**, 8553–8563.
- Johnson, M.D. and Perfect, J.R. (2010) Use of antifungal combination therapy: agents, order, and timing. *Curr Fungal Infect Rep* **4**, 87–95.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D., Loeffler, R.S. and Kelly, S.L. (1995) Cross-resistance to polyene and azole drugs in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 1526–1529.
- Kwolek-Mirek, M. and Zadrag-Tecza, R. (2014) Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Res* **14**, 1068–1079.
- Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E., Wickes, B.L., Meyer, W., Cuomo, C.A., Wollenburg, K.R., Bucanic, T.A., Castañeda, E. *et al.* (2017) The Case for Adopting the “Species Complex” nomenclature for the etiologic agents of Cryptococcosis. *MSphere* **2**, pii: e00357–16.
- Lee, C.H., Chang, T.Y., Liu, J.W., Chen, F.J., Chien, C.C., Tang, Y.F. and Lu, C.H. (2012) Correlation of anti-fungal susceptibility with clinical outcomes in patients with cryptococcal meningitis. *BMC Infect Dis* **12**, 361.
- Malik, D.K., Baboota, S., Ahuja, A., Hasan, S. and Ali, J. (2007) Recent advances in protein and peptide drug delivery systems. *Curr Drug Deliv* **4**, 141–151.
- Mallapragada, S., Wadhwa, A. and Agrawal, P. (2017) Antimicrobial peptides: the miraculous biological molecules. *J Indian Soc Periodontol* **21**, 434–438.
- Manfredi, R., Fulgaro, C., Sabbatani, S., Legnani, G. and Fasulo, G. (2006) Emergence of amphotericin B-resistant *Cryptococcus laurentii* meningoencephalitis shortly after treatment for *Cryptococcus neoformans* meningitis in a patient with AIDS. *AIDS Patient Care STDS* **20**, 227–232.
- Maubon, D., Garnaud, C., Calandra, T., Sanglard, D. and Cornet, M. (2014) Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? *Intensive Care Med* **40**, 1241–1255.
- McCarthy, M., O’Shaughnessy, E.M. and Walsh, T.J. (2017) In Amphotericin B: Polyene Resistance Mechanisms. In *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance* eds. Mayers, D.L., Sobel, J.D., Ouellette, M., Kaye, K.S. and Marchaim, D. pp 387–395. Cham: Springer International Publishing.
- Mello, C.P., Lima, D.B., Menezes, R.R., Bandeira, I.C., Tessarolo, L.D., Sampaio, T.L., Falcão, C.B., Rádis-Baptista, G. *et al.* (2017) Evaluation of the antichagasic activity of batroxidin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in *Bothrops atrox* venom gland. *Toxicol* **130**, 56–62.
- Mesa-Arango, A.C., Rueda, C., Roman, E., Quintin, J., Terrón, M.C., Luque, D., Netea, M.G., Pla, J. *et al.* (2016) Cell wall changes in amphotericin B-resistant strains from *Candida tropicalis* and relationship with the immune responses elicited by the host. *Antimicrob Agents Chemother* **60**, 2326–2335.
- Molina-Leyva, A., Ruiz-Carrascosa, J.C., Leyva-García, A. and Husein-Elahmed, H. (2013) Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in an immunocompetent child. *Int J Infect Dis* **17**, e1232–3.
- Mourad, A. and Perfect, J.R. (2018) Tolerability profile of the current antifungal armoury. *J Antimicrob Chemother* **73**, i26–i32.
- Mukaremera, L., Lee, K.K., Wagener, J., Wiesner, D.L., Gow, N.A.R. and Nielsen, K. (2018) Titan cell production in

- Cryptococcus neoformans* reshapes the cell wall and capsule composition during infection. *Cell Surf* **1**, 15–24.
- Munch, D. and Sahl, H.G. (2015) Structural variations of the cell wall precursor lipid II in Gram-positive bacteria - impact on binding and efficacy of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* **1848**, 3062–3071.
- Neves, R.P., Lima Neto, R.G., Leite, M.C., Silva, V.K., Santos, F.A. and Macêdo, D.P. (2015) *Cryptococcus laurentii* fungaemia in a cervical cancer patient. *Braz J Infect Dis* **19**, 660–663.
- Odds, F.C. (2003) Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemotherapy* **52**, 1.
- Pal, M. and Dave, P. (2016) Cryptococcosis: an emerging airborne mycosis of global concern. *Air Water Borne Dis* **5**, 127.
- Perez-Peinado, C., Dias, S.A., Domingues, M.M., Benfield, A.H., Freire, J.M., Rádis-Baptista, G., Gaspar, D., Castanho, M.A.R.B. et al. (2018) Mechanisms of bacterial membrane permeabilization by crotalicidin (Ctn) and its fragment Ctn(15–34), antimicrobial peptides from rattlesnake venom. *J Biol Chem* **293**, 1536–1549.
- Pérez-Peinado, C., Dias, S.A., Mendonça, D.A., Castanho, M.A.R.B., Veiga, A.S. and Andreu, D. (2019) Structural determinants conferring unusual long life in human serum to rattlesnake-derived antimicrobial peptide Ctn[15-34]. *J Pept Sci* **25**, e3195.
- Rizza, M.D., Dellavalle, P.D., Narancio, R., Cabrera, A. and Ferreira, F. (2008) Biomolecules as host defense weapons against microbial pathogens. *Recent Pat DNA Gene Seq* **2**, 82–96.
- Rodríguez, D.A. and Pinilla, A.P. (2012) *Cryptococcus laurentii* infection of central catheter in critically ill child: in regards to a case and literature review. *Infectio* **16**, 72–74.
- Sanglard, D. (2016) Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Front Med* **3**, 11.
- Sardi, J.C., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A.M. and Mendes Giannini, M.J. (2013) *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* **62**, 10–24.
- Smith, K.D., Achan, B., Hullsiek, K.H., McDonald, T.R., Okagaki, L.H., Alhadab, A.A., Akampurira, A., Rhein, J.R. et al. (2015) Increased antifungal drug resistance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 7197–7204.
- Smith, N., Sehring, M., Chambers, J. and Patel, P. (2017) Perspectives on non-neoformans cryptococcal opportunistic infections. *J Community Hosp Intern Med Perspect* **7**, 214–217.
- Takechi-Haraya, Y. and Saito, H. (2018) Current understanding of physicochemical mechanisms for cell membrane penetration of arginine-rich cell penetrating peptides: role of glycosaminoglycan interactions. *Curr Protein Pept Sci* **19**, 623–630.
- Tzeng, Y.L. and Stephens, D.S. (2015). Antimicrobial peptide resistance in *Neisseria meningitidis*. *Biochim Biophys Acta* **1848**(11 Pt B), 3026–3031.
- Vandeputte, P., Tronchin, G., Larcher, G., Ernoult, E., Bergès, T., Chabasse, D. and Bouchara, J.P. (2008) A nonsense mutation in the ERG6 gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 3701–3709.
- Vieira-Girao, P.R.N., Falcão, C.B., Rocha, I., Lucena, H.M.R., Costa, F.H.F. and Rádis-Baptista, G. (2017) Antiviral activity of Ctn[15-34], a cathelicidin-derived eicosapeptide, against infectious myonecrosis virus in *Litopenaeus vannamei* primary hemocyte cultures. *Food Environ Virol* **9**, 277–286.
- Vincent, B.M., Lancaster, A.K., Scherz-Shouval, R., Whitesell, L. and Lindquist, S. (2013) Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. *PLoS Biol* **11**, e1001692.
- Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J. and Khrestchatsky, M. (2010) Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today* **15**, 40–56.
- Yapar, N. (2014) Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag* **10**, 95–105.

