



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

CAROLINA SIDRIM DE PAULA CAVALCANTE TARGINO

Estudo da Atividade Antifúngica e dos Mecanismos de Ação do Peptídeo Ctn[15-34], Um Fragmento C-Terminal da Crotalicidina, Derivado De Uma Catelicidina Expressa Nas Glândulas De Veneno De Cascavéis

FORTALEZA

2017

CAROLINA SIDRIM DE PAULA CAVALCANTE TARGINO

Estudo da Atividade Antifúngica e dos Mecanismos de Ação do Peptídeo Ctn[15-34], Um
Fragmento C-Terminal da Crotalidina, Derivado de Uma Catelicidina Expressa Nas
Glândulas de Veneno de Cascavéis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Gandhi Radis-Baptista.
Coorientador: Dr. Cláudio Borges Falcão.

FORTALEZA

2017

C364e Cavalcante, Carolina Sidrim de Paula.

Estudo da atividade antifúngica e dos mecanismos de ação do peptídeo Ctn[15-34], um fragmento c- terminal da Crotalicidina, derivado de uma catelicidina expressa nas glândulas de veneno de cascavéis / Carolina Sidrim de Paula Cavalcante. – 2017.

131 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Gandhi Rádis-Baptista.

Coorientação: Prof. Dr. Cláudio Borges Falcão.

1. Peptídeo antifúngico. 2. Peptídeo Antimicrobiano (PAM). 3. Candida albicans. 4. Necrose.
5. Citometria de fluxo. I. Título.

CDD 615

CAROLINA SIDRIM DE PAULA CAVALCANTE TARGINO

Estudo da Atividade Antifúngica e dos Mecanismos de Ação do Peptídeo Ctn[15-34], Um Fragmento C-Terminal da Crotalicidina, Derivado de Uma Catelicidina Expressa Nas Glândulas de Veneno de Cascavéis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para Saúde.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gandhi Rádis-Baptista (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof(a). Dr(a). Raquel de Oliveira dos Santos Fontenelle
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Prof(a). Dr(a). Luciana Magalhães Melo
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof(a). Dr(a) Alice Maria Costa Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof(a). Dr(a) Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof(a). Dr(a) Vânia Marilande Ceccatto
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Cláudio Borges Falcão
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por todos os recursos humanos, financeiros e materiais que me foram disponibilizados durante meu doutoramento.

À CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro e bolsas concedidas durante a realização deste trabalho e durante o estágio sanduiche no exterior.

Ao Prof. Dr. Gandhi Rádís-Baptista, meus sinceros agradecimentos pela orientação, pela disponibilidade, pelo coleguismo, e por todas as oportunidades que me foram concedidas durante esses anos. Obrigada por ter me ajudado a fazer boas escolhas e ter me indicado o melhor caminho em todos os momentos desde que iniciei os trabalhos.

Ao colega e co-orientador Dr. Claudio Borges Falcão, que me ajudou sempre de modo muito criterioso e dedicado, e foi fundamental para a realização do trabalho.

Às Profas. Dras. Alice Maria Costa Martins, Nadia Accioly Nogueira, Kalyne Almeida Moreira Leal, por terem aberto as portas dos seus laboratórios, e auxiliado em todos os momentos durante deste trabalho.

Ao Prof. Dr. David Andreu pelo acolhimento no Laboratório de Proteômica e Química de Peptídeos da Universitat Pompeu Fabra - Parc Recerca Biomédica de Barcelona, pela oportunidade e pelos incontáveis avanços acadêmicos e pessoais que pude desenvolver durante, e após, meu doutorado sanduiche.

Encontrei muitos e bons colegas durante o doutorado, e todos eles contribuíram para este trabalho, para a minha formação, e para que eu tivesse uma experiência feliz durante esse período. Perla Vieira, Jean Etienne, Ramon Pessoa, Lidiane Linhares, Sira Defaus, Clara Pérez, Maria Gallo, Javier Valle, Gerard Such, e a todos os que me acompanharam no CEAC, FFOE, UVA, PRBB, foi um prazer dividir a bancada com cada um de vocês.

A minha colega e amiga Patrícia Vieira, por ter sido melhor companheira de laboratório do que eu poderia desejar.

Às Profas. Érika Helena Salles de Brito e Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle, minhas queridas amigas e maiores incentivadoras, por terem me forçado a voltar para a universidade. Vocês são, sem dúvida, as principais responsáveis pelo meu reencontro com a

vida acadêmica. Por escrito ou pessoalmente, irei sempre registrar meu agradecimento a vocês.

À minha família, por TUDO.

“Quem perde o tempo, eterna perda chora.”

Olavo Bilac

RESUMO

A crotalicidina (Ctn), uma catelicidina de 34-resíduos isolada de cascavel da América do Sul, e o seu fragmento (Ctn[15-34]) demonstraram previamente atividades antimicrobiana contra bactérias Gram negativas e citotóxica contra células tumorais. A extensão de tais efeitos tem sido relacionada com suas características físico-químicas, como a forma helicoidal e hidrofobicidade. O presente trabalho teve o objetivo geral de avaliar a atividade antifúngica do Ctn e seus fragmentos (Ctn[1-14] e Ctn[15-34]) e caracterizar os possíveis mecanismos de ação dos peptídeos contra *Candida albicans*. Determinação de Concentração inibitória mínima (CIM) e ensaios de viabilidade celular por ensaios de luminescência foram utilizados para avaliar a ação do Ctn e seus fragmentos (Ctn[1-14] e Ctn[15-34]) como agentes antifúngicos contra cepas clínicas de leveduras oportunistas e dermatófitos. A citotoxicidade em relação a células eucarióticas foi avaliada *in vitro* com células renais da linhagem HK-2 e eritrócitos. Ctn foi o peptídeo mais ativo contra dermatófitos e também o mais tóxico para células eucarióticas saudáveis. Os fragmentos Ctn[1-14] e Ctn [15-34] não demonstraram atividade contra dermatófitos, mas foram ativos contra leveduras patogênicas, incluindo várias espécies de *Candida sp.* e *Cryptococcus laurentii*, com CIMs de até 5µm. É interessante notar que os dois fragmentos peptídicos foram menos citotóxicos para as células HK-2 e menos hemolíticos para os eritrócitos humanos do que a Anfotericina B (ANF). A técnica checkerboard foi realizada para estimar os efeitos da combinação dos peptídeos com ANF frente a cepas de *C. albicans*. Foi observado o efeito sinérgico entre as crotalicidinas e a ANF, com a consequente redução nas CIM de ambos, fármaco e peptídeos. De modo geral, o fragmento Ctn[15-34] apresentou as menores CIMs contra as diferentes espécies de *Candida*, e baixa citotoxicidade contra células eucariotas. Para caracterizar a atividade anti-*Candida* do Ctn[15-34] foram realizados ensaios para determinar atividade fosfolipásica, a curva do tempo de morte, e técnicas de citometria de fluxo. O dano à membrana plasmática foi estimado com base na quantidade de produto gerada pela atividade fosfolipásica após tratamento do lípido 4N3OBA (substrato) com Ctn[15-34]; a 10 µM pode ser observado um grande aumento na atividade fosfolipásica em comparação com os lipídeos não tratados, e tratados com 5 µM. A análise das curvas de tempo de morte das células tratadas com Ctn[15-34] e AMB, mostrou que eles não reduziram o número de UFCs da mesma forma, sugerindo que Ctn[15-34] e AMB poderiam ter diferentes mecanismos de ação contra *C. albicans*. Ctn[15-34] promoveu rompimento da membrana celular, assim como outros peptídeos

antimicrobianos (PAMs), em leveduras. Além disso, a via de morte celular da *C. albicans* detectada por citometria após o tratamento com peptídeo foi a necrose, o que confirmou ainda mais a capacidade de dano da membrana celular por Ctn[15-34]. Juntos, Ctn e seus fragmentos são promissores para o tratamento de doenças fúngicas, e o Ctn[15-34] é um candidato muito valioso para o futuro desenvolvimento de um peptídeo antifúngico, que pode ser aplicado sozinho ou em combinação com um antibiótico padrão como a AMB.

Palavras-chave: Peptídeo antifúngico. Peptídeo Antimicrobiano (PAM). *Candida albicans*. Necrose. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

Crotalicidin (Ctn), a 34-residue cathelicidin from a South American rattlesnake, and its fragment (Ctn[15–34]) have shown anti-infective and cytotoxic activities against Gram-negative bacteria and certain tumor lines, respectively. The extent of such effects has been related to physicochemical characteristics such as helicity and hydrophobicity. We now report the anti-fungal activity of Ctn and its fragments (Ctn[1–14]) and (Ctn[15–34]) and characterize the possible mechanisms of action of peptides against *Candida albicans*. MIC determination and luminescent cell viability assays were used to evaluate the anti-infective activity of Ctn and its fragments (Ctn[1–14]) and (Ctn[15–34]) as anti-fungal agents against opportunistic yeast and dermatophytes. Cytotoxicity towards healthy eukaryotic cells was assessed in vitro with healthy human kidney-2 (HK-2) cells and erythrocytes. Fragments Ctn[1–14] and Ctn[15–34] lost activity against dermatophytes, but became more active against pathogenic yeasts, including several *Candida* species and *Cryptococcus laurentii*, with MICs as low as 5 μ M. Interestingly, the two peptide fragments were less cytotoxic to healthy HK-2 cells and less hemolytic to human erythrocytes than the standard-of-care amphotericin B (AMB). The checkerboard technique was performed to estimate the effects of combining either one of the peptides with AMB against *C. albicans* strains, and it was the synergy between Ctn peptides and AMB, with consequent reduction in MICs of both drug and peptides. In general, the Ctn[15-34] presented the smallest MICs against the different *Candida* species, and low cytotoxicity against eukaryotic cells. To characterize the anti-*Candida* activity of Ctn[15-34] were performed the phospholipase activity assay, time killing assay, and flow cytometry techniques. The plasmatic membrane damage was roughly estimated based on the amount of product generated by phospholipase activity after treatment of 4N3OBA lipid (substrate) with Ctn[15-34]; At 10 μ M a big increase in phospholipase activity could be noticed compared to non-treated and treated lipids at 5 μ M. Analysis of the time killing assays of cells treated with Ctn [15-34] and AMB, showed that they did not reduce the number of CFUs in the same fashion, which suggested that Ctn[15-34] and AMB could have different mechanisms of action against *C. albicans*. Ctn[15-34] alone promoted cell membrane disruption, like other AMPs, in yeasts. Moreover, the *C. albicans* cell death pathway detected after the peptide treatment was necrosis, which further confirmed cell membrane damage capacity by Ctn[15-34]. Together, Ctn and its fragments are promising for the treatment of fungal diseases, and the Ctn [15-34] is a most valuable candidate for further

development as an antifungal therapeutic peptide lead, particularly against yeast infections where it could be usefully applied either alone or in combination with a standard antibiotic such as AMB.

Keywords: Antifungal peptide. Antimicrobial peptide (AMP). *Candida albicans*. Necrosis. Flow cytometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismos de ação de peptídeos de defesa encontrados em mamíferos.....	32
Figura 2	Modelo barril (Barrel stave). Regiões hidrofílicas do peptídeo são mostrados em vermelho, e as regiões hidrofóbicas em azul	33
Figura 3	Modelo “carpet-like”. Regiões hidrofílicas dos peptídeos são mostradas em vermelho, e as regiões hidrofóbicas em azul.....	34
Figura 4	Modelo “Toroidal”. Regiões hidrofílicas dos peptídeos são mostradas em vermelho, e as regiões hidrofóbicas em azul.....	35
Figura 5	(A) representação da catelicidina humana hCAP18, como a região do peptídeo LL37. (B) Fragmentos ativos de LL37.....	36
Figura 6	Estrutura secundária da Crotalicidina (Ctn) e fragmentos Ctn[1–14] e Ctn[15–34]. Destaque para as atividades biológicas do Ctn[15–34].....	42
Figura 7	Cromatogramas de análise da síntese e purificação da Crotalicidina (Ctn). (A) Ctn após desacoplamento da resina, ainda não purificado. (B) Ctn após HPLC preparativa. (C) Comparação entre o cromatogramas antes e após a purificação. (D) Espectometria de massas do Ctn puro (4151.41Da).....	55
Figura 8	Cromatogramas de análise da síntese e purificação do fragmento Ctn[1-14]. (A) Ctn[1-14] após desacoplamento da resina, ainda não purificado. (B) Ctn[1-14] após HPLC preparativa. (C) Comparação entre o cromatogramas antes e após a purificação. (D) Espectometria de massas do Ctn[1-14] puro (1797.3 Da).....	56
Figura 9	Cromatogramas de análise da síntese e purificação do fragmento Ctn[15-34]. (A) Ctn[15-34] após desacoplamento da resina, ainda não purificado. (B) Ctn[15-34] após HPLC preparativa. (C) Comparação entre o	

<p>cromatogramas antes e após a purificação. (D) Espectrometria de massas do Ctn[15-34] puro(2371.1Da).....</p>	57
<p>Figura 10 Cromatogramas de análise da síntese e purificação do fragmento FITC-Ctn[15-34]. (A) FITC-Ctn[15-34] após desacoplamento da resina, ainda não purificado. (B) FITC-Ctn[15-34] após HPLC preparativa. (C) Comparação entre o cromatogramas antes e após a purificação. (D) Espectrometria de massas do FITC-Ctn[15-34] puro (2729.41Da).....</p>	58
<p>Figura 11 Viabilidade relativa de cepas de <i>Candida sp</i> e <i>Cryptococcus Laurentii</i> após tratamento com peptídeos e anfotericina B (AMB) a concentrações crescentes</p>	62
<p>Figura 12 Viabilidade relativa de células renais humanas saudáveis (HK-2) após 24 h de tratamento com as Crotalicidinas (Ctn), e fragmentos Ctn[1-14] e Ctn[15-34], e AMB.....</p>	64
<p>Figura 13 Detecção do efeito sinérgico do tratamento de <i>C.albicans</i> LABMIC0107 com Ctn[15-34] e AMB, após 24h.....</p>	65
<p>Figura 14 Percentual de hemólise após 1 h de tratamento com Crotalicidina (Ctn), fragmentos Ctn[1-14] e Ctn[15-34], e AMB.....</p>	69
<p>Figura 15 A cinética do tempo de morte de <i>C. albicans</i> LABMIC0107 pelo Ctn[15-34] e AMB nas respectivas CIMs. O ensaio foi realizado em meio RPMI-1640 com MOPS a 2% e incubado a 30° C durante 24 h.....</p>	70
<p>Figura 16 A relação entre as fluorescências FITC-Ctn[15-34]/PI (média ± SEM, n =3) após tratamento da <i>C. albicans</i> LABMIC0107 com 10 µM do peptídeo durante 0 (NT), 0,5, 1, 2 e 4 horas Modelo “carpet-like”</p>	72
<p>Figura 17 Detecção da via de morte celular após tratamento de células de <i>C.albicans</i> com (A) AMB ou (B) Ctn[15-34] em CIMs e 0.5CIMs durante 12 e 24 h. Os marcadores utilizados para necrose e apoptose foram 7-AAD e Anexina V PE,</p>	

respectivamente (Os gráficos de dispersão de citometria de fluxo e os valores percentuais médios foram representativos de três experiências independentes, cada uma com 10.000 eventos ao vivo).. 74