Insights into the candidacidal mechanism of Ctn[15–34] – a carboxyl-terminal, crotalicidin-derived peptide related to cathelicidins

Carolina Sidrim P. Cavalcante,^{1,2,3†} Francisca Lidiane Linhares de Aguiar,^{1,3} Raquel O. S. Fontenelle,⁴ Ramon Roseo de P. P. B. de Menezes,⁵ Alice Maria Costa Martins,^{1,5} Cláudio B. Falcão,^{1,3†} David Andreu^{2,*} and Gandhi Rádis-Baptista^{1,3,*}

Abstract

Purpose. Ctn[15–34], a carboxyl-terminal fragment of crotalicidin (a cathelicidin from the venom gland of a South American rattlesnake), has shown antifungal activity against clinical and standard strains of *Candida* species. The aim of the present work was to investigate the underlying mechanisms of the candidicidal activity of Ctn[15–34].

Methodology. The time-kill profile and drug synergism were evaluated by means of a microdilution assay and multi-parametric flow cytometry. The presumptive interaction of Ctn[15–34] with lipid membranes was estimated *in vitro* with a lipid-mimic compound, the chromogenic substance 4-nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid (4N3OBA).

Results/Key findings. The absorbance increment (at 425 nm) indicated a concentration- and time-dependent in-solution association between Ctn[15–34] and 4N3OBA. The interaction of Ctn[15–34] with *Candida* cells was confirmed by flow cytometric measurements with the 5(6)-carboxyfluorescein-labelled peptide (CF-Ctn[15–34]). Analysis of the killing time of *Candida* exposed to Ctn[15–34] and amphotericin B (AMB) showed that both the peptide and polyene drug reduce the number of c.f.u. but in mechanistically different ways. The Ctn[15–34] peptide alone caused yeast cell membrane disruption, which was confirmed by lactate dehydrogenase leakage and biomarkers of cell death mediated by necrosis.

Conclusion. Overall, Ctn[15–34] displays a synergistic antifungal activity with AMB, an effect that can be further developed into a multi-target therapeutic option with other antimycotics currently in use.

INTRODUCTION

Systemic fungal infections have drastically grown over the last three decades due to the increasing immunocompromised population, as a result of HIV infection and of diverse clinical interventions, like transplantation, cancer chemotherapy and steroid therapy [1]. The most disseminate fungal pathogens comprise species of *Candida*. For instance, *Candida albicans* is normally a commensal micro-organism in humans, but once the host is unable to trigger an adequate

immune response, mucosal, cutaneous or invasive mycoses arise. The introduction of new systemic antifungal agents during the past decade has revolutionized the treatment of invasive mycoses. However, with these new therapies comes a need for an increased awareness of the limitations in their spectrum of activity, pharmacokinetics, and risk for drug interactions [2]. Amphotericin B (AMB) has been commonly used to treat serious fungal infections. Nevertheless, resistance to AMB has slowly been developing in selected *Candida* species and significant side effects associated with its use have

Received 21 August 2017; Accepted 17 November 2017

Author affiliations: ¹Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Ceará, 60740-000, Fortaleza, CE, Brazil; ²Department of Experimental and Health Sciences, Pompeu Fabra University, Barcelona Biomedical Research Park, Dr Aiguader 88, 08003, Barcelona, Spain; ³Laboratory of Biochemistry and Biotechnology, Institute for Marine Sciences, Federal University of Ceará, Av. da Abolição, 3207, 60165-081, Fortaleza, CE, Brazil; ⁴Centre of the Agricultural Sciences and Biological, Acaraú Valley State University, 62040-370, Sobral, CE, Brazil; ⁵Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.

*Correspondence: David Andreu, david.andreu@upf.edu; Gandhi Rádis-Baptista, gandhi.radis@ufc.br

Keywords: antimicrobial peptides; candidacidal mechanism; crotalicidin; pathogenic eukaryote; therapeutic peptide; flow cytometry assay.

Abbreviations: 7-ADD, 7-actinomycin D; AMB, amphotericin B; AMP, antimicrobial peptide; AX, annexin V; CF, 5(6)-carboxyfluorescein; CF-Ctn[15–34], peptide Ctn[15–34] labeled with 5(6)-carboxyfluorescein at its N-terminus; FIC, fractional inhibitory concentration; FICI, fractional inhibitory concentration index; LDH, lactate dehydrogenase; 4N3OBA, 4-nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid; PI, propidium iodide; PIC, protease inhibitor cocktail; RPMI, Roswell Park Memorial Institute 1640 medium.

†These authors contributed equally to this work.

Two supplementary figures are available with the online version of this article.

been observed, including nephrotoxicity [3]. To overcome these and other undesirable side effects, such as the occurrence of uncommon and resistant fungal strains or the limited spectrum of antifungal action, which polyene antifungals like AMB, thiazoles of new generations (fluconazole and analogues) and ecteinocandins (micafungin and caspofungin) are not totally able to circumvent, novel antifungal agents have been developed [4]. These antifungals target different cellular components and processes, like the fungal cell wall, or ergosterol and its biosynthesis. With a few exceptions, exemplified by arylamidine and thiepine derivatives, and lipopeptides and amphipathic β -peptides with helical fold, most novel antifungals are analogues of known chemical structures [4–8]. Therefore, despite these recent advances, the core critical problems with the antifungal arsenal, i.e. their effective applicability in clinic settings, limited by the usual toxicity to host cells and potential occurrence of microbial resistance to chemical structures that are similar, still persist. In this context, the discovery and development of alternative and more selective antifungal chemotherapeutics and therapeutic options are constantly required.

Antimicrobial peptides (AMPs) have emerged as potential antifungal agents, primarily because of their mechanisms of action, which impair the emergence of drug-resistant micro-organisms [9]. It has been well established that the majority of AMPs disturb membrane function and integrity through structural disruption and increased permeability, although this is not the sole mode of action and more subtle mechanisms determine the specificity and toxicity of the peptides [10]. In previous studies, cathelicidin precursors from the venom glands of South American pit viper snakes, named viperidins, were reported [11]. It was further demonstrated that Ctn[15–34], the carboxyl-terminal 20 amino acid-long fragment of crotalicidin (Ctn) (the viperidin from the rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*), displays equivalent antibacterial and anticancer activities as the full sequence version Ctn, but with lower toxicity to healthy eukaryotic cells [12]. More recently, we demonstrated the good antifungal activity of Ctn[15–34] on different opportunistic yeasts and the reduced toxicity to human renal cells in comparison to the drug-of-choice AMB [13]. In the present study, we describe the killing kinetics and the main candidacidal mechanism of Ctn[15–34] involved in the antifungal activity against clinical and standard strains of *C. albicans*. Accordingly, the antifungal property of Ctn[15–34] can be further developed as a multi-target therapeutic option, in associations and formulations with antimicrobials currently in use, to treat *Candida*-causing superinfection.

METHODS

Peptides

Ctn[15–34] (KKRLKKIFKKPMVIGVTIPF-amide) was prepared by solid phase synthesis, purified by HPLC and characterized by mass spectrometry analysis, as previously described [11, 12]. The fluorescent analogue, CF-Ctn[15–34], was similarly synthesized but, before deprotection of all

radical groups, a 1.1 equivalent of 5(6)-carboxyfluorescein was added to the resin and left overnight for the completion of dye coupling. For all experiments, 1 mM peptide stock solutions were prepared in deionized water and stored in aliquots at 4 °C for up to 6 weeks.

Fungi

The *C. albicans* strains used in this study were from the American Type Culture Collection (ATCC90028) and clinical isolates (LABMIC107 and 108) from the Santa Casa de Misericórdia Hospital at Sobral (Ceara, Brazil). Their identification, when applicable, was confirmed with CHROMagar-Candida (CHROMagar Company, Paris, France) in a VITEK 2 automated system (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) with YST card. These strains were grown on Sabouraud agar plates at 30 °C for 48 h. Inoculum suspensions were prepared by picking and suspending five colonies in 5 ml of sterile PBS (phosphate 35 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4). The resulting suspensions were transferred to sterile tubes, and heavy particles were allowed to settle. The turbidity of the conidial spore suspensions was measured at 600 nm and was adjusted to obtain an appropriate inoculum.

Antifungal assays

MICs of Ctn[15–34] against the fungal strains were determined by the broth microdilution method, based essentially on the document M27-A3 from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [14]. Determination of all MICs for all *C. albicans* strains was performed in 96-well microtitre plates (E&K Scientific, Santa Clara, CA, USA). The peptide stock solutions were used to make twofold serial dilutions with Rosewell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI) to a final volume of 100 μ l well⁻¹. Next, 100 μ l of fungal suspension, containing 2×10^6 c.f.u. ml⁻¹ (equivalent to 0.5 in McFarland's scale), in RPMI were added to each well. Final peptide concentrations ranged from 0.0195 to 40 μ M. AMB (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) was used as a standard antimycotic (positive control) against yeasts. MIC was, like usual, defined as the lowest peptide concentration at which no fungal growth was visually observed after 48 h at 30 °C.

Time-kill assays

C. albicans cells ($\sim 1 \times 10^6$ c.f.u. ml⁻¹) were inoculated in RPMI containing Ctn[15–34] (10 μ M) or AMB (2 μ M). The tubes were incubated (30 °C; 200 r.p.m.), and 100 μ l aliquots were removed at predetermined time points (0, 4, 8, 12 and 24 h). The aliquots were serially diluted (10-fold) in PBS and plated on yeast extract/potato dextrose agar plates. The numbers of colonies were counted after incubating the plates at 30 °C for 48 h.

Synergism detection assays as evaluated by flow cytometry

The antifungal activity of Ctn[15–34] when combined with AMB was determined by the checkerboard technique, a method used to estimate drug interaction by calculating the

fractional inhibitory concentration (FIC) index. In 96-well microtitre plates, 50 µl of fungal suspensions (with 2×10^6 c.f.u. ml⁻¹ \approx 0.5 in McFarland's scale) in RPMI were added to wells containing the peptide and AMB in the same final concentration ranges (0.0195–40 µM peptide, 0.0312–16 µM AMB), as previously established for the MIC determination. Cells treated with either peptide or AMB alone, at their respective MIC values, along with untreated fungal suspensions were used as controls. After 48 h incubation at 30 °C, results were visually observed and the FIC index (FICI) was calculated as $FICI = FIC^P + FIC^A$, where 'P' represents peptide (Ctn[15–34]) and 'A' AMB. FIC^P , in turn, was calculated as the MIC^P (combined)/ MIC^P (alone) ratio, while FIC^A was calculated as the MIC^A (combined)/ MIC^A (alone) ratio. Drug interaction was classified as synergism if $FICI \leq 0.5$; no interaction when $0.5 < FICI \leq 4.0$; and antagonism if $FICI > 4.0$ (13). The synergistic effect of Ctn[15–34] with AMB was further demonstrated with *C. albicans* cells by flow cytometry. Fungal suspensions containing 2×10^6 c.f.u. ml⁻¹ (\approx 0.5 in McFarland's scale) in RPMI were treated with Ctn[15–34] (0.31 µM) and AMB (0.5 µM), either alone or combined, for 24 h. After these incubation periods, cells were washed and propidium iodide (PI) at a final concentration of 1.49 µM was added to the yeasts as a marker of cell viability/membrane disruption. *C. albicans* cells were then run in a FACSCalibur flow cytometer (Becton–Dickinson, San Jose, CA, USA) and 10 000 live events were analysed with the Cell Quest software (Becton–Dickinson). Cells without treatment were used as controls and experiments were carried out in triplicate.

In-solution interaction assay of Ctn[15–34] with synthetic chromogenic lipid

Ctn[15–34] at 5 or 10 µM was initially mixed with reaction buffer (final concentration 10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, pH 8.0) containing 2 mM of the lipid 4-nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid (4N3OBA), as the molecular indicator. In the assay buffer (pH 8.0), the ionized form of 4N3OBA increases in relation to the reciprocal lipophilic non-ionized species, which is predominant in low pH (e.g. LogD=1.93 at pH 7.4 and 2.71 at pH 5.5) (CSID:16788382, www.chemspider.com/Chemical-Structure.16788382.html, accessed 20 July 2017). Thus, the interaction of the Ctn[15–34] peptide with the lipid-mimic was measured by monitoring the increase of 4N3OBA chromogenicity through absorbance readings at 425 nm, after 10, 20, 30 and 40 min of incubation, at constant temperature (37 °C). The assay buffer without the peptide was used as the control and all measurements were carried out in triplicate.

Cell interaction assay of carboxyfluorescein (CF)-Ctn[15–34] and *C. albicans* cells

C. albicans ($\sim 1 \times 10^6$) cells were first harvested at the logarithmic phase and suspended in RPMI. Next, these yeasts were incubated at 30 °C with the carboxyfluorescein-labelled, CF-Ctn[15–34], at its MIC and 0.5xMIC, for 0.5, 1, 2 and 4 h. After each incubation period, cells were washed

and PI at a final concentration of 1.49 µM was added to the pathogenic yeasts. These treated yeast cells were then analysed by flow cytometry as mentioned previously. Fungal cells without treatment were used as controls and experiments were carried out in triplicate.

Enzymatic assessment of membrane lysis induced by Ctn[15–34]

Candida suspensions (\sim 0.5 in McFarland's scale) were exposed to Ctn[15–34] (from 0.25xMIC to 8xMIC) for 4 and 8 h, in RPMI with and without protease inhibitor cocktail (PIC) (protease inhibitor mix HP Plus, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany). The leaked amount of lactate dehydrogenase (LDH) from fungal cells with a peptide-disrupted membrane was fluorometrically measured with the homogeneous membrane integrity assay kit CytoTox-ONE (Promega, Madison, WI, USA). The fluorescent signal, which is proportional to cells with disrupted membranes (short incubation time, in RPMI with PIC) or to viable cells (long incubation time, in RPMI without PIC), was measured (λ_{exc} =560 nm/ λ_{em} =590 nm) in the microplate reader BioTek Synergy HT (BioTek Instruments, Winooski, VR, USA).

Biochemical analysis of necrotic and apoptotic markers

C. albicans cells were exposed to treated Ctn[15–34] or AMB, at their respective MIC and 0.5xMIC, for 12 and 24 h at 30 °C. After each treatment period, these yeasts were incubated with 7-actinomycin D (7-AAD) and Annexin V (AX), by using the PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen), to assess the cellular integrity and the externalization of phosphatidylserine (PS), respectively. The labelled yeast cells were then analysed by flow cytometry using the same instrumentation and software as described above. Yeasts not exposed to either peptide or the AMB were used as controls and experiments were in triplicate. The results were scored as follow: AX-/7AAD-, viable cells; AX+/7-AAD-, indicative of early apoptosis; AX-/7AAD+, necrosis; AX+/7AAD-, late apoptosis/necrosis.