Figura 18 Avaliação do potencial necrótico do Ctn[15-34] e da AMB em *C. albicans* LABMIC0107 in vitro. Aumento progressivo no percentual de células marcadas com 7AAD sugerindo a morte das células por necrose. 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência primária propriedades fisicoquímicas da crotalidina e fragmentos. Adaptada de Falcão et al., J. Med. Chem, 2015.....	37
Tabela 2	Sequência primária propriedades fisicoquímicas da crotalidina e fragmentos. Adaptada de Falcão et al., J. Med. Chem, 2015.....	41
Tabela 3	Relação das cepas de leveduras e dermatófitos utilizadas nos ensaios de microdiluição em caldo	47
Tabela 4	Características estruturais e propriedades fisicoquímicas da Crotalidina (Ctn) e fragmentos amino e carboxil- terminal (Cavalcante et al., 2016)	54
Tabela 5	CIMs do Ctn e fragmentos Ctn[1-14] e Ctn[15-34] contra cepas padrão e isolados clínicos de leveduras e dermatófitos.....	60
Tabela 6	CIMs das Crotalidinas e AMB sozinhos ou combinados contra cepas de isolados clínicos de <i>C. albicans</i>	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E JUSTIFICATIVA.....	22
2.1	Candidíases invasivas.....	22
2.1.1	<i>Fatores de riscos das candidíases invasivas.....</i>	23
2.1.2	<i>Principais agentes causadores de candidíases invasivas.....</i>	24
2.1.3	<i>Aspectos patogênicos e fatores de virulência da Candida albicans.....</i>	25
2.1.4	<i>Principais desafios terapêuticos das candidíases invasivas.....</i>	27
2.2	Peptídeos Antimicrobianos (PAMs).....	29
2.2.1	<i>Características físico-químicas dos PAMs.....</i>	30
2.2.2	<i>Mecanismos de ação dos PAMs.....</i>	31
2.2.2.1	Mecanismos de ação membranolíticos.....	33
2.2.2.2	Mecanismos de ação não-membranolíticos.....	36
2.3	Catelicidinas.....	38
2.3.1	<i>Viperacidinas.....</i>	40
2.4	Justificativa.....	43
3	OBJETIVOS.....	44
3.1	Objetivo Geral.....	44
3.2	Objetivos Específicos.....	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1	Síntese, Purificação e Análise das crotalicidinas.....	45
4.1.1	<i>Síntese dos peptídeos em fase sólida.....</i>	45
4.1.2	<i>Purificação e análise dos peptídeos</i>	45
4.2	Microrganismos.....	46
4.3	Microdiluição em caldo.....	48
4.4	Viabilidade celular com <i>BactiterGlo</i>	48
4.5	Cultivo de células eucarióticas.....	49
4.6	Ensaio de citotoxicidade, <i>in vitro</i> , com células eucarióticas saudáveis	49
4.6.1	<i>Avaliação da nefrotoxicidade das crotalicidinas</i>	49
4.6.2	<i>Atividade Hemolítica.....</i>	49
4.7	Ensaio para avaliar efeito sinérgico das crotalicidinas associadas AMB...	50

4.7.1	<i>Técnica do Checkerboard .</i>	50
4.7.2	<i>Interação entre Ctn[15-34] por citometria de fluxo</i>	51
4.8	Teste de tempo de morte da <i>C. albicans</i> tratadas com Ctn[15-34]	51
4.9	Atividade fosfolipásica	52
4.10	Ensaio de interação do FITC_Ctn[15-34] com a membrana de <i>C. albicans</i> analisados por citometria de fluxo	52
4.11	Análise de marcadores de necrose e apoptose	53
5	RESULTADOS	54
5.1	Os peptídeos Crotalicidina (Ctn), Ctn[1-14] and Ctn[15-34]	54
5.2	Atividade antifúngica	55
5.2.1	<i>Avaliação do percentual de viabilidade celular de leveduras tratadas com os peptídeos e AMB</i>	56
5.3	Comparação entre os efeitos citotóxicos do Ctn e fragmentos Ctn[1-14] e Ctn[15-34] com a AMB	57
5.3.1	<i>Efeitos nefrotóxicos in vitro</i>	57
5.3.2	<i>Atividade hemolítica em RBCs humanos</i>	58
5.4	Ctn, Ctn[1-14] e Ctn[15-34] apresentaram efeito sinérgico com a AMB contra cepas clínicas de <i>C. albicans</i>	63
5.4.1	<i>Demonstração por citometria de fluxo do efeito sinérgico da associação do Ctn[15-34] com a AMB frente à <i>C. albicans</i></i>	66
5.5	Cinética de morte da <i>C. albicans</i> tratada com Ctn[15-34]	67
5.4.1	<i>Demonstração por citometria de fluxo do efeito sinérgico da associação do Ctn[15-34] com a AMB frente à <i>C. albicans</i></i>	68
5.5	Cinética de morte celular de <i>C. albicans</i>	70
5.6	Avaliação da atividade de fosfolipase do Ctn[15-34]	71
5.7	Capacidade do FITC_Ctn[15-34] interagir com a membrana de <i>C. albicans</i>	72
5.8	Análise dos marcadores de necrose e apoptose	73
6	DISCUSSÃO	76
7	CONCLUSÃO	83
8	PERSPECTIVAS	84

9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
----------	--	-----------

ANEXO I – Insights into the candidacidal mechanism of Ctn[15-34] as revealed by multiparametric flow cytometry

ANEXO II – Anti-fungal activity of Ctn[15–34], the C-terminal peptide fragment of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin. Artigo aceito e publicado no periódico *The Journal of Antibiotics*, 2016.

ANEXO III – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em pesquisa com Humanos da Universidade Vale do Acaraú, UVA, Sobral, Ceará.

1 INTRODUÇÃO

As micoses são causadas por fungos patogênicos que invadem os tecidos de um hospedeiro sadio ou por fungos oportunistas que invadem os tecidos de indivíduos imunocomprometidos. Dentre as micoses, as candidemias e outras formas de candidíase invasiva são inquestionavelmente as mais prevalentes entre as micoses invasoras em todo o mundo. As diferentes espécies de *Candida* pertencem à microbiota normal da mucosa da cavidade oral, trato gastrointestinal e vagina, e são responsáveis por várias manifestações clínicas mucocutâneas e sistêmicas (CALDERONE; CLANCY, 2012)

A patogenicidade das espécies de *Candida* é atribuída diversas características tais como adesão e formação de biofilme em tecidos do hospedeiro e dispositivos médicos, bem como à produção de enzimas (proteases, fosfolipases, hemolisinas) e outros fatores de virulência que permitem ao fungo evadir as defesas do hospedeiro (NAGLIK; RICHARDSON, 2014).

O risco de candidíase é aumentado por fatores predisponentes tais como doenças imunossupressoras, transfusões sanguíneas ou transplante de órgãos, o uso de antibióticos de amplo espectro ou corticosteroides, intervenções invasivas, quimioterapia agressiva, nutrição parenteral, próteses contaminadas. A situação é agravada pelos inúmeros problemas enfrentados durante o tratamento com os fármacos disponíveis atualmente. O rápido desenvolvimento de resistência das cepas de *Candida* contra muitos antifúngicos utilizados, principalmente aos derivados azólicos, compromete seriamente as terapias antifúngicas. Anfotericina B (AMB), que é o principal fármaco utilizado no tratamento de candidíases sistêmicas, também está causando lentamente resistência em algumas espécies de *Candida*, apresenta diversos efeitos secundários indesejáveis associados à sua utilização, incluindo a nefrotoxicidade (LANIADO-(LABORIN; VARGAS, 2009). Portanto, a descoberta e o desenvolvimento de novos anti-fúngicos é uma necessidade premente e urgente (PASQUALOTTO; DENNING; 2008)

Aplicação terapêutica prospectiva de peptídeos antimicrobianos (PAMs) tem recebido muita atenção recentemente, devido à seu amplo espectro de atividade e menor probabilidade de indução de resistência (GIULIANI; PIRRI; NICOLETTO, 2007). Os PAMs são produtos codificados por genes produzidos pelas células plantas e animais e atuam como uma primeira linha de defesa contra patógenos. Também chamados peptídeos de defesa do

hospedeiro, seu mecanismo primário de ação é a desestabilização das membranas de patógenos, após interação eletrostática entre o peptídeo catiônico e componentes aniônicos de membrana e parede de célula, tais como fosfolípidos, ácidos teicoicos e lipopolissacarídeos em bactérias (MALANOVIC; LOHNER, 2016) e manoproteínas ou enzimas ligadas à membrana tais como p-glucano e quitina sintases em fungos (SONESSON et al.,2006)

As catelicidinas, tal como outros péptidos antimicrobianos, exibem atividades antimicrobianas contra um amplo espectro de micróbios, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vírus e fungos (GIULIANI; RINALDI, 2011). Recentemente, os precursores de catelicidinas das glândulas de veneno de viperídeos da América do Sul foram estudados e reportados. Estes precursores codificam sequencias maduras, tipo catelicidina, denominadas coletivamente de viperidinas. Considerando o perfil antimicrobiano, antitumoral e citotóxico apresentado pelas viperidinas é possível sugerir que elas são um modelo promissor para o desenvolvimento de fármacos de largo espectro a partir de peptídeos. Em face dessas considerações e diante da necessidade de encontrar uma alternativa terapêutica para o tratamento de Candidíases neste estudo avaliou-se os perfis de atividade antifúngica, e realizar os primeiros ensaios para determinar o mecanismo de ação desses peptídeos frente a cepas de *Candida* sp.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E JUSTIFICATIVA

A seguir será apresentada uma revisão da literatura com maiores detalhes sobre todos os aspectos previamente citados na Introdução. No que se refere às Candidíases invasivas (CIs), serão abordados os fatores de risco da ocorrência dessas infecções, as principais espécies envolvidas, virulência e patogenicidade da *Candida albicans*, e principais desafios terapêuticos do tratamento das CIs. Em seguida serão apresentados os peptídeos antimicrobianos, suas características físico-químicas, os principais modelos aceitos sobre os mecanismos de ação. A revisão será finalizada com a origem e caracterização da molécula de estudo, o Ctn[15-34].

2.1 Candidíases invasivas

Nas últimas décadas, houve um aumento significativo na incidência de infecções fúngicas em seres humanos, especialmente a partir de 1980 devido ao grande número de pacientes imunocomprometidos reconhecidos como grupo de risco para essas infecções (transplantados, diabéticos, HIV positivos, entre outros) (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). De modo que inúmeras espécies fúngicas oportunistas começaram a ser relatadas com mais frequência como agentes patogênicos. Dos fungos mais frequentemente isolados desse tipo de infecções estão as espécies de *Candida* como os principais agentes etiológicos envolvidos (COLOMBO et al., 2007; SILVA et al., 2012).

As candidíases abrangem uma ampla gama de doenças desde manifestações clínicas mais superficiais e mais leves como a candidíase esofágica ou orofaríngea para infecções graves, incluindo infecções sanguíneas e candidíase disseminada, enquanto a descrição de candidíase invasiva abrange doenças graves como a candidemia, endocardite, infecções disseminadas, infecções do sistema nervoso central, endoftalmite e osteomielite. Apesar dos avanços alcançados no diagnóstico e tratamento da candidíase, a infecção ainda causa altas taxas de mortalidade (GUDLAUGSSON et al., 2003; PAPPAS, 2006).

2.1.1 Fatores de riscos das Candidíases invasivas (CIs)

O aumento na incidência de infecções fúngicas geralmente está associado ao crescente uso de dispositivos médicos, como implantes, próteses e cateteres, bem como o excessivo uso de agentes antimicrobianos, ao envelhecimento da população e ao aparecimento cada vez maior de pacientes imunocomprometidos (HENRIQUE; NEGRI; SILVA, 2012).

No que se refere especificamente aos fatores de risco para CI, estes podem ser divididos em dois grupos: fatores relacionados ao hospedeiro e fatores associados aos cuidados intensivos durante internação hospitalar, incluindo, entre outros, o uso de cateter, a nutrição parenteral, intervenções cirúrgicas e uso de antimicrobianos por longos períodos.

Os principais fatores relacionados ao hospedeiro são as doenças imunossupressoras, a neutropenia, a idade e a debilidade da condição clínica geral devido a doenças pré-existentes, como tumores e neoplasias malignas hematológicas, insuficiência renal crônica, ocorrência de candidemias prévias (BOUZA; MUÑOZ, 2008; PLAYFORD et al., 2008).

Os riscos associados aos cuidados de saúde mais comuns são a permanência prolongada no hospital ou na UTI (PFALLER; DIEKEMA, 2007). Fatores de risco Associadas à longa internação na UTI incluem intervenções invasivas e colonização. Diferentes estudos relacionam os pacientes hospitalizados em UTI à incidência de candidemias, e tem por objetivo determinar os fatores de riscos para esse acometimento. Alguns destes estudos confirmam como fatores de risco para candidemia por IC: presença de cateteres venosos centrais, intervenções cirúrgicas, ventilação mecânica, tratamento antibiótico previamente recebido, transplante de órgãos, transfusões sanguíneas, uso de antibióticos de largo espectro ou corticosteróides, intervenções invasivas, quimioterapia agressiva, alimentação parenteral e prótese interna aumentam o risco de candidíase (PAPPAS, 2006; LEROY et al., 2009).

A colonização de *Candida* é um fator de risco, cuja importância foi percebida nos últimos anos. De acordo com vários estudos, esse fator de risco para o desenvolvimento de CIs está mais relacionado à presença ou ausência de colonização do que ao número de regiões colonizadas. No entanto, a detecção de colonização em qualquer parte do corpo é apenas um fator de risco, não uma doença, e o tratamento não deve ser iniciado. Por outro lado, a falta de colonização de *Candida* é um forte indicador a favor da exclusão do diagnóstico de CI (CHARLES et al., 2005; YAPAR, 2014).

O aumento do número de casos de CI causados por espécies de *Candida* não-*albicans* tem exigido uma reavaliação dos mais atenta dos fatores de risco a fim de tentar correlaciona-los com a mudança no perfil de incidência das espécies de *Candida*. De modo que alguns estudos identificaram o uso de glicocorticóides, a presença de cateteres venosos centrais e a candidúria como fatores de risco independentes para infecções devidas a espécies não albicans (DIMOPOULOS et al., 2008), além desses fatores, o tratamento prolongado com fluconazol (CHOW et al., 2008), cirurgias do trato gastrointestinal, uso de drogas intravenosas também têm sido relatados (BOUZA; MUÑOZ, 2008).

2.1.2 Principais agentes de candidíases invasivas

Sabe-se que mais 150 espécies de *Candida* estão presentes na microbiota normal do corpo humano e de animais (SARDI et al., 2013). Dentre estas, somente 15 espécies são comumente isoladas e identificadas como agentes infecciosos patogênicos em humanos e animais. São elas: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae*, *Candida dubliniensis*, *Candida pelliculosa*, *Candida kefyr*, *Candida lipolytica*, *Candida famata*, *Candida inconspicua*, *Candida rugosa*, e *Candida norvegensis*. Embora a frequência com que são isoladas varie bastante, diferentes estudos nos últimos 20 anos tem mostrado que em 95% dos casos de candidíases os patógenos envolvidos são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, e *C. krusei* (DIEKEMA et al., 2012; LEWIS, 2009).

Apesar de *C. albicans* ser a espécie mais isolada nos casos de candidíases, espécies de *Candida* não-*albicans* estão emergindo como a segunda ou terceira maior causa de candidemia principalmente em crianças (JUYAL et al., 2013; RUAN et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014; KUAFFMAN, MARR; THORNER, 2014).

Uma revisão sobre a distribuição de espécies de *Candida* causadoras de CI nos países da América Latina mostra que *C. albicans* é a espécie mais comumente encontrada. O segundo agente infeccioso mais comum é a *C. parapsilosis* em muitos países, afetando principalmente neonatos ou pacientes com cateter venoso hospitalizados em UTI. A incidência de *C. parapsilosis* aumentou dramaticamente, evidenciada pelos relatos que a indicam como a segunda mais comumente isolada espécie de *Candida* de hemoculturas (PFALLER et al., 2001; MUJICA et al., 2004) e, em alguns países europeus (PFALLER et

al., 2001), Ásia (NAKAMURA; TAKAHASHI, 2006), e hospitais sul-americanos (MEDRANO *et al.*, 2006), *C. parapsilosis* supera até mesmo *C. albicans*.