Statistical analyses

All experiments were carried out in triplicate. The obtained means \pm SEM were compared through one-way ANOVA in the synergy detection by flow cytometry and Ctn[15–34] *C. albicans* interaction assays, and Bonferroni post hoc tests using the software SPSS version 16.0 (IBM Corporation, Somers, NY, USA). Differences were considered statistically significant if * $P < 0.05$.

RESULTS

Ctn[15–34] and carboxyfluorescein-labelled Ctn[15–34]

The Ctn[15–34] peptide and its fluorescein-labelled analogue, CF-Ctn[15–34], were prepared as carboxyl-terminal amide forms by solid-phase syntheses with high purity (>95 % by HPLC) and with the respective molecular weights

of 2371.10 and 2729.41, as obtained by liquid chromatography coupled to a mass spectrometer. The peptide stock solutions at 1 mM with deionized water did not show signs of degradation for at least 6 weeks of storage at 4 °C.

Antifungal activity of Ctn[15–34] and killing kinetics

Initially, the MICs of Ctn[15–34] and AMB against standard and clinical isolates of *C. albicans* were determined (Table 1) and confirmed not only our previous findings [13] but also established the experimental parameters for subsequent mechanistic studies. Based on the MICs of Ctn[15–34] and AMB for both strains described here, the time-kill (killing kinetics) assays were next performed to evaluate the growth inhibition profile of *C. albicans* when exposed to these drugs. Results displayed in Fig. 1 showed that both drugs are able to effectively inhibit the growth of *C. albicans* in agar plates after 8 h of treatment at their MICs. However, while Ctn[15–34] quickly reduced the number of c.f.u. between 0 and 4 h and slowly between 4 and 8 h, the AMB profile was the opposite (slow reduction during the first 4 h and a fast decrease between 4 and 8 h).

Synergism of Ctn[15–34] against *C. albicans* strains as assessed by flow cytometry

Drug interaction studies between Ctn[15–34] and AMB were confirmed *in vitro* by the checkerboard dilution assay against the above *C. albicans* strains. According to the MIC results (Table 1), concentrations of AMB at sub-inhibitory values together with Ctn[15–34] at well-below (more than a log) their MICs could inhibit the growth of all *C. albicans* strains. This drug interaction, which is classified as a synergism, could be further observed by flow cytometry using a clinical *C. albicans* strain (LABMIC0107) and cell-non-permeant PI as a viability marker (PI-staining increases as a result of membrane disruption and the higher number of dead cells) (Fig. 2). The Ctn[15–34] alone at 0.31 µM was not enough to allow PI-staining of *C. albicans* cells (green line, Fig. S1a, available with the online version of this article) and results were similar to untreated cells (black line). When 0.5 µM AMB was used instead, 20 % (± 2.6) of 10 000 remaining live cells (red line, Fig. S1b) showed an increased

fluorescent signal related to PI-staining (arrow) compared to untreated cells. Moreover, when Ctn[15–34] and AMB are associated at these later concentrations, a significant 10 % increase in fluorescent signal (30 ± 1.0 %) was observed in these PI-stained yeasts (blue line, Fig. S1c), compared to cells treated with only the polyene drug.

Interaction of Ctn[15–34] with the synthetic lipid 4-nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid

Since PI is a non-permeant nucleic acid fluorescent dye which can only enter cells with damaged membranes and disruption of cytoplasmic membranes is the main mechanism of action of most AMPs, our next step was to evaluate whether Ctn[15–34] could interact with lipids. The synthetic lipidic compound 4N3OBA was incubated with the peptide Ctn[15–34] at 10 and 5 µM, which is respectively equivalent to the MIC and 0.5xMIC against *C. albicans*, and the result was plotted as shown in Fig. 3. As can be observed, the proportional increment of 43NOBA absorbance ($\lambda_{\max}=425$ nm) was a consequence of the concentration- and time-dependent interaction between the the Ctn[15–34] peptide and the chromogenic lipid in solution.

The membrane lytic effect of Ctn[15–34] measured by lactate dehydrogenase leakage

To corroborate the data of the increased population of PI-stained *Candida* cells exposed to the peptide and the *in vitro* interaction of Ctn[15–34] with the chromogenic 43NOBA, the fluorometric measure of LDH leakage confirmed the membrane damage induced by increasing the Ctn[15–34] concentration (Fig. 4). Importantly, by adjusting the time and composition of the assay solution for *Candida* cells, membrane damage or cell viability could be determined with the LDH/NADH/diaphorase/rezasurin-coupled reactions from the commercial assay system.

Cell membrane disruption of *C. albicans* by CF-Ctn [15–34]

These results prompted us to investigate membrane disruption in clinical *C. albicans* (LABMIC0107) by Ctn[15–34] using flow cytometry and a fluorescent-labelled version of

Table 1. MICs of Ctn[15–34] and AMB either alone or combined against clinically isolated strains of *C. albicans*

Crotalidicin/ AMB	<i>C. albicans</i> LABMIC0108			<i>C. albicans</i> LABMIC0107			<i>C. albicans</i> ATCC90028		
	CIM (µM) alone	CIM (µM) together	FICI*	CIM (µM) alone	CIM (µM) together	FICI*	CIM (µM) alone	CIM (µM) together	FICI*
Ctn[1–14]	40	0.007	0.25 (S)	20	0, 31	0.26 (S)	40	1, 25	0.28 (S)
AMB	2	0.5		2	0, 5		1	0, 5	
Ctn[15–34]	20	0.31	0.26 (S)	20	0.31	0.26 (S)	20	1, 25	0.31 (S)
AMB	2	0.5		2	0.5		1	0.5	
Ctn	20	0.31	0.26 (S)	20	0.31	0.26 (S)	40	1, 25	0.28 (S)
AMB	2	0.5		2	0.5		1	0.5	

*FICI, fractional inhibitory concentration index; S, synergy.

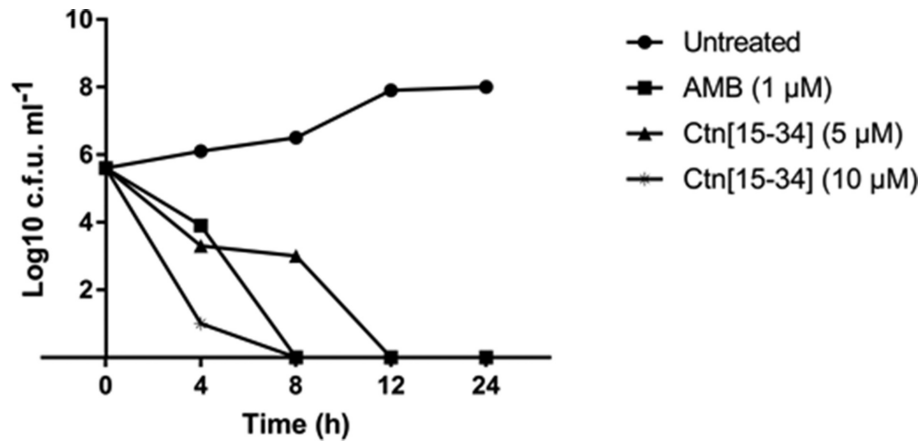


Fig. 1. Killing-time curves of *C. albicans* by Ctn[15–34] or AMB at their respective MICs. Assays were performed in triplicate in RPMI with 2% MOPS at 30 °C for 24 h. Samples were withdrawn at the indicated times and evaluated for c.f.u.

the peptide (Fig. 5). Thus, carboxyfluorescein-labelled Ctn [15–34] at 10 μM, Fig. 5b shows that up to the first 30 min of incubation, the peptide interacted with *C. albicans* cells (green ‘FL1’ fluorescence) compared to the control (Fig. 5a), which can be observed by the shift of cell-associated fluorescence from the lower left to the lower right (carboxyfluorescein, CF+/PI-) quadrants. Up to that period of treatment, however, the peptide did not cause much membrane damage, like indicated by low PI-staining (red ‘FL2’ fluorescence). Therefore, the fluorescence ratio between FL1 and FL2 had comparatively higher mean scores (Fig. 5d). However, after 1 h incubation (Fig. 5c), the interaction of the CF-Ctn[15–34] peptide with *C. albicans* caused a more noticeable cell membrane damage in the yeast, as an increase of PI fluorescent signal was observed (shift towards the upper right quadrant, the CF+/PI+) and, thus, the ratio between FL1 and FL2 decreased (Fig. 5d).

Evaluation of biochemical markers for necrosis and apoptosis

Finally, we verified the main pathway by which Ctn[15–34] causes cell death in *C. albicans* and compared it with the death pathway triggered by AMB after treatment with sub-inhibitory and inhibitory concentrations of both compounds for 12 and 24 h (Fig. 6). As depicted in Fig. 6(a), Ctn [15–34] showed that there were more cells undergoing apoptosis than necrosis at both sub-inhibitory and inhibitory concentrations of peptide, within 12 h of treatment. However, by 24 h of incubation (Fig. 6b), the percentage of cells going through necrosis increased in detriment to cells undergoing apoptosis, with a considerable increase of *C. albicans* yeasts committed to late apoptosis/necrosis after Ctn[15–34] treatment, remarkably at 10 μM (17.87% – upper left quadrant, Fig. S2). In contrast, AMB mainly induced an initial cell death in *Candida* (5.4% – lower right quadrant, Fig. S2) by early apoptosis, which can be observed especially at lower concentrations (the 0.5xMIC, Fig. 6d),

while after treatment with a concentration of 2 μM (the MIC) for 24 h (14.8% of the remaining live cells – upper left quadrant, Fig. S2), AMB also induced late apoptosis/necrosis (Fig. 6d). These killing patterns coincide with the profile of candidacidal activity observed in Fig. 1, being initially and mechanistically different between the peptide and the AMB.

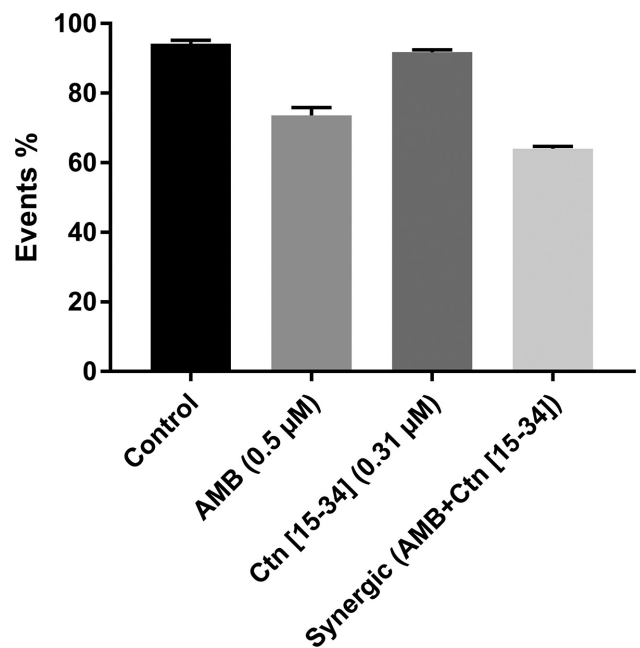


Fig. 2. Candidical synergism between Ctn[15–34] and AMB measured by flow cytometry. The combined sub-inhibitory concentrations of Ctn [15–34] (0.31 μM) and AMB (0.5 μM) results in an improved antifungal effect. Bars correspond to numeric values in the representative histograms of flow cytometric experiments reported in Fig. S1.

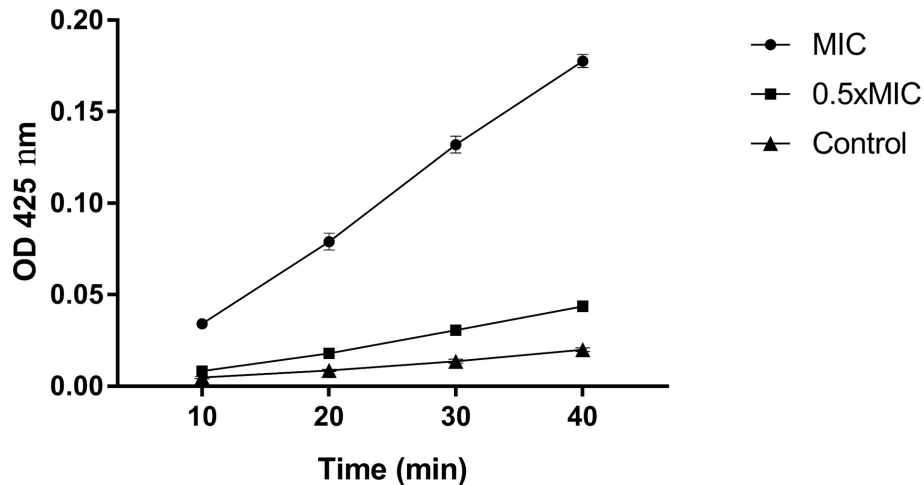


Fig. 3. In-solution interaction of Ctn[15–34] with anionic lipid. The anionic lipid 4N3OBA was incubated with an increase of peptide Ctn [15–34] concentration, i.e. 0 (NT), 5 (MIC/2) and 10 (MIC) μM , and the absorbance at 425 nm read at different time points. (Absorbance arbitrary units, mean \pm SEM with $n=3$.)

DISCUSSION

The search and development of new antifungal agents are constantly demanding due to the emergence and spread of drug-resistant microbial strains, like potential pathogenic species of *Candida*, the causative agent of invasive candidiasis (the most prevalent systemic mycoses worldwide). Previously, we reported the *in vitro* antifungal activity of Ctn [15–34] against standard and clinical isolates of *Candida* species [13]. In that work, Ctn[15–34] was shown to display a selective activity against several species and strains

of *Candida* and a much lower toxicity to healthy eukaryotic cells (human kidney-2 cell line and human red blood cells), even lower than AMB. In the present study, by combined methodologies, we assessed the main underlying mechanism by which Ctn[15–34] can kill *in vitro* clinical isolates of *C. albicans*. The MICs from both standard and clinical *C. albicans* strains were initially confirmed (Table 1); the time-kill assays were further performed to compare over time the candidacidal or fungistatic capacities of Ctn[15–34] and AMB against clinical isolates of *C. albicans*. Although both the peptide and drug were able