Mesmo com o aumento da incidência de outras espécies de *Candida* associadas a candidíases invasivas, a maioria dos estudos mostra que cepas de *C. albicans* constituem pelo menos 60% das espécies de *Candida* isoladas em amostras clínicas (COUTO; CARLOS; MACHADO, 2011). Em humanos, a *C. albicans* geralmente coloniza algumas regiões, incluindo a pele, a orofaringe, o trato respiratório inferior, o trato gastrointestinal e o sistema geniturinário (SARDI *et al.*, 2013). Seus aspectos patogênicos e fatores de virulência têm sido amplamente estudados no intuito de estabelecer métodos profiláticos e terapêuticos para essas infecções, e serão apresentados a seguir.

2.1.3 Aspectos patogênicos e fatores de virulência da *C. albicans*

A *Candida* é fungo comensal que habita vários nichos do corpo humano, incluindo a cavidade bucal, trato gastrintestinal, vagina e pele de indivíduos saudáveis, sendo considerado também o mais frequente patógeno fúngico isolado de sítios clínicos (SENEVIRATNE; SAMARANAYAKE, 2008). A transição do inócuo comensal ao parasita depende de alguns fatores. A capacidade das candidas de provocar uma infecção no organismo está relacionada, além das condições do próprio hospedeiro, com sua virulência (GIOLO, SVIDZINSKI, 2010; SARDI *et al.*, 2013).

Nos que se refere especificamente a *C. albicans* os seus fatores de virulência incluem o polimorfismo, a expressão de adesinas e invasinas na superfície celular, a formação de biofilmes, secreção de enzimas hidrolíticas, alto poder de adaptação a oscilações de pH (ARENDRUP *et al.*, 2013; MAYER *et al.*, 2013).

C. albicans é um fungo polimórfico que pode crescer como levedura em forma ovóide, hifas verdadeiras ou ainda assumir a forma de pseudohifa (em que as células são alongadas e se encontram agrupadas) (POIKONEN *et al.*, 2010). A transição entre as formas de crescimento de leveduras e hifas é denominado dimorfismo e é importante fator de patogenicidade (JACOBSEN *et al.*, 2012). Isso porque a forma de hifa é mais invasiva que a forma leveduriforme (BERMAN; SUDBERY, 2002). Acredita-se, que a forma de levedura está envolvida na disseminação da *C. albicans* no hospedeiro (SAVILLE *et al.*, 2002) enquanto as hifas possuem proteínas específicas que atuam nos processos de adesão e invasão

da *Candida* ao epitélio da mucosa. Entre as proteínas associadas a hifas destacam-se a proteína de parede da hifa Hwp1p e a proteína Als3p - *sequência tipo aglutinina* (agglutinin-like sequence), que são consideradas fatores de virulência que promovem a adesão e invasão do epitélio da mucosa (ZHU; FILLER, 2010). Mutantes que são incapazes de formar hifas sob condições *in vitro* são geralmente atenuados na virulência. Além disso, já foi demonstrado que a expressão do gene da ALS3 é aumentada durante a infecção de células da mucosa oral *in vitro* e também durante a invasão da mucosa vaginal *in vivo* (ZAKIKHANY et al., 2007; NAGLIK et al., 2011; WÄCHTLER et al., 2011).

Outras proteínas atuam em conjunto com as Hwp1p e Als3p contribuindo com a adesão. Estas incluem proteínas ligadas a GPI (Eap1, Iff4 e Ecm33), proteínas não covalentes associadas à parede (Mp65, B-glucanase e Phr1, uma β -1,3 glucanosil transferase), proteases associadas à superfície celular (Sap9 e Sap10) e proteína de superfície integrin-like Int1 (ZHU; FILLER, 2010; NAGLIK et al., 2014). *C. albicans* pode utilizar dois mecanismos para invadir os epitélios das mucosas: por endocitose mediada pela Als3p e outras adesinas de superfície, ou penetração ativa mediada por mecanismos moleculares ainda indefinidos (DALLE et al., 2010).

Além da ALS3 outras adesinas da mesma família (Als1-7 e Als9). medeiam a aderência a entre células de *C. albicans* e outros microorganismos, superfícies abióticas e células hospedeiras (GARCIA et al., 2011; VERSTREPEN; KLIS, 2006) e juntamente com a Hwp1p demonstraram contribuir para a formação de biofilmes. Cateteres, dentaduras e superfícies de células mucosas são os substratos mais comuns (FANNING; MITCHELL, 2012). Os biofilmes maduros são muito mais resistentes agentes antimicrobianos e a fatores imunológicos do hospedeiro (FINKEL; MITCHELL, 2011). Os fatores considerados responsáveis pela maior resistência dos biofilmes incluem sua arquitetura complexa, e a expressão aumentada de bombas de efluxo de fármacos (UPPULURI et al., 2010). A principal proteína de choque térmico Hsp90 foi recentemente identificada como uma regulador chave da dispersão em biofilmes de *C. albicans* bem como associada aos mecanismos de resistência aos antifúngicos (ROBBINS et al., 2011).

Após adesão aos epitélios, as hifas de *C. albicans* podem secretar hidrolases, que têm sido relacionadas com os processos de penetração ativa das células à mucosa. Além disso, estudos indicam que as hidrolases secretadas também atuam para aumentar a eficiência da

aquisição de nutrientes extracelulares (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003). As hidrolases secretadas por *C. albicans*, são: as proteases, fosfolipases e lipases.

Um vez dentro do hospedeiro, a *C. albicans* deve ser capaz de se adaptar às mudanças de pH. O pH do sangue humano e tecidos é ligeiramente alcalino (pH 7,4), enquanto o pH do sistema digestivo varia de ácido muito ácido (pH 2) a levemente ácido (pH 8), o pH da vagina é em torno de pH 4. Os pH neutro e alcalinos pode causar estresse grave à *C. albicans*, incluindo mau funcionamento de proteínas sensíveis ao pH e diminuição da aquisição de nutrientes (DAVIS, 2009)

Além disso, essa espécie possui alta flexibilidade metabólica, potente sistema de aquisição de nutrientes e mecanismos robustos de resposta aos mecanismos imunológicos do hospedeiro (NICHOLLS *et al.*, 2011). Compreender os mecanismos de patogenicidade que *C. albicans* utiliza durante a infecção é crucial para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos e diagnósticos.

2.1.4 Principais desafios terapêuticos das Candidíases

A resistência a drogas de patógenos humanos e animais é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (DUARTE, 2006). Diversos são os relatos de cepas de *Candida* sp, isoladas de humanos, resistentes, *in vivo* e *in vitro*, a fármacos antifúngicos, principalmente a derivados azólicos, e dentre estes, ao fluconazol, sendo as espécies *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* as mais citadas (SANGLARD; ODSS, 2002; POSTERARO *et al.*, 2006; KALKANCI *et al.*, 2007). Alguns estudos avaliando cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, oriundas de animais, também demonstraram resistência, *in vitro*, a fluconazol, cetoconazol e itraconazol (OZAWA *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2007).

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. 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 exposição contínua a antifúngicos (PEREA *et al.*, 2001; SANGLARD; ODSS, 2002; CHONG *et al.*, 2007). Com relação à resistência que certas cepas de *Candida* apresentam aos derivados azólicos, as principais causas citadas são pontos de mutação no

gene ERG11, responsável pela produção da enzima 14 α -demethylase (VANDEPUTTE *et al.*, 2005), modificações no gene CDR, que codifica bombas de efluxo, bem como redução da permeabilidade da membrana a tal grupo de fármacos (PEREA *et al.*, 2001).

O desenvolvimento de resistência aos derivados azólicos pode também decorrer da exposição prolongada da cepa fúngica a este grupo de drogas, fato este, já observado em cepas de *C. albicans* e comum em pacientes portadores de HIV. Comumente tais pacientes apresentam candidíase orofaríngea e são tratados com fluconazol oral, que, apesar de eficiente e pouco tóxico, acarreta aumento da incidência de resistência clínica, levando à infecção por cepas resistentes a este fármaco (MARTÍNEZ *et al.*, 2002). Além disso, estudos apontam a correlação entre resistência de patógenos com infecções associadas aos cuidados com a saúde em hospitais (SIEVERT *et al.*, 2013).

A resistência clínica pode ocorrer por variados mecanismos, tais como: infecção por micro-organismo que apresenta resistência intrínseca; seleção de cepas resistentes, oriundas da pressão exercida pelo antifúngico; e desenvolvimento de resistência no microrganismo anteriormente sensível.

Modificações na interação da droga com a enzima-alvo também são citadas como causa de resistência. Mutações desse gênero são descritas em cepas de *C. albicans* resistentes fluconazol (KAKEYA *et al.*, 2000). ASAI *et al.* (1999) demonstram com seus resultados que este tipo de mutação acarreta não-perturbação da atividade da 14 α -demetilase pelo antifúngico, permitindo a mutantes a capacidade de produzir ergosterol normalmente, o que é uma eficiente estratégia de resistência (VANDEN BOSSCHE *et al.*, 2003).

Além dos derivados azólicos, um dos antifúngicos utilizados como referência para o tratamento de infecções fúngicas é a anfotericina B, no entanto seu uso é restrito devido sua nefrotoxicidade. A disfunção renal pode ser reversível quando finalizada a terapia, no entanto podem ocorrer reduções permanentes na filtração glomerular. Alguns dos efeitos colaterais que podem ocorrer durante a infusão da droga compreendem distúrbios gastrintestinais, febre, calafrios, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, reações alérgica e parada cardíaca (CASTRO *et al.*, 2006).

O mecanismo subjacente à lesão renal aguda induzida pela anfotericina B permanece mal compreendido, mas estudos indicam que pode ser uma toxicidade imunomediada. Verificou-se que algumas interleucinas pro-inflamatórias apresentam alta titulação no sangue de pacientes tratados com anfotericina B (CHAI *et al.*, 2013).

O uso de anfotericinas lipossomadas ou complexadas a fosfolipídeos, L- alfa-dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e L-alfa- dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), vêm sendo propostas como alternativas menos tóxicas do que a anfotericina convencional. Entretanto, estudos demonstram que embora a toxicidade seja reduzida, após tratamento com as AMBs alternativas, observa-se que à curto prazo algumas alterações morfológicas nas células do túbulo proximal, e após o uso prolongado observa-se vacuolização, aumento de lisossomas nas células tubulares (MUTLUAY *et al.*, 2012)

Diante desse quadro a busca ativa por novos agentes antifúngicos têm sido um dos principais objetos pesquisas no mundo todo. Nesse contexto, os venenos animais constituem fontes valiosas de polipeptídios biologicamente ativos, que podem servir como modelos para o desenvolvimento de novas drogas ou serem usados como insumos diagnósticos (FOX; SERRANO, 2007). Anêmonas e caramujo marinhos, aranhas, serpentes, escorpiões, entre outros, secretam uma diversidade de moléculas, dentre as quais figuram algumas classes de peptídeos catiônicos ou anfipáticos, que são capazes de interagir e interferir com distintos alvos celulares (BIERREL *et al.*, 2007; BRINGANS *et al.*, 2008; ESTRADA *et al.*, 2007; BECKER; TERLAU, 2008; KAMIYA *et al.*, 2006).

2.2 Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)

Antibióticos naturais são produzidos por organismos de diversos reinos e normalmente estocados em tecidos que estão constantemente em contato com patógenos. A produção desses compostos pode ser constitutiva ou estimulada pela presença de patógenos durante infecções (BECHINGER; LOHNER, 2006). Estas moléculas são em sua maioria de natureza peptídica, e constituem um sistema de defesa inato que funciona como barreira química contra a invasão de microorganismos patogênicos e complementa o sistema imune adaptativo mediado por células altamente específicas, funcionando assim como um sistema secundário de defesa de rápida ação (SHAI, 1999).

Desta forma, os denominados peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas que fazem parte do sistema imune inato de vertebrados e invertebrados, possuindo um amplo espectro de atividades contra fungos, bactérias, vírus e parasitas. Vários peptídeos antimicrobianos já foram descritos em diversos grupos de eucariotos, tais como moluscos, insetos, crustáceos, plantas, anfíbios, peixes e mamíferos (BRANDENBURG *et al.*, 2012; RIZZA *et al.*, 2008; ROSA; BARRACCO, 2010). Os PAMs foram reconhecidos como uma

das moléculas mais antigas evolutivamente que têm sido eficazmente preservadas em mamíferos (MITTA *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2012).

Os PAMs são moléculas *gene-encoded*, codificadas por genes simples e são sintetizadas como polipeptídeos nos ribossomos. Em geral os PAMs são peptídeos pequenos (30-60 aminoácidos), fortemente catiônicos, anfipáticos, estáveis ao calor (100 °C, 15 min), e resistentes à ação de outras drogas. A capacidade que os PAMs possuem de interagir com 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).

2.2.1 Características físico-químicas dos PAMs

Os aminoácidos podem ser classificados como hidrofílicos ou hidrofóbicos, dependendo da carga e polaridade da sua cadeia lateral. Se o aminoácido é hidrofílico ou hidrofóbico determina o quanto ele irá interagir com outros aminoácidos e com outras estruturas. De modo que a sequência dos aminoácidos que constituem cada PAM conferem a cada peptídeo um conjunto de características físico-químicas que são determinantes para a atividade biológica dessas moléculas. Entre elas: cationicidade; α -helicidade; anfipaticidade; hidrofobicidade; e polaridade angular (POWERS; HANCOCK, 2003; RÁDIS-BAPTISTA *et al.*, 2008; YANMEI *et al.*, 2012).

A cationicidade é caracterizada por um elevado número de aminoácidos positivamente carregados distribuídos ao longo da face hidrofílica da hélice, e nos PAMs varia normalmente entre as cargas +2 a +9. A cationicidade é uma propriedade fundamental na seletividade dos PAMs propiciando a interação com fosfolipídios carregados negativamente. Por outro lado, estudos evidenciam que peptídeos fortemente catiônicos podem apresentar alta toxicidade, como a atividade hemolítica (DATHE; WIEPRECHT, 1999).

A hidrofobicidade de um peptídeo é definida como a média de valores numéricos da hidrofobicidade de cada resíduo de aminoácido que constitui a cadeia polipeptídica e é uma medida da habilidade de um peptídeo mover-se de uma fase aquosa para uma fase hidrofóbica (ZHAO, 2003). Este parâmetro mede o grau de afinidade do peptídeo com as cadeias lipídicas

dos modelos de membranas por isso é um fator essencial para as interações entre os peptídeos e as membranas (YEAMAN *et al.*, 2003).

A medida do momento hidrofóbico está relacionado com a anfipaticidade dos peptídeos. Na α -hélice anfipática ideal (o ângulo formado entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos está próximo de 100°) o momento hidrofóbico é representado pelo somatório dos vetores de hidrofobicidade de cada resíduo de aminoácidos perpendicular ao eixo da hélice, e pode ser usada na predição da atividade de peptídeos helicoidais em membranas (DATHE *et al.*, 1999).

A helicidade descreve a propensão do peptídeo à estruturação em hélice anfipática e é determinada pela magnitude do momento hidrofóbico, resultando em cadeias polares alinhadas em um domínio da hélice e resíduos hidrofóbicos dispostos no domínio oposto mantendo uma relação direta com o aumento do índice de momento hidrofóbico.

Já o ângulo polar é uma medida da proporção relativa entre os domínios polares e não-polares da α -hélice de um peptídeo. Quanto maior o índice de ângulo polar menor é a superfície hidrofóbica do peptídeo. Estudos mostram que este tipo de estruturação dos peptídeos antimicrobianos ocorre quando há interação destes com a membrana devido a alterações no momento hidrofóbico e no ângulo polar (CONLON *et al.*, 2007).

Determinar as características físico-químicas de um PAM é fundamental para compreender os mecanismos de interação destes com as diferentes membranas celulares. Além disso, esses aspectos são especialmente importantes para o desenvolvimento de análogos de peptídeos biologicamente ativos que podem ter suas atividades biológicas melhoradas através da deleção, adição e modificação racional da sequência de aminoácidos. Desta forma, os análogos peptídicos podem ter suas atividades, estabilidade e seletividade modificadas. Esse tipo de estudo, denominado relação-estrutura atividade (SAR), só pode ser desenvolvido a partir da síntese de peptídeos, seja ela química, enzimática ou via DNA recombinante.

2.2.2 Mecanismo de ação dos PAMs

Os PAMs apresentam propriedades multifuncionais sendo possível relacioná-los como agentes terapêuticos potenciais. Estudos *in vitro* mostram que esses peptídeos causam morte rápida, muitas vezes em minutos, de um amplo espectro de organismos patogênicos, como as

bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, os fungos, parasitas, vírus, além de sua ação contra células tumorais. A ação dessas moléculas sobre as células alvo variam desde a permeabilização da membrana até ações intracelulares, e atividades imuno-moduladoras (Figura1).

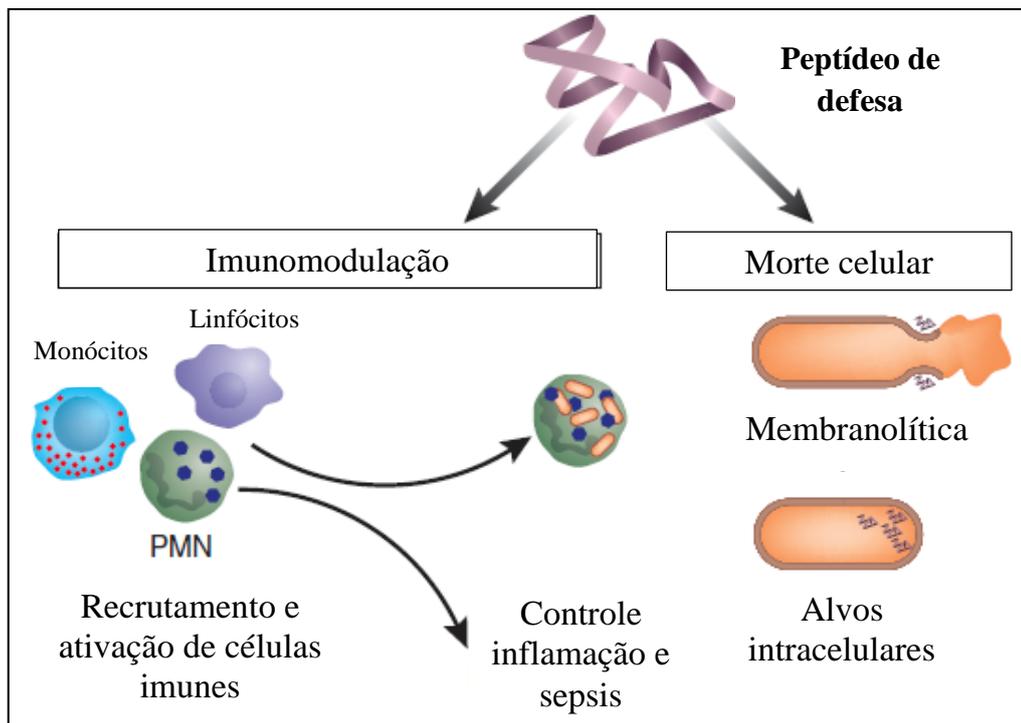


Figura 1. Mecanismos de ação de peptídeos de defesa encontrados em mamíferos. Fonte: HANCOCK & SAHL, Nature Biotechnology, (2006).

2.2.2.1 Mecanismo de ação membranolíticos

A interação dos peptídeos com as membranas resulta na formação de poros tipo 'barrel-stave', 'carpet-like' ou 'toroidal', e essas interações ocorrem em todos os peptídeos antimicrobianos (EPAND; VOGEL, 1999; BROGDEN, 2005). A seguir serão apresentados estes modelos específicos, propostos para explicar a atividade membranolítica dos PAMs:

a) Modelo de “Barrel-Stave”;

Este modelo propõe a formação de poros transmembrana a partir das moléculas de peptídeo. Após a interação eletrostática entre o peptídeo e a membrana, as moléculas dos peptídeos se estruturam em α -hélice e se inserem através da bicamada lipídica, de modo que as regiões hidrofílicas do peptídeo formem a face interior do poro, permitindo o extravasamento de conteúdo citoplasmático. A etapa crítica na formação do poro é a inserção do monômero do peptídeo na membrana, pois sua estruturação transmembrânica é normalmente desfavorável energeticamente (SHAI, 2002).

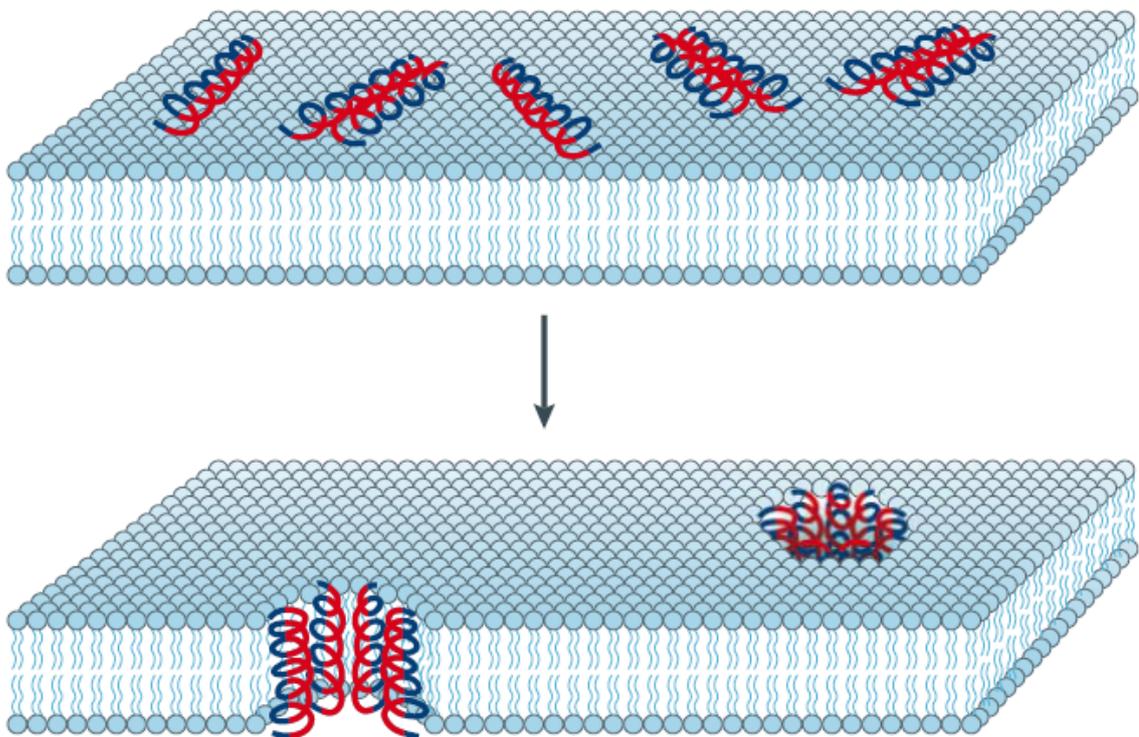


Figura 2. Modelo barril (Barrel-stave). Regiões hidrofílicas do peptídeos são mostrados em vermelho, e as regiões hidrofóbicas em azul. Fonte: BROGDEN, Nature (2005).

b) Modelo “Carpet-Like”

Assim como nos demais modelos, o primeiro contato entre peptídeos e membrana é mediado por interação eletrostática. Após essa interação inicial, ocorre o alinhamento dos peptídeos de forma que os resíduos hidrofóbicos fiquem em contato com as cabeças dos fosfolipídios e reorientação dos peptídeos para o centro hidrofóbico da membrana. O resultado final é a desintegração da membrana em virtude da modificação da curvatura da mesma. Isso não exclui a formação de poros transientes antes da desintegração da membrana (SHAI, 2002).

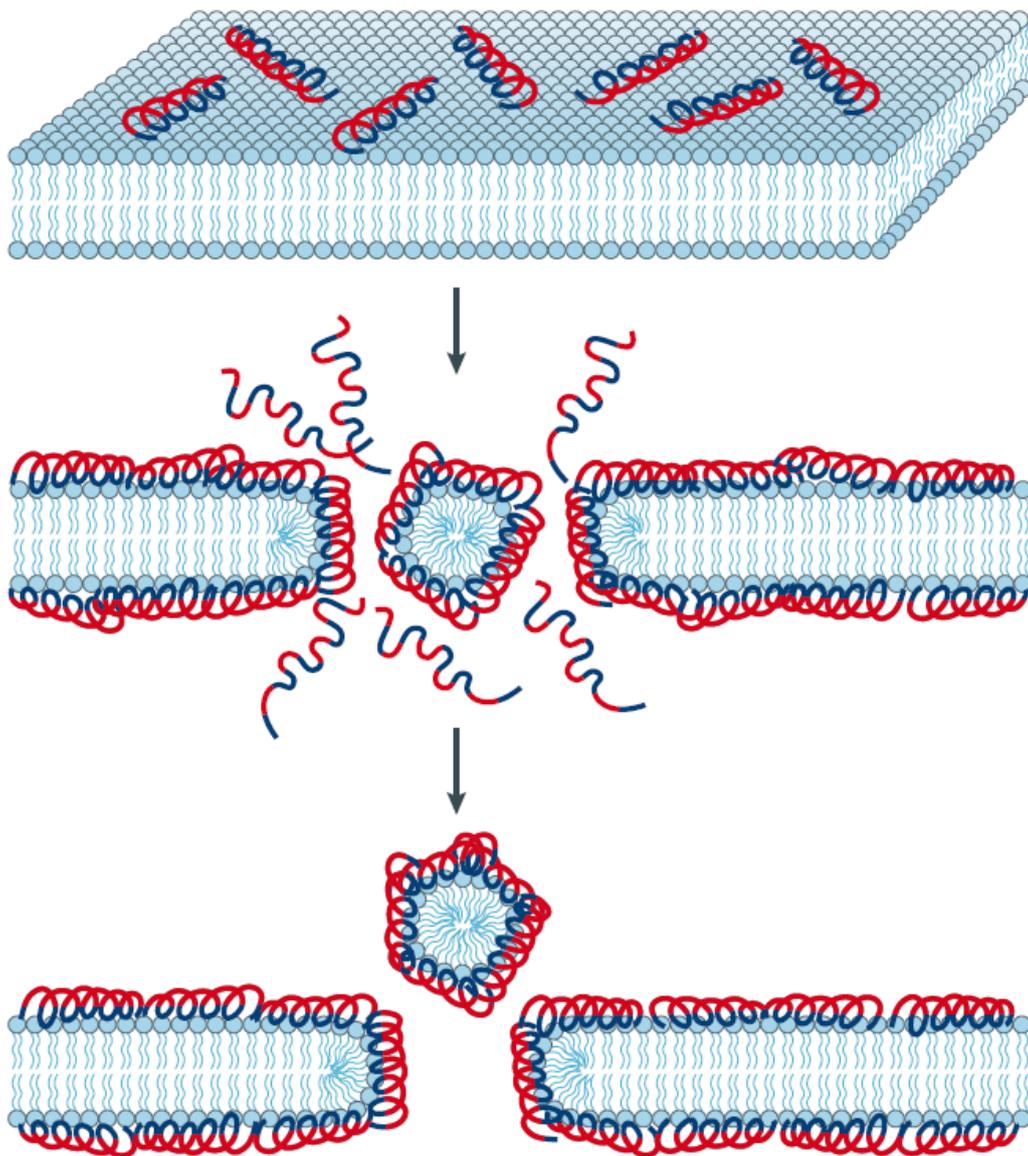


Figura 3. Modelo “carpet-like”. Regiões hidrofílicas dos peptídeos são mostradas em vermelho, e as regiões hidrofóbicas em azul. Fonte: BROGDEN, Nature (2005).

c) Modelo Toroidal

Após interagir com a membrana, neste modelo os peptídeos penetram perpendicularmente na membrana e induzem as monocamadas lipídicas a dobrarem formando o poro de modo que o interior hidrofílico seja revestido pelas regiões hidrofóbicas dos peptídeos juntamente com as cabeças polares dos fosfolipídeos.

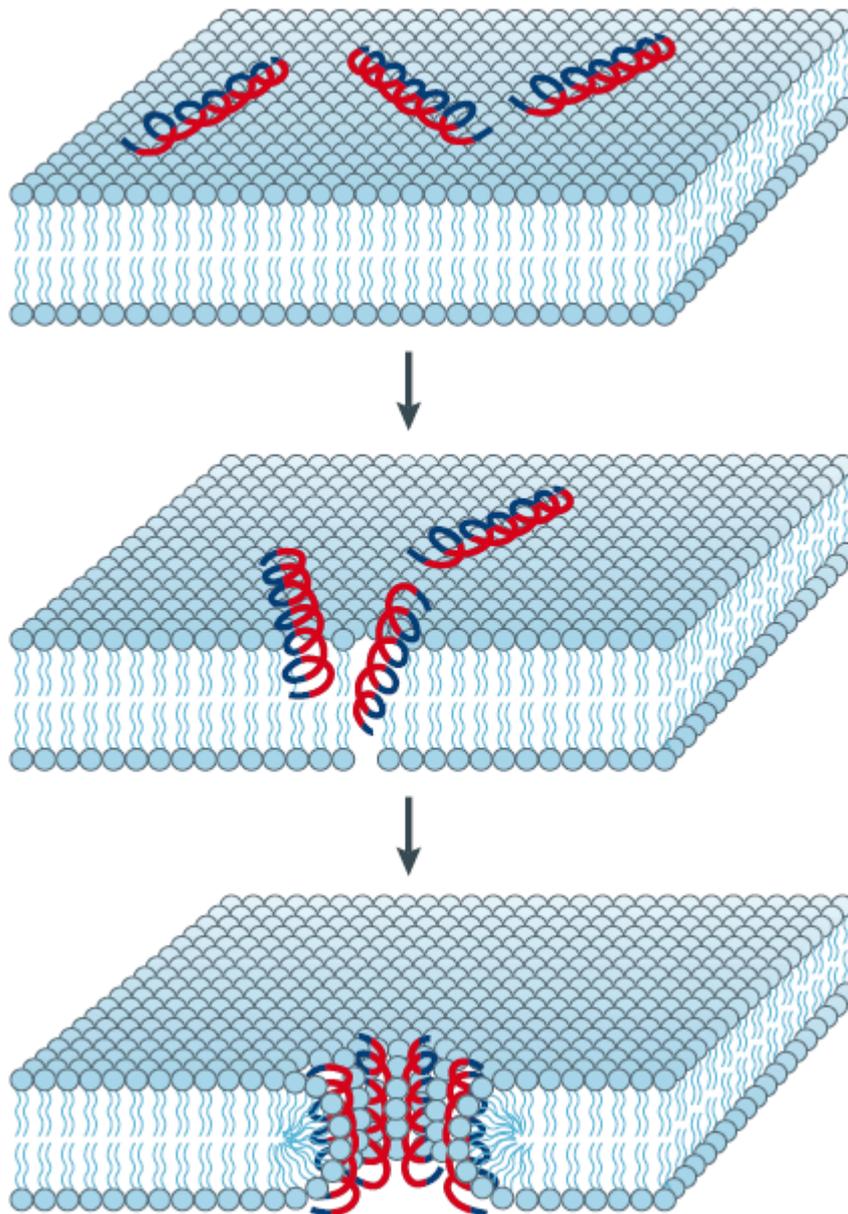


Figura 4. Modelo Toroidal. Regiões hidrofílicas do peptídeos são mostrados em vermelho, e as regiões hidrofóbicas em azul. Fonte: BROGDEN, Nature (2005).