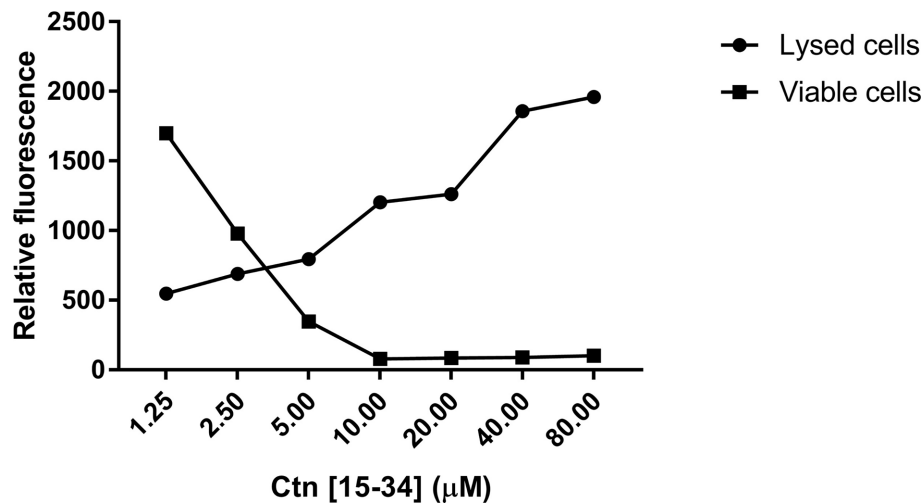


Fig. 4. Cell viability and the membrane lytic effect in *C. albicans* exposed to the Ctn[15–34] peptide. Fungal cells were incubated with increasing peptide concentrations, above and below the MIC for Ctn[15–34] (10 μM), for 4 h and 8 h, at 30 °C. The membrane damage (LDH leakage) and the cell viability were measured with the reagent CytoTox-ONE. Short exposure time (4 h) of *C. albicans* with peptides, in RPMI supplement with PIC, reveals membrane damage and LDH activity in *C. albicans* (ATCC90028) (●-). Long treatment time (8 h), in RPMI without PIC, shows the cell viability (-▲-). Measurements were in triplicates.

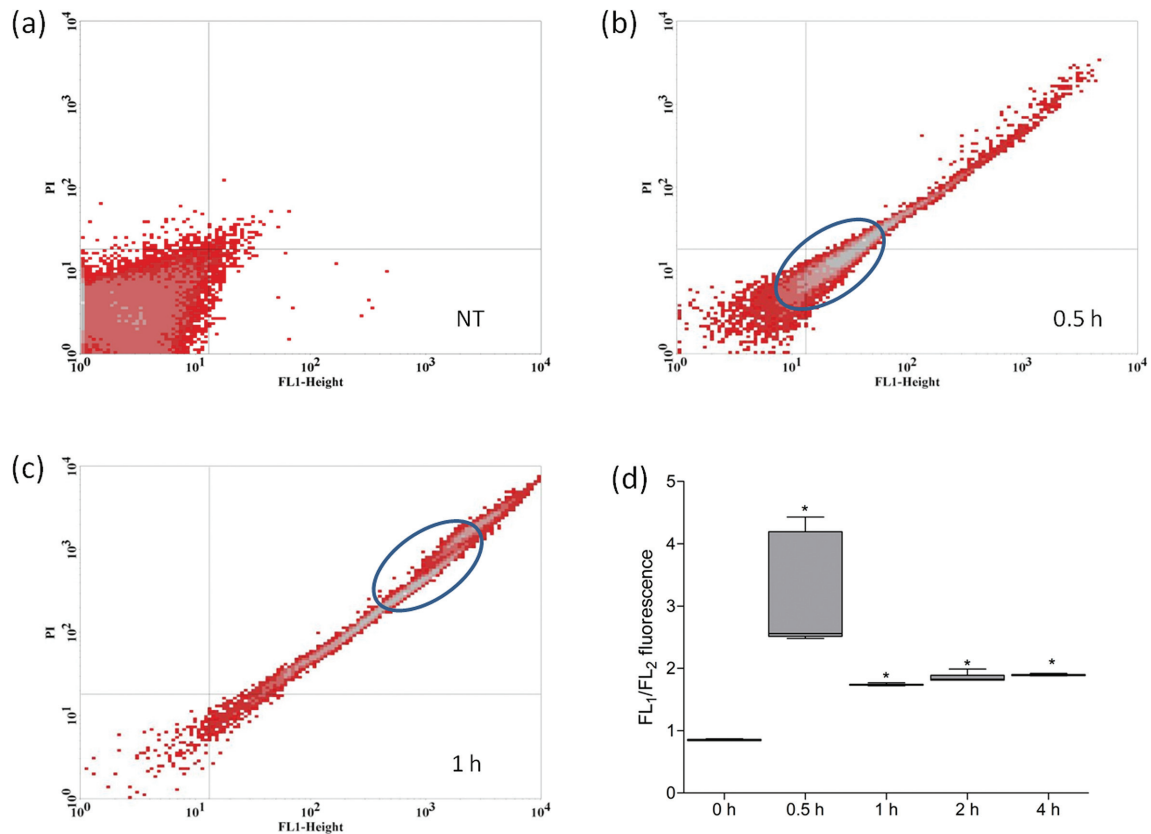


Fig. 5. Flow cytometry analysis of *C. albicans* exposure to carboxyfluorescein-labelled Ctn[15–34]. *C. albicans* cells were exposed to CF-Ctn[15–34] (FL1) at 10 μ M and iodide propidium (FL2) to monitor cell membrane disruption after (a) 0 h, non-treated (NT), (b) treated for 0.5 h and (c) 1 h. The FL1/FL2 fluorescence ratios (d) after *C. albicans* treatment with peptide for 0 (control), 0.5, 1, 2 and 4 h are indicated. Representative flow cytometry scattering graphs and mean percentage values were from three independent experiments, each with 10,000 live events.

to inhibit yeast growth after 8 h of treatment, they reduced the number of c.f.u. by different mechanistic patterns (Fig. 1). This fact suggested that Ctn[15–34] and AMB might exert their effect by distinct mode of action against *C. albicans*. With this premise, the checkerboard assays were re-tested to confirm our earlier findings, i.e. the antifungal effect of the peptide and the polyene drug alone and the potentiating of antifungal activity mediated by the combination of the peptide and AMB, administered together [13]. Our previous and present results (Table 1) demonstrated that Ctn[15–34] acted synergistically ($FICI \leq 0.5$) with AMB at lower concentrations than their respective MICs. This synergism effect of Ctn[15–34] and AMP corroborates other studies in which natural or synthetic AMPs associated with peptide or non-peptide antibiotics can effectively act synergistically [15].

Importantly now, results from such checkerboard tests were reiterated and confirmed by flow cytometry analysis in addition to the microdilution method. Indeed, after 24 h of peptide and drug treatment, the remaining live *Candida* cells were analysed with PI as a non-permeant viability marker and as a fluorescent dye to detect cells that were

killed as a result of membrane disruption (Fig. 2). PI-positive cells indicated that the dye stained more yeast cells that were treated with Ctn[15–34] and AMB together rather than with only the polyene drug. Similar synergistic effects against an ATCC *C. albicans* strain were previously observed with AMB, at sub-inhibitory concentrations, when it was incubated with the glycoside acteoside, as determined by analytical flow cytometric measurements, [16].