2.2.2.1 Mecanismos de ação não-membranolíticos

Além dos mecanismos membranolíticos, os PAMs podem apresentar modelos de ação não-membranolíticos. Independentemente do mecanismo de ação, todos os peptídeos antimicrobianos interagem com a membrana nos primeiros instantes de contato. A interação com a membrana pode levar à formação de poros transitórios e transporte de peptídeos no interior da célula, colocando-os em contato com alvos intracelulares (MAROTI *et al.*, 2011). Os PAMs podem ter múltiplos alvos intracelulares, e podem se ligar ao DNA, RNA e proteínas, inibindo, por exemplo, a síntese da parede celular e a citocinese em células bacterianas, inibição da síntese de outras proteínas e inibição da atividade enzimática (BROWN *et al.*, 2006).

Em mamíferos, onde além de apresentarem atividade antimicrobiana através do aumento da permeabilidade da membrana de agentes patogênicos, demonstram a capacidade para modular a resposta imunológica através de uma variedade de mecanismos. Ambas as funções são parte integrante do processo de imunidade inata de mamíferos, e que associadas resultam em um amplo espectro de ação contra agentes infecciosos. Esses peptídeos são chamados de host defense-peptídeos, quando atuam mais amplamente como moduladores imunológicos e chamados de peptídeos antimicrobianos catiônicos quando têm alta atividade antimicrobiana em condições fisiológicas (HANCOCK & SAHL, 2006).

Existe uma enorme diversidade de sequências de PAMs, mas entre espécies relacionadas pode existir similaridade entre essas moléculas. tem-se argumentado que a imensa diversidade desses peptídeos é decorrente do seu papel antimicrobiano, considerando os diferentes microrganismos patogênicos que enfrentam cada hospedeiro. Exemplos dessa variação entre as origens, estruturas, e mecanismo de ação, podem ser encontrados na Tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de PAMs, estruturas primárias, secundárias e modo de interação com a membrana. Rádis-Baptista, J. Braz. Chem. Soc., Vol. 19, No. 2, 211-225, 2008.

Peptide	Amino acid sequences	Action on membrane and other targets
α -helical		
Buforin 2	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLR	Translocation DNA binding
Cecropin A	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGGQATQIAKamide	Pore-forming
Magainin 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	Pore-forming DNA synthesis inhibition
Hybrid cecropin A-magainin 2	KAKLFFKKIGIGKFLHSAKKFG	Membrane disruption Lower hemolytic activity
Hybrid buforin II-magainin 2	RAGLQFPVGGIGKFLHSAKKFGK	Translocation DNA synthesis inhibition
Linear non α -helical		
PR-39	RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRFamide	Translocation DNA synthesis inhibition
Histatin	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY	Translocation Enzyme inhibition
Cross-linked by three disulfide bonds		
Human α -defensin	VCSCRLVFCRRETELRVGNCLIGGVSFTYCCTRV	Membrane permeabilization DNA synthesis inhibition
Human β -defensin	GLGHRSDHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTCYRGKAKCCK	Membrane permeabilization
Plant defensin	RTCMIKKEGWGKCLIDTTCAHSCKNRGYIGGNCKGMTRTCYCLVNC	Membrane permeabilization Vesicle aggregation
Circular		
θ -defensin	RRICRCICGRGICRCICG	Bind to glycoproteins on virus surface

Diante de tantos mecanismos de ação apresentados são relatadas várias perspectivas de uso dessas moléculas, tanto na indústria farmacêutica como seu uso como ferramenta biomolecular.

2.3 Catelicidinas

Entre os PAMs encontrados em animais, as catelicidinas constituem um importante grupo de peptídeos host-defense do hospedeiro. As catelicidinas se destacam devido sua ampla distribuição entre as espécies, sendo encontradas em diferentes filos, desde o primitivo Hagfish até humanos, e amplo espectro de atividade antimicrobiana. (SCHWEIZER, 2009)

Todos os precursores de catelicidina partilham em comum uma pré-região conservada, na sua região N-terminal, que é composta pela sequência peptídica de sinal e pelo domínio catelina, um inibidor da catepsina-L (uma cisteína-protease). Localizadas na região C-terminal, as sequências peptídicas maduras são libertadas após clivagem por proteases, tais como elastase, e variam em comprimento e sequência, assumindo assim estruturas diversas. Como observado com outros peptídeos antimicrobianos, as catelicidinas têm um amplo espectro de atividade contra muitos tipos de microrganismos (ZHAO *et al.*, 2008, WANG *et al.*, 2008. Além disso, foi demonstrado que a sequência madura da LL-37 (a mais bem documentada catelicidina humana) poderia ser clivada por proteases, e os fragmentos peptídicos menores obtidos preservaram as atividades antimicrobianas (IZADPANA; GALLO, 2005). Estudos semelhantes sobre catelicidinas de outras espécies animais têm sido realizados utilizando recursos de bioinformática e síntese dos análogos peptídicos (WISHART, 2005; CHEN *et al.*, 2008).

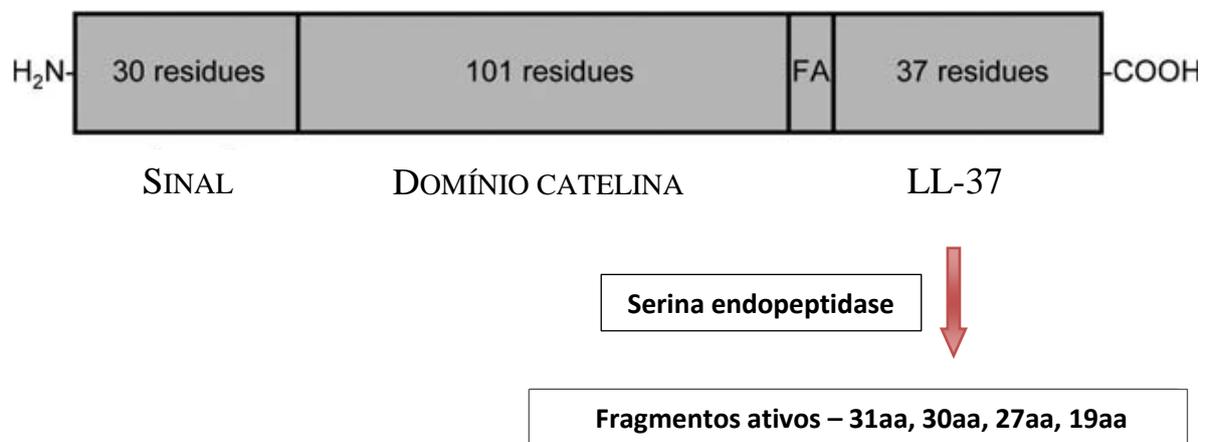


Figura 5. (A) representação da catelicidina humana hCAP18, com a região do peptídeo LL37. (B) Fragmentos ativos de LL37. Adaptada de Dürr et al. / Biochimica et Biophysica Acta 1758 (2006)

2.3.1 Viperícidinas

As PAMs relacionados com a catelicidina ou CRAMPs (cathelicidin related AMPs) também foram encontradas em venenos de serpentes asiáticas (FALCAO et al., 2014)¹⁻². Tal como outros PAMs, estes CRAMPs de reptéis atuam sobre as membranas de bactérias gram-negativas (ZHOU et al., 2011) e células de melanoma em ratos (WANG et al., 2013).

Seguindo a mesma abordagem, os precursores de catelicidinas das glândulas de veneno de serpentes da América do Sul foram estudados e reportados. Os novos peptídeos foram descobertos em veneno de serpentes da família Viperidae. Esses viperídeos são caracterizados pela presença de fosseta loreal e por sua dentição com grandes presas retráteis conectadas as glândulas de veneno, que podem ser utilizados como armas contra presas e predadores (HOSER, 2012).

Estes precursores codificam sequências maduras, semelhantes a catelicidina, denominadas coletivamente de viperícidinas (Catelicidinas de viperídeos), exibem boa atividade antibacteriana contra uma série de cepas bacterianas (*Streptococcus pyogenes*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Pseudomonas aeruginosa*), com baixa taxa de hemólise na concentração em que mostrou-se ativo, o que indicou a sua possível utilidade como estrutura modelo para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos (FALCÃO et al., 2014). De modo geral, o perfil antimicrobiano apresentado pelas viperícidinas sugere que elas são um modelo promissor para o desenvolvimento de fármacos de largo espectro a partir de peptídeos.

Mais recentemente, uma dessas viperícidinas - a crotalicidina (Ctn), assim denominada por ser constituinte do veneno da serpente sul-americana *Crotalus durissus terrificus* - foi estrutural e funcionalmente dividida em dois fragmentos, Ctn [1-14] e Ctn [15 - 34] (FALCAO et al., 2015). Em conjunto, Ctn e seus fragmentos, são denominados crotalicidinas. As sequências de aminoácidos e algumas características físico-químicas das crotalicidinas estão encontradas na Tabela2.

Tabela 2. Estrutura primária e propriedades físicoquímicas da crotalicidina e fragmentos. Adaptada de Falcão et al., J. Med. Chem, 2015.

Peptide	One-letter aminoacid sequence ^a	Molecular mass ^b	Charge ^c	Hydrophobicity, H ^d	Hydrophobic moment μ_H^d
	* * * *				
Ctn	KRFKKFFKKVKKSVKKRLKKIFKKPMVIGVTIPF	4151.38	+16	0.263	0.440
Ctn[1-14]	KRFKKFFKKVKKSV	1797.31	+9	-0.012	0.763
Ctn[15-34]	KKRLKKIFKKPMVIGVTIPF	2371.11	+8	0.455	0.311

a Asterisk (*) indicates elastase putative cleavage sites (http://web.expasy.org/peptide_cutter/). Peptides are C-terminal amides.

b Determined by LC-MS. Theoretical mass, in parentheses, from <http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-propertycalculator.asp>.

c At neutral pH, from <http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-propertycalculator/peptide-property-calculator.asp>.

d From <http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>

Apesar de Ctn [1-14] ter mantido a estrutura a-helicoidal de Ctn, não apresentou toda a atividade antibacteriana e anticancerígena do peptídeo parental. Por outro lado, o fragmento Ctn [15-34], sem estrutura definida, além de preservar a atividade biológica do peptídeo parental, o Ctn, demonstrou uma toxicidade muito mais baixa para as células saudáveis do que a seqüência completa (Figura 6).

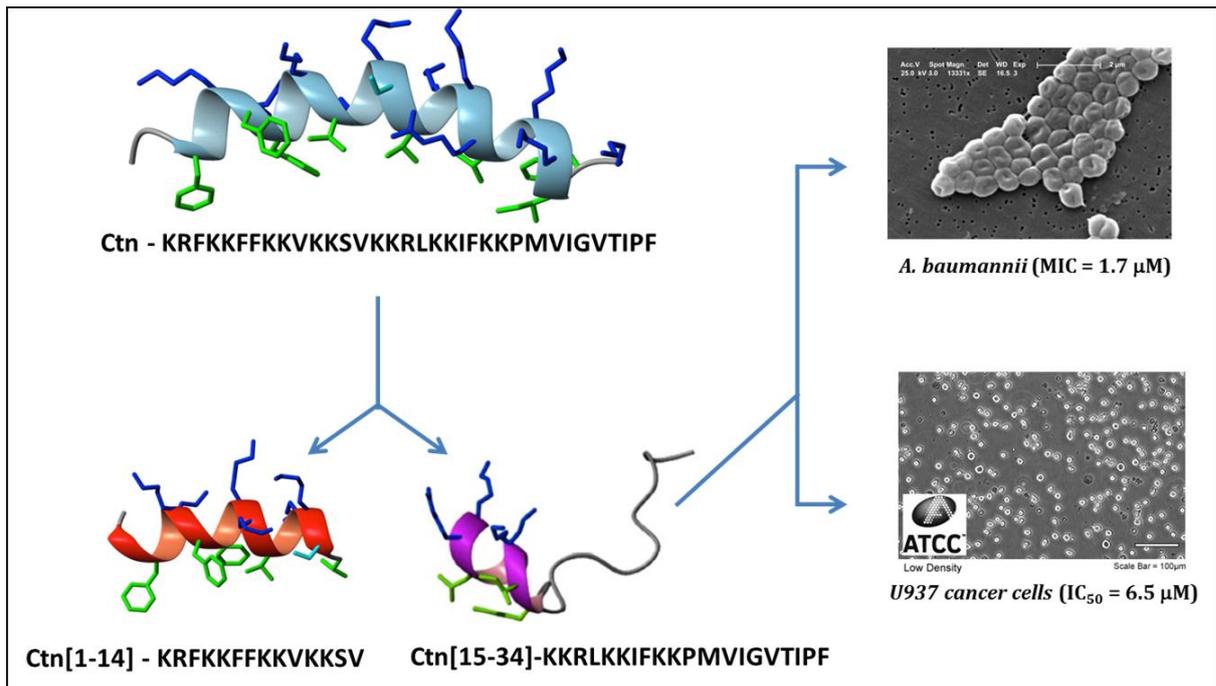


Figura 6. Estrutura secundária da Crotalicidina (Ctn) e fragmentos Ctn[1–14] e Ctn[15–34]. Destaque para as atividades biológicas do Ctn[15–34]. Adaptada de Falcão et al. / J Med Chem (2015).

2.4 Justificativa

Diante do que foi exposto, observa-se que a grande incidência de infecções fúngicas por espécies de *Candida* juntamente com a resistência que estes microrganismos têm desenvolvido aos antifúngicos convencionais tem levado a uma busca por alternativas terapêuticas que possam oferecer condições de tratamento aos pacientes comprometidos. O uso de peptídeos antimicrobianos surge como fonte para a busca de novos compostos com atividade antifúngica, devido seu potencial farmacológico como agentes de amplo espectro, possuindo atividade frente um grande número de microrganismos multiresistentes a drogas. Diversos peptídeos têm sido isolados e sintetizados, incluindo as crotalícidinas. Em estudos preliminares, uma dessas crotalícidinas, o peptídeo Ctn[15-34] apresentou atividade significativa contra cepas de levedura. De modo geral, o perfil antimicrobiano apresentado pelas crotalícidinas sugere que elas são um modelo promissor para o desenvolvimento de fármacos de largo espectro a partir de peptídeos. No entanto, são necessários estudos que comprovem o perfil de atividade antifúngica frente diferentes espécies fúngicas, aspectos relativos à sua toxicidade, além de uma indicação dos mecanismos de ação pelos quais esse peptídeo age sobre essas cepas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Investigar o potencial antifúngico e mecanismo de ação de crotalícidinas, peptídeos derivados de uma catelicidina expressa nas glândulas de veneno de cascavéis.