Although flow cytometry methods for antimicrobial/antifungal susceptibility tests have not yet been completely standardized, they have been in use for more than 20 years and their quantifiable results are equivalent to those data obtained with standard CLSI methods [17]. Moreover, flow cytometry can provide reliable and faster results comparable to the traditional protocols (e.g. 2–6 h compared to 24–72 h in the case of microdilution methods), which can have a tremendous impact on the analytical, time cost and clinical outcome for patients [18]. Herein, analytical flow cytometry was applied to quantitatively verify the effect of the crotalidin-derived peptide, Ctn[15–34], against patient-isolated *C. albicans* strains, highlighting the clinical importance of

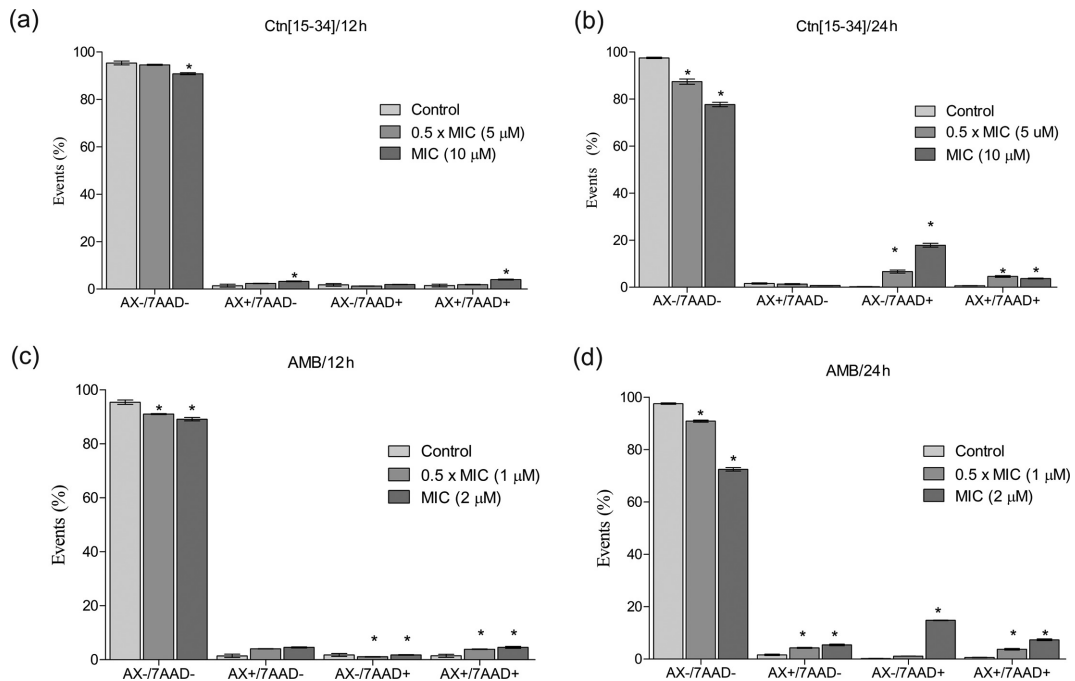


Fig. 6. Detection of the cell death pathway in *C. albicans* cells exposed to Ctn[15–34] or AMB. *C. albicans* cells were exposed to sub-inhibitory and inhibitory concentrations of Ctn[15–34] (a, b) or AMB for 12 and 24 h (c, d). Markers for apoptosis and necrosis were respectively, AX and 7-ADD. Scores were: AX-/7AAD-, viable cells; AX+/7AAD-, early apoptosis; AX-/7AAD+, necrosis; AX+/7AAD-, late apoptosis/necrosis. Data are from representative flow cytometry scattering graphs and mean percentage values were from three independent experiments, each with 10 000 live events, Fig. S2.

disclosing new antifungal agents or their combined therapeutic associations.

Concomitantly to flow cytometry evaluation, we turned our attentions back to the interaction of Ctn[15–34] with anionic lipids, which is essential to understand the structural activity relationship. Since most AMPs, including cathelicidins, interact with negatively charged bacterial and fungal phospholipids and induce subsequent membrane disruption [19], a simple biochemical test was initially and preliminarily carried out to verify whether Ctn[15–34] alone could interact with a given lipid. For this assessment, an assay based on the chromogenic lipid 4N3OBA was chosen. The molecule of 4N3OBA contains an eight-carbon lipid tail connected to a chromophore (3-hydroxy-4-nitrobenzoic acid) that is covalently linked and is colourless except these two functional chemical groups are separated by enzymatic cleavage [20]. Despite the most usual enzymatically catalysed-based readout of the chromogenic 4N3OBA, we based our analysis, like devised here, on the interaction of the peptide and lipid, which resulted in alteration of the electronic transition state and in the light-absorbing properties of the chromogenic 4N3OBA moiety upon peptide binding. Thus, the cationic Ctn[15–34] peptide (net positive charge=+8) appeared to interact to ionized 4N3OBA, modify its photophysical properties and induce the increase of light absorbance in a concentration- and time-dependent manner

($OD^{425\text{ nm}}=0.03$ at $5\ \mu\text{M}$ and $OD^{425\text{ nm}}=0.18$ at $10\ \mu\text{M}$). To confirm that the membrane is the main target of Ctn[15–34] activity, as seen by the increased number of PI-stained *Candida* cells and the *in vitro* interaction of Ctn[15–34] with the lipid-mimic 43NOBA, the membrane integrity was assayed based on the measure of LDH leakage. In this case, when *Candida* cells are exposed to peptide concentrations below the MIC ($<10\ \mu\text{M}$), for 4 h at 30°C , a low level of LDH activity is detected in the medium, while with concentrations above the MIC (up to $80\ \mu\text{M}$) a relatively high level of LDH is observed (Fig. 4). Obviously, such a pattern contrasts with the profile of cell viability, in which *Candida* cells show a relatively high vitality at concentrations very inferior to the MIC, when exposed for 8 h at 30°C , while clearly they were efficiently killed with quantities of Ctn[15–34] over $10\ \mu\text{M}$ (Fig. 4).

Since not only the maximal *in vitro* interaction between peptide and lipid was effective with $10\ \mu\text{M}$ of the peptide, but also the membrane damage in fungal cells was becoming evident, this concentration was maintained to evaluate by flow cytometry the interaction of a fluorescein-labelled peptide analogue, CF-Ctn[15–34], with *C. albicans* cells. In this analytical procedure, PI was again used to monitor the membrane disruption in the pathogenic yeast cell that is caused by the peptide (Fig. 5). While the peptide interacted with cells in the first 30 min of exposure, which was noticed

by increased green fluorescence associated to the *Candida* cells; it took 1 h of treatment to observe the pronounced *C. albicans* membrane damage (increased cell-associated red fluorescence). This set of experiments was based on a previously published work by Freire and colleagues [21], in which they used time-resolved flow cytometry assay (TR-FCA) to examine bacterial cell membrane permeabilization mediated by pepR – a designed AMP. In fact, by using TR-FCA combined with surface plasmon resonance and atomic force microscopy, some of us demonstrated that Ctn[15–34] permeabilizes the cytoplasmic membrane of Gram-negative bacteria immediately upon its addition to the microbial cell cultures, killing more than 90 % of cells within less than 1 h. Moreover, Ctn[15–34] causes preferential disruption of model vesicles that mimic microbial and tumour cell membranes rather than compositions that mimic eukaryotic healthy cell membranes [22].