3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar em fase sólida as crotalícidinas, Ctn e os fragmentos Ctn[1-14] e Ctn[15-34], e seus derivados marcados com carboxifluoresceína;
- Obter a CIM das crotalícidinas frente a cepas de leveduras oportunistas e dermatófitos;
- Avaliar a viabilidade celular microbiana de leveduras oportunistas tratadas com as crotalícidinas;
- Determinar a citotoxicidade, *in vitro*, das crotalícidinas em relação a células eucarióticas saudáveis;
- Testar o efeito da associação das crotalícidinas com AMB frente cepas de *C. albicans*;
- Avaliar a interação entre o fragmento Ctn[15-34] marcado com carboxifluoresceína e a *C. albicans*.
- Investigar o mecanismo de morte celular de *C. albicans* induzido pelo Ctn[15-34].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese, Purificação e Análise das crotalícidinas

4.1.1 Síntese dos peptídeos em fase sólida

A síntese automatizada das crotalícidinas, Ctn e os fragmentos Ctn[1-14] e Ctn[15-34] foi realizada no sintetizador de peptídeos ABI433 (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando a química de Fmoc, numa escala de síntese de 0.1 nmol (Fmoc-Rink-amide ChemMatrix resina). As cadeias laterais dos aminoácidos foram protegidas com os grupos tert-butyl (Glu, Ser, Thr, Tyr), N^G-2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Arg), e trityl (Cys). Para o acoplamento, os aminoácidos (Fmoc-L-protégidos) estavam em excesso molar de oito vezes, e foi conduzido na presença de HBTU e DIEA 2xmolar, tendo o DMF como solvente. Antes do desacoplamento, os peptídeos Ctn[15-34] protegidos, preso à resina, foram transferidos para seringas individuais de poliestireno, contendo um filtro poroso e foram diretamente N-desprotegidos. Uma parte do Ctn[15-34] foi separado antes da desproteção de todos os grupos radicais, adicionou-se um 1,1 equivalente de FITC à resina e deixou-se durante a noite para completar o acoplamento usando DIC como agente acoplador. Em todos os casos, a N-desproteção completa foi conduzida com uma mistura de ácido trifluoroacético (TFA): água (H₂O): triisopropilsilano (TIS) (95:2,5:2,5 v/v), em agitação por 90 minutos, a temperatura ambiente. Os peptídeos foram precipitados, pela adição de éter metil-tert-butila gelado, secados à vácuo, dissolvidos em 0,1 M de ácido acético e liofilizados.

4.1.2 Purificação e análise dos peptídeos por LC-MS

Os peptídeos sintetizados foram submetidos a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com uma coluna analítica de fase reversa Luna C18 (4.6 x 50 mm, 3 µm; Phenomenex, Jupiter, CA), usando como solvente A, 0.045% TFA em H₂O, e como solvente B 0.036% de TFA em acetonitrila (ACN), a um fluxo de 1 mL/min e detecção por UV (220 nm). HPLC preparativa dos peptídeos será conduzida também em colunas de C18, porém de dimensões maiores (21.2 x 250 mm, 10 µm; Phenomenex, Jupiter, CA). Foi utilizado gradientes lineares do solvente B (TFA a 0,1% em ACN) em A (0,1% de TFA em H₂O), com o fluxo de 25 mL/min. A LC-MS foi realizada num instrumento LC-MS 2010EV (Shimadzu) equipado com uma coluna XBridge (4,6 x 150 mm, 3,5 µm, Waters, Cerdanyola del Vallès, Espanha) eluído com A = ácido fórmico a 0,1% em água; B = ácido fórmico a 0,08% em

acetonitrila em gradientes durante 15 min a um fluxo de 1 mL / min, com detecção UV a 220 nm. As frações dos peptídeos com pureza adequada (> 95%) e com a massa molecular esperada serão combinadas e liofilizadas para ensaios biológicos posteriores. Para todos os ensaios, os peptídeos foram pesados separadamente e soluções mãe de 1 mM foram preparadas com água deionizada e armazenadas a 4° C durante até seis semanas. As sequências primárias Ctn, Ctn [1-14] e Ctn [15-34] também foram analisadas nos softwares “Peptide property calculator” (<http://www.pepcalc.com>) e “Heliquist” (<http://http://heliquist.ipmc.cnrs.fr/>) para obtenção algumas propriedades físico-químicas tais como o peso molecular teórico, carga líquida em pH neutro e hidrofobicidade.

4.2 Microrganismos

Foram utilizadas cepas clínicas de *Candida sp.* e *Cryptococcus laurentii* gentilmente cedidas pelo Hospital Santa Casa de Misericórdia de Sobral (Ceará, Brasil) onde foram identificadas. 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 (ANEXO III). As cepas de leveduras e dermatofitos utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 2. A identificação de estirpes de levedura foi realizada com o uso de CHROMagar-Candida (CHROMagar Company) e sistema automatizado VITEK 2 (bioMe'rieux) com cartão YST, e identificação por técnicas de biologia molecular. As cepas de dermatófitos, dos gêneros *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis*, foram identificadas de acordo com suas características morfológicas e perfis bioquímicos. As linhagens de leveduras foram cultivadas em placas de Ágar Sabouraud a 30° C durante 48 h. As suspensões de inóculo foram preparadas em 5 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, fosfato 35 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). Os dermatófitos foram cultivados em agar Sabouraud inclinados a 30° C por 7 dias. As colônias fúngicas foram então cobertas com 3 mL de PBS e suavemente raspadas com uma pipeta estéril. A turvação das suspensões foi medida a 600 nm e ajustada para se obter um inóculo apropriado.

Tabela 3. Relação das cepas de leveduras e dermatófitos utilizadas nos ensaios de microdiluição em caldo.

Cepas fúngicas	Origem
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Culture collection</i>
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	<i>Culture collection</i>
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	<i>Culture collection</i>
<i>Candida tropicalis</i> LABMIC 0109	<i>Amostra clinica</i>
<i>Candida albicans</i> LABMIC 0107	<i>Hemocultura</i>
<i>Candida albicans</i> LABMIC 0108	<i>Amostra Clínica</i>
<i>Candida parapsilosis</i> LABMIC 0113	<i>Hemocultura</i>
<i>Candida tropicalis</i> LABMIC 0112	<i>Hemocultura</i>
<i>Candida albicans</i> LABMIC 0101	<i>Hemocultura</i>
<i>Candida albicans</i> LABMIC 0102	<i>Hemoculture</i>
<i>Candida albicans</i> LABMIC 0103	<i>Urina</i>
<i>Cryptococcus laurentii</i> LABMIC 0404	<i>Aspirado traqueal</i>
<i>Microsporum canis</i> LABMIC 0401	<i>Amostra Clínica</i>
<i>Trichophyton rubrum</i> LABMIC 0203	<i>Amostra Clínica</i>
<i>Trichophyton rubrum</i> LABMIC 0204	<i>Amostra Clínica</i>

4.3 Microdiluição em Caldo

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos peptídeos contra as estirpes fúngicas foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com os documentos

M27-A3 e M38-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para leveduras e dermatófitos, respectivamente. A determinação destas CIMs para todas as estirpes fúngicas foi efetuada utilizando placas de microdiluição de 96 poços (E & K Scientific, Santa Clara, CA). Em seguida, as soluções de trabalho dos peptídeos foram diluídas seriadamente em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute - 1640) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), tamponado a pH 7,0 com ácido 0.165M morfolinepropanesulfônico (MOPS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), num volume final de 100µL/poço. Subsequentemente, foram adicionados a cada poço 100µL dos inóculos fúngicos em suspensão, contendo 2×10^6 cfu/mL (equivalente a 0,5 na escala de McFarland), em RPMI. As concentrações finais dos peptídeos variaram entre 0,0195 e 40 µM. Foram utilizados Anfotericina B (AMB) e Cetoconazol (Sigma Chemical, St. Louis, MO) como controles para leveduras e dermatofitos, respectivamente. A CIM foi definida como a menor concentração de peptídeo à qual nenhum crescimento fúngico foi visualmente observado após 48 horas para leveduras a 30°C e após 5 dias a dermatófitos em temperatura ambiente.

4.4 Viabilidade celular com BactiterGlo

Após a determinação das CIMs, Ctn, Ctn [1-14], Ctn [15-34] e AMB foram incubados novamente com as estirpes de levedura (*C. laurentii* e *Candida* spp.). Em placas de microdiluição de 96 poços, foi adicionado 100 µl de suspensões de levedura contendo 2×10^6 ufc/mL (equivalente a 0,5 na escala de McFarland) a 100 µl dos peptídeos, com concentrações finais variando de 2,5 a 40 µM, e AMB em concentrações finais variando de 0,06 a 2 µM para cada cepa testada. Após 48h de incubação a 30 °C, foram adicionados 100 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 e poços contendo apenas meio RPMI 1640 para obter e subtrair valores de luminescência do meio. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5 Cultivo de células eucarióticas

As células humanas saudáveis HK-2 (células epiteliais de túbulo proximal) foram obtidas a partir do Repositório de Linha de Câncer Celular do Instituto Municipal de Investigação Médica (IMIM) no Barcelona Biomedical Research Park (Barcelona, Espanha). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com soluções de soro fetal bovino a 10% (FBS), penicilina/ estreptomicina a 1%, L-glutamina a 1% e 0,5% de ITS-G (insulina transferina-selenio), em frascos T-75 cm² a 37 ° C, numa atmosfera umidificada com 5% de CO₂. As células foram separadas cada vez que atingiram 80-90% de confluência com o auxílio de uma solução de tripsina a 0,25% com EDTA a 2,21 mM.

4.6 Ensaios de citotoxicidade, *in vitro*, com células eucarióticas saudáveis

4.6.1 Avaliação da potencial nefrotoxicidade das Crotalícinas

Um total de 5000 células HK-2/poço foram semeadas em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação em meio RPMI 1640 suplementado com soluções de soro fetal bovino a 10% (FBS), penicilina/ estreptomicina a 1%, L-glutamina a 1% e 0,5% de ITS-G (insulina transferina-selenio), a 37° C e 5% de CO₂, as células tiveram o seu meio removido e foram adicionados novos meios contendo os peptídeos ou AMB em 2% de FBS. Os peptídeos foram diluídos seriadamente, variando de 0,39 a 400 µM. Após uma incubação adicional de 30 minutos, foram adicionados 15 µL de Cell Titer Blue (Promega) a cada poço e as placas foram reincubadas durante 24 horas. Após esse período, a intensidade de fluorescência foi então medida, com excitação de 530 nm e emissão de 590 nm, utilizando o leitor de microplacas de detecção múltipla Synergy HT (Biotek). A viabilidade relativa das células HK-2 foi calculada com células tratadas apenas com RPMI 1640 contendo FBS a 2% como controles, e os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6.2 Atividade Hemolítica

Foram coletados 10mL de sangue fresco (10 mL) em tubos contendo EDTA e centrifugados a 1000g durante 10 minutos a 4°C. Após a remoção do plasma, o sedimento contendo os glóbulos vermelhos (RBCs) foi lavado cinco vezes com PBS e, em seguida, novamente suspenso em PBS para obter uma solução com 8% (v/v) de eritrócitos. Foram adicionadas

alíquotas de 100 µL desta suspensão a diferentes tubos de microcentrífuga, contendo 100 µL de cada peptídeo ou AMB, diluído seriadamente, com concentrações variando de 0,2 a 200 µM. As concentrações finais foram: 4% (v/v) de suspensão de eritrócitos e 0,1-100 µM de peptídeo ou AMB. Estas suspensões resultantes foram incubadas com agitação durante uma hora a 37 ° C. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas durante 2 min a 1000 g. Os sobrenadantes foram transferidos para placas de microdiluição de 96 poços, e a liberação de hemoglobina foi medida por absorvância a 540 nm, utilizando o leitor Synergy HT (Biotek). Foram utilizados Triton X-100 a 1% e 4% (v/v) de RBCs em PBS sem peptídeos ou AMB (não tratados) como controles positivo e negativo, respectivamente. O percentual de hemólise foi calculado como $[(Abs_{540nm} \text{ tratado} - Abs_{540nm} \text{ não tratado}) / (Abs_{540nm} \text{ 1\% Triton X-100} - Abs_{540nm} \text{ não tratado})] \times 100$ e os experimentos foram realizados em triplicata.

4.7 Ensaios para avaliar o efeito sinérgico das crotalicidinas associadas à AMB

Para a realização dos ensaios para determinar a atividade sinérgica dos peptídeos combinados com a AMB foram utilizadas apenas cepas de *C. albicans*.

4.7.1 Técnica do Checkerboard

A atividade antifúngica de Ctn, Ctn[1-14] e Ctn[15-34], quando combinada com AMB, foi determinada pela técnica do checkerboard, um método utilizado para estimar a interação entre os fármacos pelo cálculo do índice de Concentração Inibitória Fracionada (FIC). Em placas de microdiluição de 96 poços, 50 µl de suspensões fúngicas (com 2×10^6 cfu / mL \approx 0,5 na escala de McFarland) em meio RPMI foram adicionados aos poços contendo cada um dos peptídeos associado com AMB, contendo a concentração final variando conforme realizado para a determinação das CIMs (peptídeos de 0,0195 a 40 µM e AMB de 0,0312 a 16 µM), obtidas através de diluições seriadas. As células tratadas com cada peptídeo ou com AMB sozinha, com seus respectivos valores de CIM, juntamente com suspensões fúngicas sem tratamento foram utilizadas como controles. Após incubação durante 48 horas a 30° C, os resultados foram observados visualmente e o índice de FIC foi calculado pela equação: índice $FIC = FIC^P + FIC^A$, onde "P" representa um dos peptideos (Ctn ou Ctn [1-14] ou Ctn [15-34]) e "A" a AMB. O FIC^P , por sua vez, foi calculado a partir da razão CIM^P combinada / CIM^P isoladamente, enquanto que a FIC^A foi calculada a partir da razão CIM^A combinada / CIM^A

sozinha. De acordo com os valores obtidos, a interação de cada peptídeo com a AMB pode ser classificada como: sinergismo se o índice FIC for $\leq 0,5$; Efeito indiferente quando $0,5 < \text{índice FIC} \leq 4,0$; e antagonismo se FIC índice $> 4,0$ (ODDS, 2003; JOHNSON *et al.*, 2004).

4.7.1 Interação entre Ctn[15-34] e AMB por citometria de fluxo

Adicionalmente, o efeito sinérgico do Ctn[15-34] com AMB foi demonstrado em células de *Candida* por citometria de fluxo usando iodeto de propídio (PI) como um marcador de viabilidade celular. Foram analisadas as células tratadas somente com Ctn[15-34] ou AMB, e tratadas com os respectivos valores combinados de CIM, durante 4h e 24h. As suspensões fúngicas contendo 2×10^6 cfu / mL ($\approx 0,5$ na escala de McFarland) em RPMI foram tratadas com Ctn[15-34] ($0,31 \mu\text{M}$) e AMB ($0,5 \mu\text{M}$), sozinhas ou combinadas, durante 4 h e 24 h . Após estes períodos de incubação, as células foram lavadas e foi adicionado PI em uma concentração final de $1,49 \mu\text{M}$. As células de *C. albicans* foram então colocadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA, EUA) e foram analisados 10.000 eventos vivos com o programa Cell Quest (Becton-Dickinson). As células sem tratamento com PI foram utilizadas como controles e os testes foram realizados em triplicata.

4.8 Teste de tempo de morte de células de *C. albicans* tratadas com Ctn[15-34]

As células de *C. albicans* ($\sim 2 \times 10^6$ CFU/ml) foram inoculadas em meio RPMI-1640 contendo $10 \mu\text{M}$ de Ctn [15-34] ou $2 \mu\text{M}$ de AMB. Os tubos foram incubados (30°C , a 200 rpm) e alíquotas de $100 \mu\text{l}$ foram removidas em pontos de tempo predeterminados (0, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h). As alíquotas foram diluídas seriadamente (10 vezes) em solução salina e plaqueadas em placas de ágar YEPD. O número de colônias foi contado após incubação das placas a 30°C durante 48 h.

4.9 Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica A2 foi mensurada seguindo o protocolo descrito por Cotrim *et al.* (2011) em placas de 96 poços, utilizando o lipídeo cromogênico ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzóico (4N3OBA, Biomol®, EUA) como substrato. As amostras foram solubilizadas em água Milli-Q. O ensaio foi composto da adição de 200 µL de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 8,0), 20 µL de substrato (4N3OBA), 20 µL de água e 20 µL do Ctn[15-34] nas concentrações finais de 10 e 20 µM em tampão de reação, para uma solução final de 260 µL. A atividade fosfolipásica foi aferida através de medidas de absorbância a 425 nm em intervalos de tempo de 10 minutos durante 40 minutos utilizando o leitor Synergy HT (Biotek). Foram analisados 10.000 eventos vivos com o programa Cell Quest (Becton-Dickinson). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.10 Ensaios de interação do FITC-Ctn[15-34] com a membrana de *C. albicans* analisados por citometria de fluxo

Para a análise da permeabilização da membrana fúngica após o tratamento com peptídeos, primeiramente células (~ 2x10⁶) de *C. albicans* em fase logarítmica foram suspensas em meio RPMI 1640. As células foram incubadas a 30° C com FITC-Ctn[15-34], nas concentrações equivalentes a CIM e 0,5CIM, durante 0, 0.5, 1, 2, 4 h. Foi adicionado PI (1,49µM) a todos os tempos/concentrações de peptídeo. A um grupo de células não tratadas também foi adicionado PI e funcionaram como controle. Após incubação, as células foram colhidas por centrifugação e suspensas em PBS. A citometria de fluxo foi realizada através do um citômetro de fluxo FACS, Calibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA, EUA).

4.11 Análise de marcadores de necrose e apoptose

As células de *C. albicans* foram incubadas a 30° C com Ctn[15-34] e AMB, nas concentrações equivalentes aos respectivos valores de CIM e 0.5CIM, durante 0, 0.5, 1, 2, 4, 12 e 24 h. *C. albicans* foi corado com 7-actinomicina D (7-AAD) () e Anexina V-FITC utilizando o Kit de Detecção de Apoptose da Anexina V (BD Pharmingen™) para avaliar a integridade celular e a externalização da fosfatidilserina (PS). As células foram analisadas utilizando o citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA, EUA). Um total de 10.000 eventos vivos foram analisados para cada amostra. A análise dos dados foi realizada utilizando o software Cell Quest (Becton-Dickinson Immunocytometry System) e os ensaios foram realizados em triplicata.

5 RESULTADOS

5.1 Os peptídeos Crotalicidina (Ctn), Ctn[1-14] and Ctn[15-34]

Ctn e os fragmentos Ctn [1-14] e Ctn [15-34] foram obtidos por síntese em fase sólida, com elevada pureza (> 95% por HPLC) e com os pesos moleculares esperados determinados por LC-MS, conforme apresentado nas Figuras 7-10. Algumas propriedades físico-químicas, tais como suas estruturas secundárias, hidrofobicidades, e carga líquida (em pH neutro) também estão listados na Tabela 4, e são informações importantes para idéias posteriores sobre relações estrutura-atividade dos peptídeos.

Tabela 4. Características estruturais e propriedades fisicoquímicas da Crotalicidina (Ctn) e fragmentos amino e carboxil- terminal (Cavalcante et al., 2016)

Peptide ^a	Size	Experimental MW ^b	Secondary structure ^c	Hydrophobicity H ^d	Hidrophobic moment μ_H^d	Net Charge ^e
Ctn	34-aa	4151.41	α -helical	0.263	0.440	+16
Ctn[1-14]	14-aa	1797.30	α -helical	-0.012	0.763	+9
Ctn[15-34]	20-aa	2371.10	unstructured	0.455	0.311	+8

^a C-terminal amidated peptides.

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

^c PDB Data Bank accession code 2MWT; Ctn is α -helical at the N-terminus and unstructured at the C-terminus.

^d Calculated with the “Heliquest” software (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>).

^e At neutral pH, calculated with the “Peptide property calculator” software (<http://pepcalc.com>).

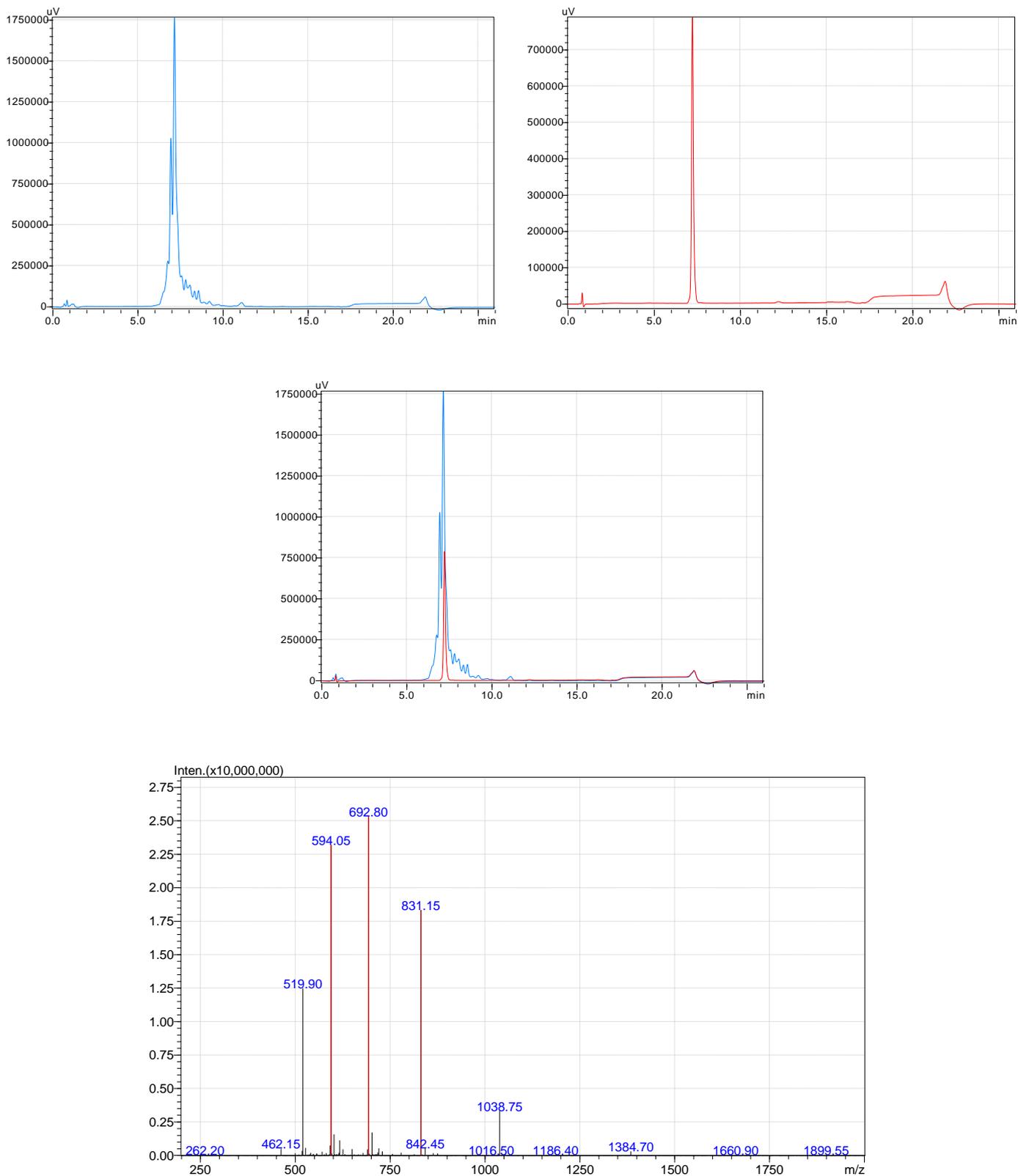


Figura 7. Cromatogramas de análise da síntese e purificação da Crotalicidina (Ctn). (A) Ctn após desacoplamento da resina, ainda não purificado. (B) Ctn após HPLC preparativa. (C) Comparação entre o cromatogramas antes e após a purificação. (D) Espectrometria de massas do Ctn puro (4151.41Da).

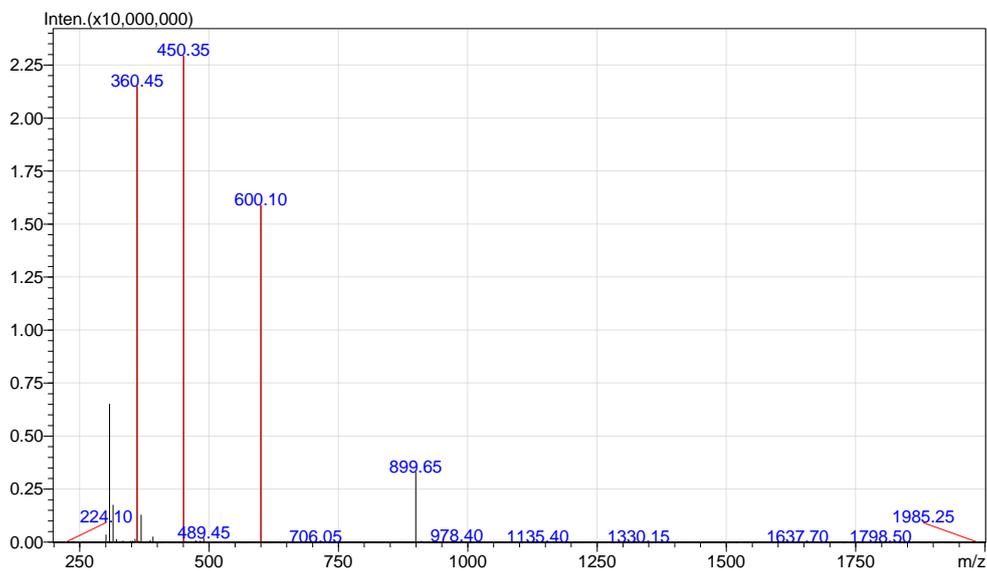
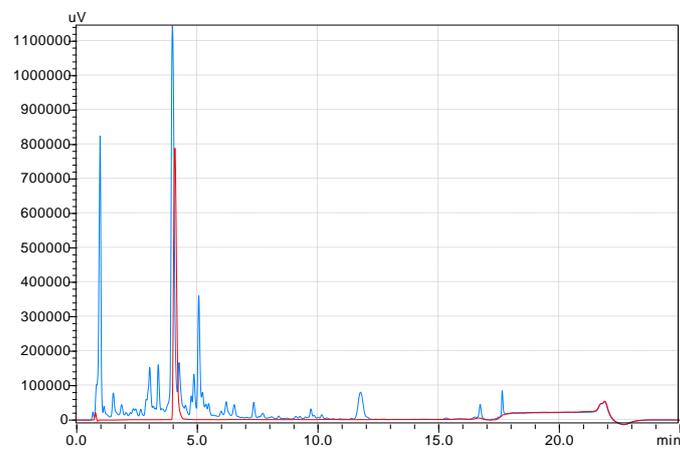
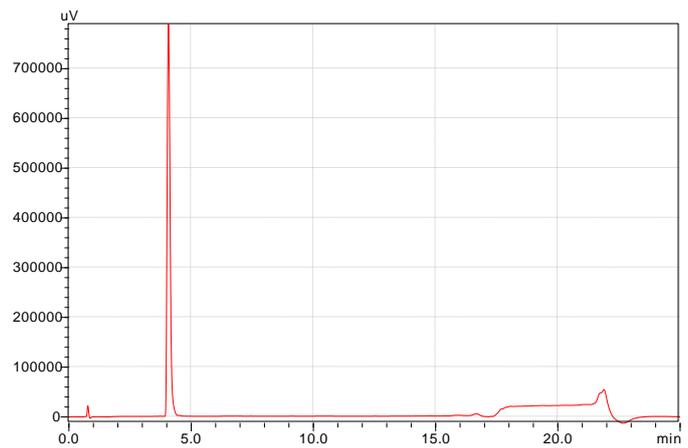
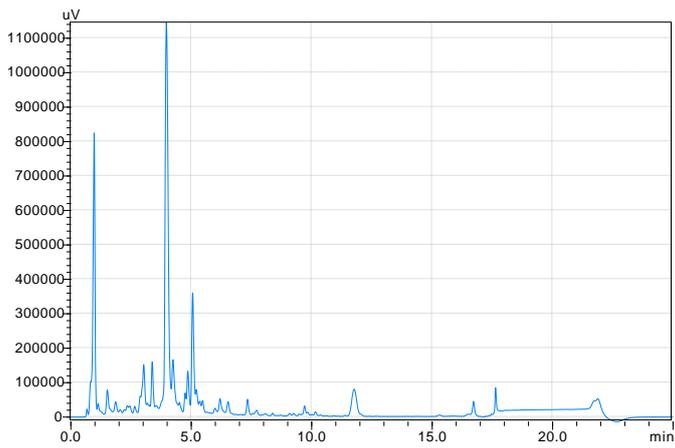


Figura 8. Cromatogramas de análise da síntese e purificação do fragmento Ctn[1-14]. (A) Ctn[1-14] após desacoplamento da resina, ainda não purificado. (B) Ctn[1-14] após HPLC preparativa. (C) Comparação entre o cromatogramas antes e após a purificação. (D) Espectrometria de massas do Ctn[1-14] puro (1797.3 Da).

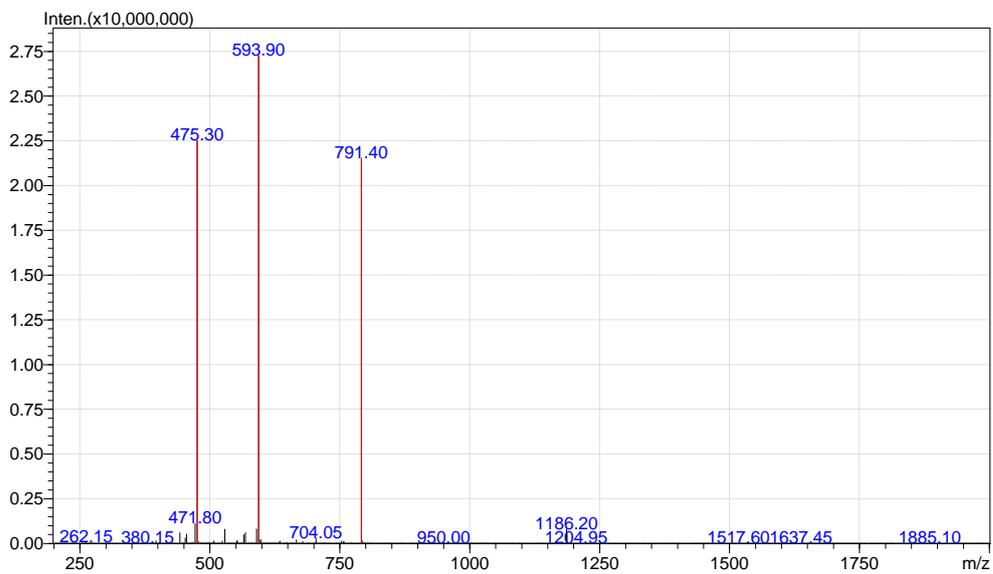
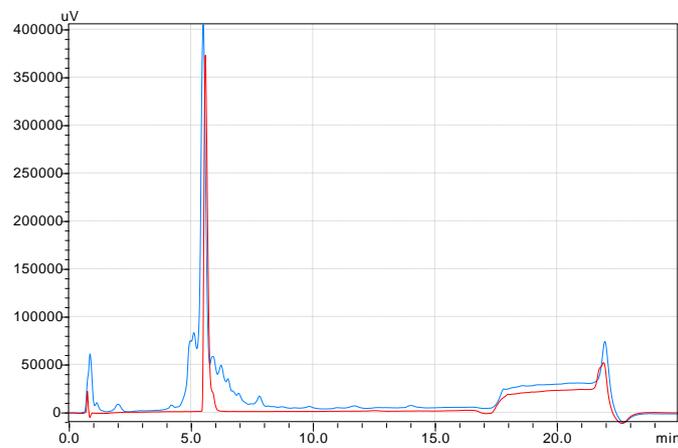
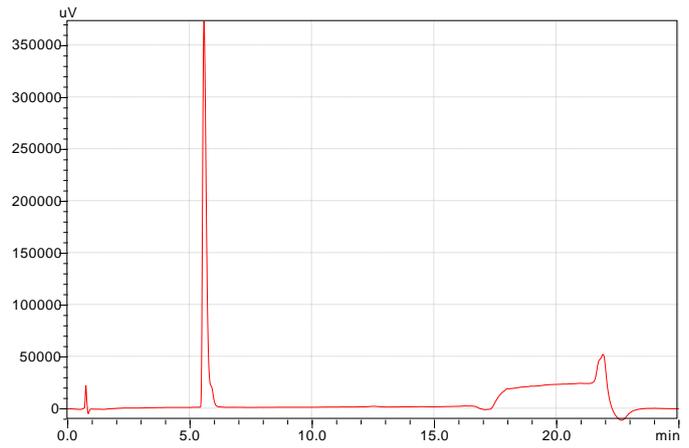
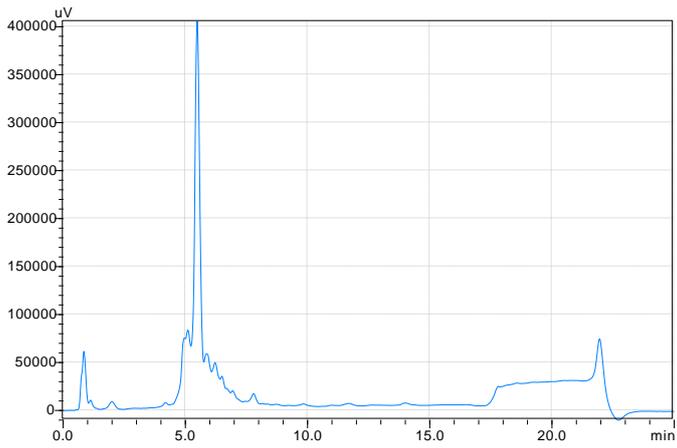


Figura 9. Cromatogramas de análise da síntese e purificação do fragmento Ctn[15-34]. (A) Ctn[15-34] após desacoplamento da resina, ainda não purificado. (B) Ctn[15-34] após HPLC preparativa. (C) Comparação entre o cromatogramas antes e após a purificação. (D) Espectrometria de massas do Ctn[15-34] puro (2371.1Da).