Last but not least, the *C. albicans* cell death pathway was investigated by flow cytometry using biochemical markers for apoptosis and necrosis (Figs 6 and S2). Although both AMB and Ctn[15–34] induces late apoptosis and necrosis as the definitive mode of killing *C. albicans*, at their respective MICs, after 24 h of treatment, the onset of action to induce necrotic cell death is, at sub-inhibitory concentrations, distinctively pronounced for the peptide in comparison to the polyene AMB drug. These findings are in concordance with other studies that demonstrated that the entry of AMPs in *Candida* cells resulted in accumulation of reactive oxygen species and led to late cell necrosis [23, 24]. Thus, in contrast to AMB, we observed that Ctn[15–34] annihilates *C. albicans* in two phases, an immediate one: an initial concentration- and time-dependent interaction to and disruption of the cell membrane, in which apoptosis is barely detected, followed by a second phase that intensifies the membrane disruption and necrotic response. Therefore, there is a potentiating necrotic killing effect of *Candida* cells and faster reduction of pathogen burden, induced by Ctn [15–34] compared to the polyene drug, in which this firstly triggers an apoptotic response, mainly at sub-inhibitory concentration, as experimentally observed (Fig. 6). Despite this mechanistic contrastive effect, an important fact is that these antifungal agents kill pathogenic *Candida* by apoptosis and necrosis, as also observed for caspofungin [25]. However, the Ctn[15–34] peptide appears more efficacious in triggering the necrotic pathway of cell death, which would be an interesting intrinsic property for the control of an eventual disseminate fungal infection that needs a rapid intervention.

In conclusion, the present work sheds some light on the anti-*Candida* activity of Ctn[15–34] by means of flow cytometric analysis. Time-kill assays showed that Ctn[15–34] could interrupt the growth of *C. albicans* after the same incubation period as AMB at their respective MICs. Importantly, when the peptide and polyene drug were administered together, synergism was observed, which is beneficial for the potential combinatory therapy of candidiasis. In

addition, Ctn[15–34] alone promoted earlier cell membrane disruption, as the first phase of killing, and induced cell death in *C. albicans* mainly by necrosis, as confirmed with biochemical markers after Ctn[15–34] treatment. Further studies will be addressed to verify whether Ctn[15–34] is capable of interacting with intracellular target components of *Candida* cells, contributing to the collapse of their cellular processes and the modulation of the immune response of host cells.

Funding information

Financial support for the research at the Institute for Marine Sciences, Federal University of Ceará, granted to G. R.-B., was from the Program on Toxinology (Issue 2010), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the Ministry of Education (ME) of the Federal Government of Brazil, and from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (Proc. 310845/2012-2 and Proc 247970/2013-1), the Ministry of Science, Technology and Innovation (MCTI). C. B. F. is an associate researcher from the National Program for Post-Doctorates (CAPES/ME) at the Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, the Federal University of Ceará. C. S. P. C. was a recipient fellow from the program 'Science without Borders' (CsF/CNPq/MCTI) at the Department of Experimental Health Sciences, Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain. Work at Pompeu Fabra University was funded by MINECO (SAF2011-24899 and AGL2014-52395-C2 grants, to D. A.).

Acknowledgements

We are very grateful to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the Ministry of Education of the Federal Government of Brazil and the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Ministry of Science, Technology and Innovation (MCTI), for their constant endorsement and financial support of our projects.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical statement

This research does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

1. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002;2:73–85.
2. Lewis RE. Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin Proc* 2011;86:805–817.
3. Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol* 2009;26:223–227.
4. Victoria Castelli M, Gabriel Derita M, Noelí López S. Novel antifungal agents: a patent review (2013 - present). *Expert Opin Ther Pat* 2017;27:415–426.
5. Szafrański K, Sławiński J, Kędzia A, Kwapisz E. Syntheses of Novel 4-substituted N-(5-amino-1H-1,2,4-triazol-3-yl)pyridine-3-sulfonamide derivatives with potential antifungal activity. *Molecules* 2017;22:1926.
6. Božinović N, Šegan S, Vojnović S, Pavić A, Šolaja BA et al. Synthesis and anti-*Candida* activity of novel benzothiepine[3,2-c]pyridine derivatives. *Chem Biol Drug Des* 2016;88:795–806.
7. Kim DH, Lee DG, Kim KL, Lee Y. Internalization of tenecin 3 by a fungal cellular process is essential for its fungicidal effect on *Candida albicans*. *Eur J Biochem* 2001;268:4449–4458.
8. Koo JC, Lee B, Young ME, Koo SC, Cooper JA et al. Pn-AMP1, a plant defense protein, induces actin depolarization in yeasts. *Plant Cell Physiol* 2004;45:1669–1680.

9. Giuliani A, Rinaldi AC. Beyond natural antimicrobial peptides: multimeric peptides and other peptidomimetic approaches. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:2255–2266.
10. Marcos JF, Gandía M. Antimicrobial peptides: to membranes and beyond. *Expert Opin Drug Discov* 2009;4:659–671.
11. Falcao CB, de La Torre BG, Pérez-Peinado C, Barron AE, Andreu D et al. Viperidins: a novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers. *Amino Acids* 2014;46:2561–2571.
12. Falcao CB, Pérez-Peinado C, de La Torre BG, Mayol X, Zamora-Carreras H et al. Structural dissection of crotalycin, a rattlesnake venom cathelicidin, retrieves a fragment with antimicrobial and antitumor activity. *J Med Chem* 2015;58:8553–8563.
13. Cavalcante CS, Falcão CB, Fontenelle RO, Andreu D, Rádis-Baptista G. Anti-fungal activity of Ctn[15–34], the C-terminal peptide fragment of crotalycin, a rattlesnake venom gland cathelicidin. *J Antibiot* 2017;70:231–237.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, 3rd ed; Approved Standard M27-A3. Wayne, PA, USA: CLSI; 2008.
15. Zhai B, Zhou H, Yang L, Zhang J, Jung K et al. Polymyxin B, in combination with fluconazole, exerts a potent fungicidal effect. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:931–938.
16. Ali I, Sharma P, Suri KA, Satti NK, Dutt P et al. *In vitro* antifungal activities of amphotericin B in combination with acteoside, a phenylethanoid glycoside from *Colebrookea oppositifolia*. *J Med Microbiol* 2011;60:1326–1336.
17. Mitchell M, Hudspeth M, Wright A. Flow cytometry susceptibility testing for the antifungal caspofungin. *J Clin Microbiol* 2005;43:2586–2589.
18. Green L, Petersen B, Steimel L, Haeber P, Current W. Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry. *J Clin Microbiol* 1994;32:1088–1091.
19. Agier J, Efenberger M, Brzezińska-Błaszczak E. Cathelicidin impact on inflammatory cells. *Cent Eur J Immunol* 2015;40:225–235.
20. Cotrim CA, de Oliveira SC, Diz Filho EB, Fonseca FV, Baldissera L et al. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2. *Chem Biol Interact* 2011;189:9–16.
21. Freire JM, Gaspar D, de La Torre BG, Veiga AS, Andreu D et al. Monitoring antibacterial permeabilization in real time using time-resolved flow cytometry. *Biochim Biophys Acta* 2015;1848:554–560.
22. Pérez-Peinado C, Dias SA, Domingues MM, Benfield AH, Freire JM et al. Mechanism of bacterial membrane permeabilization of crotalycin (Ctn) and its fragment Ctn[15–34], potent antimicrobial peptides from rattlesnake venom. *J Biol Chem*, in press.
23. Maurya IK, Pathak S, Sharma M, Sanwal H, Chaudhary P et al. Antifungal activity of novel synthetic peptides by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of cell wall against *Candida albicans*. *Peptides* 2011;32:1732–1740.
24. Maurya IK, Thota CK, Sharma J, Tupe SG, Chaudhary P et al. Mechanism of action of novel synthetic dodecapeptides against *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830:5193–5203.
25. Hao B, Cheng S, Clancy CJ, Nguyen MH. Caspofungin kills *Candida albicans* by causing both cellular apoptosis and necrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:326–332.

Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

Find out more and submit your article at microbiologyresearch.org.