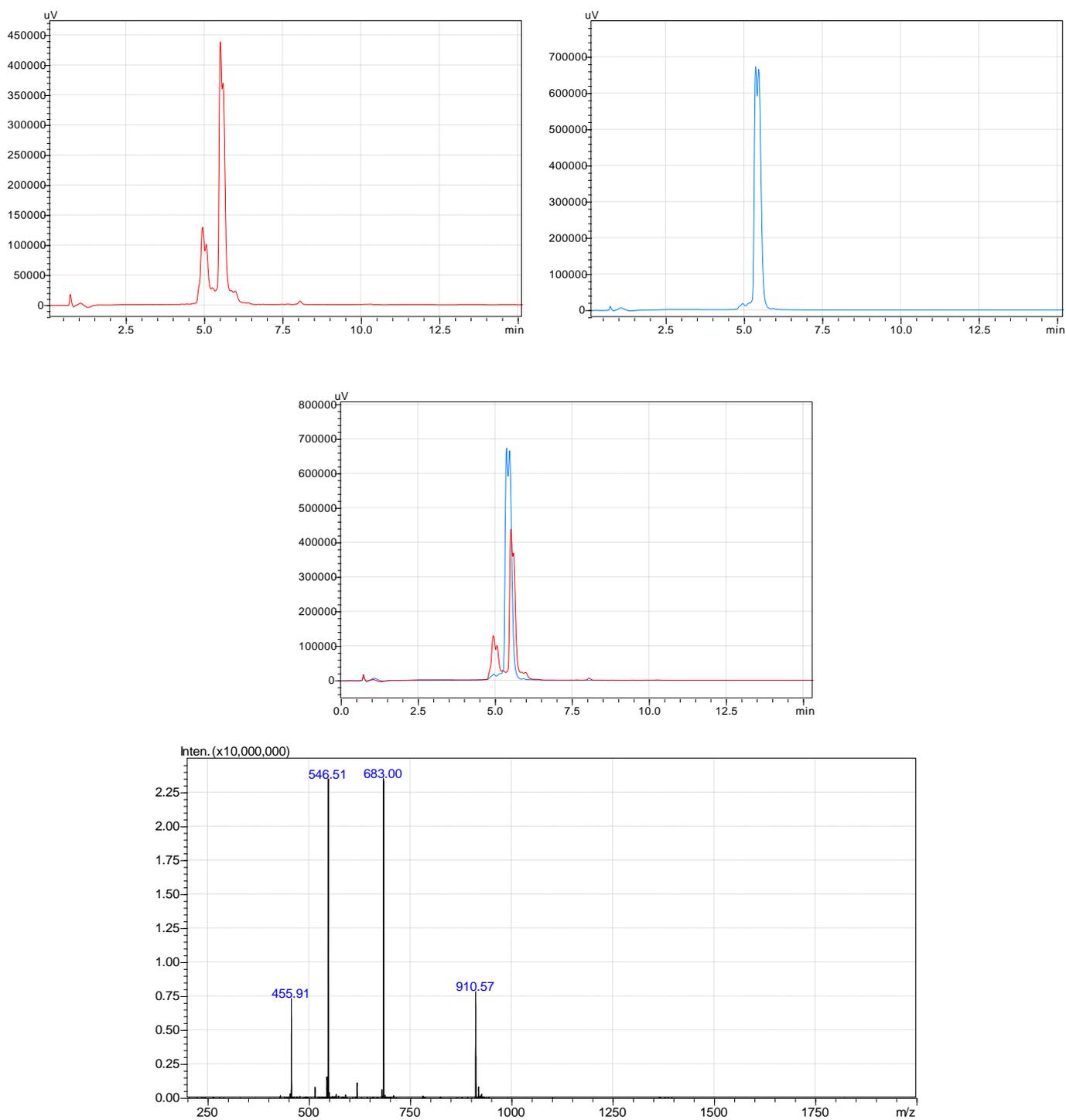


Figura 10. Cromatogramas de análise da síntese e purificação do fragmento FITC-Ctn[15-34]. (A) FITC-Ctn[15-34] após desacoplamento da resina, ainda não purificado. (B) FITC-Ctn[15-34] após HPLC preparativa. (C) Comparação entre o cromatogramas antes e após a purificação. (D) Espectrometria de massas do FITC-Ctn[15-34] puro (2729.41Da).

5.2 Atividade antifúngica

A atividade antifúngica *in vitro* das crotalicidinas, Ctn, Ctn [1-14] e Ctn [15-34], frente a cepas clínicas e padrão de leveduras e dermatófitos como valores de CIM estão descritos na Tabela 5. Todas as cepas testadas foram sensíveis aos controles, e a AMB apresentou valores de CIM entre 0,5 e 2 μM para leveduras e cetoconazol de 0,25 a 0,5 μM para dermatófitos.

O Ctn mostrou atividades diferentes para os vários tipos de fungos. Por um lado, foi o único peptídeo com valores de CIM significativos para as cepas de dermatófitos, com valores micromolares baixos (1,25 μM contra *M. canis* e 5 μM contra ambas as cepas de *T. rubrum*). Por outro lado, foram necessárias concentrações bem mais elevadas (de 10 até mais de 40 μM) para inibir o crescimento de leveduras. Por outro lado, os fragmentos Ctn [1-14] e Ctn [15-34] diferiram substancialmente do Ctn no perfil de atividade antifúngica. De modo que, embora ambos os fragmentos fossem basicamente inativos contra dermatófitos, em relação às leveduras tiveram menores valores de CIM do que o Ctn. Em particular, Ctn [15-34], com CIMs variando na maior parte de 5 a 10 μM , foi o peptídeo com maior atividade contra leveduras, com valores de CIM apenas ligeiramente superiores (2,5 vezes) ao controle de AMB contra cepas clínicas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

Tabela 5. CIMs do Ctn e fragmentos Ctn[1-14] e Ctn[15-34] contra cepas padrão e isolados clínicos de leveduras e dermatófitos

<i>Cepas fúngicas</i>	<i>CIM (μM)</i>		
	Ctn[1-14]	Ctn[15-34]	Ctn
Leveduras			
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	(>40)	(40)	(>40)
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	(40)	(5)	(40)
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	(40)	(20)	(40)
<i>Candida tropicalis</i> LABMIC 0109	(20)	(10)	(40)
<i>Candida albicans</i> LABMIC 0107	(20)	(10)	(40)
<i>Candida albicans</i> LABMIC 0108	(40)	(10)	(40)
<i>Candida parapsilosis</i> LABMIC 0113	(20)	(5)	(2,5)
<i>Candida tropicalis</i> LABMIC 0112	(10)	(5)	(10)
<i>Candida albicans</i> LABMIC 0101	(10)	(10)	(20)
<i>Candida albicans</i> LABMIC 0102	(10)	(10)	(40)
<i>Candida albicans</i> LABMIC 0103	(10)	(10)	(40)
<i>Cryptococcus laurentii</i> LABMIC 0404	(20)	(5)	(20)
Dermatófitos			
<i>Microsporum canis</i> LABMIC 0401	(10)	(>40)	(1.25)
<i>Trichophyton rubrum</i> LABMIC 0203	(>40)	(>40)	(5)
<i>Trichophyton rubrum</i> LABMIC 0204	(>40)	(>40)	(5)

5.2.1 Avaliação do percentual de viabilidade celular de leveduras tratadas com os peptídeos e AMB

A viabilidade celular de leveduras foi determinada por um ensaio metabólico que utiliza o ATP para detectar a emissão de luz com o uso da enzima luciferase e do seu substrato luciferina. O sinal luminescente registado é proporcional à quantidade de ATP presente, que por sua vez, é diretamente proporcional ao número de células vivas em cultura. Os resultados estão apresentados na Figura 10. Após 48 h de tratamento, todas as estirpes de levedura tratadas com qualquer um dos peptídeos ou com a AMB em concentrações abaixo dos respectivos valores de CIM (concentrações sub-inibitórias) mantiveram, o percentual de viabilidade próximo ao de células não tratadas, com exceção da *C. krusei* tratada com AMB. Uma vez que as CIMs de ambos os produtos, peptídeos ou AMB, foram atingidas para cada cepa, os percentuais de viabilidades das leveduras caíram bruscamente para $\leq 1\%$.

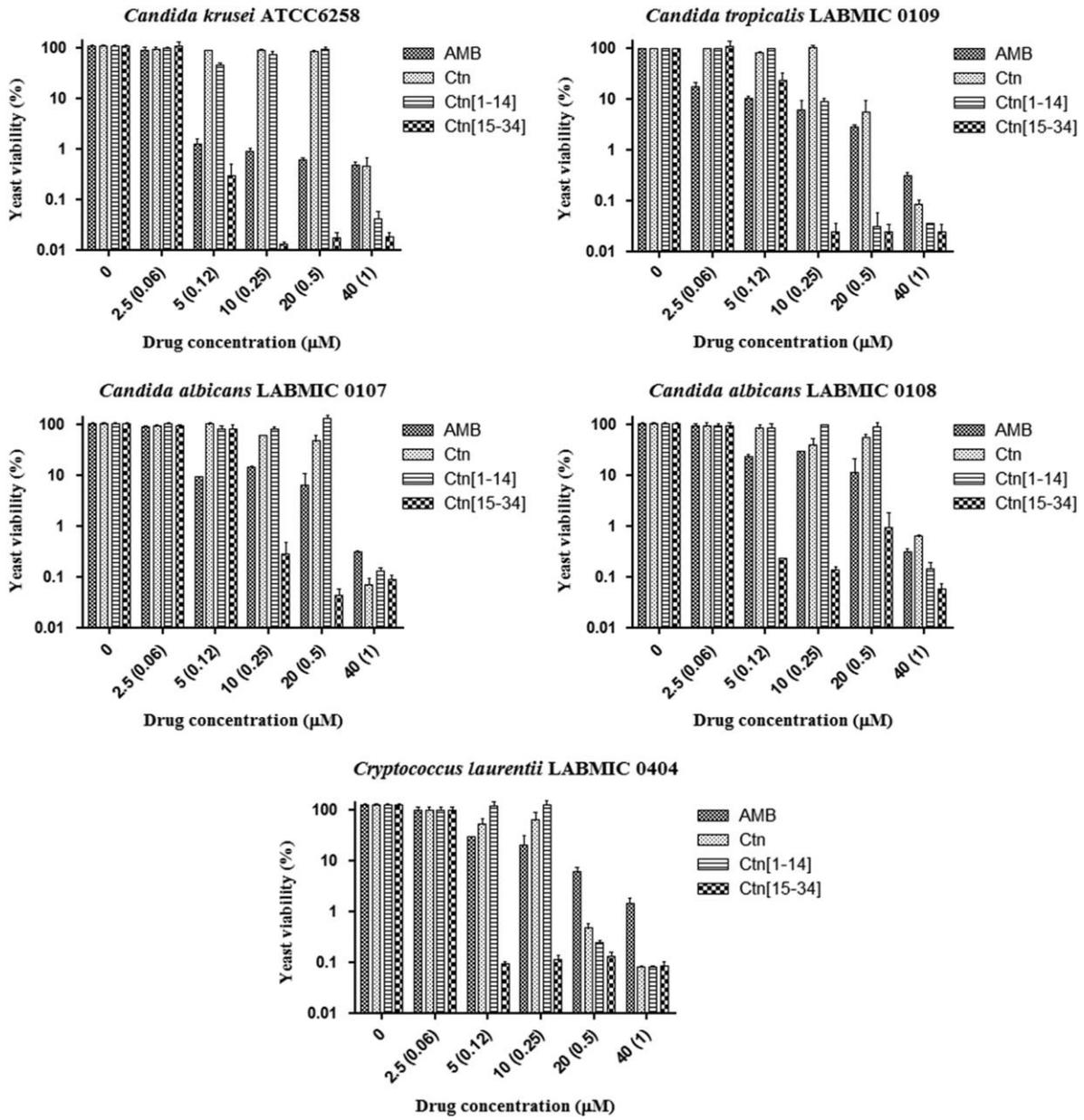


Figura 10. Viabilidade relativa de cepas de *Candida* sp e *Cryptococcus Laurentii* após tratamento com peptídeos e anfotericina B (AMB) a concentrações crescentes

5.3 Comparação entre os efeitos citotóxicos do Ctn e fragmentos Ctn[1-14] e Ctn[15-34] com a AMB

Para avaliar possíveis efeitos citotóxicos do Ctn, Ctn [1-14] e Ctn [15-34] em células eucarióticas saudáveis e estabelecer um comparativo com a citotoxicidade da AMB foram realizados dois ensaios distintos. Primeiramente, avaliação da potencial nefrotoxicidade *in vitro* medindo a viabilidade das células renais humanas HK-2 após tratamento durante 24 h com os peptídeos e AMB. Em seguida, foi avaliada a atividade hemolítica dos peptídeos e da AMB em RBCs humanos.

5.3.1 Efeitos nefrotóxicos in vitro

Conforme ilustrado na Figura 11, a nefrotoxicidade conhecida de anfotericina B foi evidente na medida em que concentrações menores de 12,5 μM do fármaco polieno (~ um log acima da maioria das CIMs contra leveduras testadas) matou 50% de células HK-2. Por sua vez, Ctn e os fragmentos Ctn[1-14] e Ctn[15-34] exibiram atividades nefrotóxicas diferentes entre si e também diferentes dos resultados obtidos com a AMB. Ctn, o peptídeo mais tóxico, apresentou maior citotoxicidade do que a AMB (IC₅₀ ~ 3,12 μM). Em contraste, Ctn [1-14] e Ctn [15-34] foram menos tóxicos para as células renais do que o Ctn ou AMB, com valores de IC₅₀ a 400 e 50 μM , respectivamente.

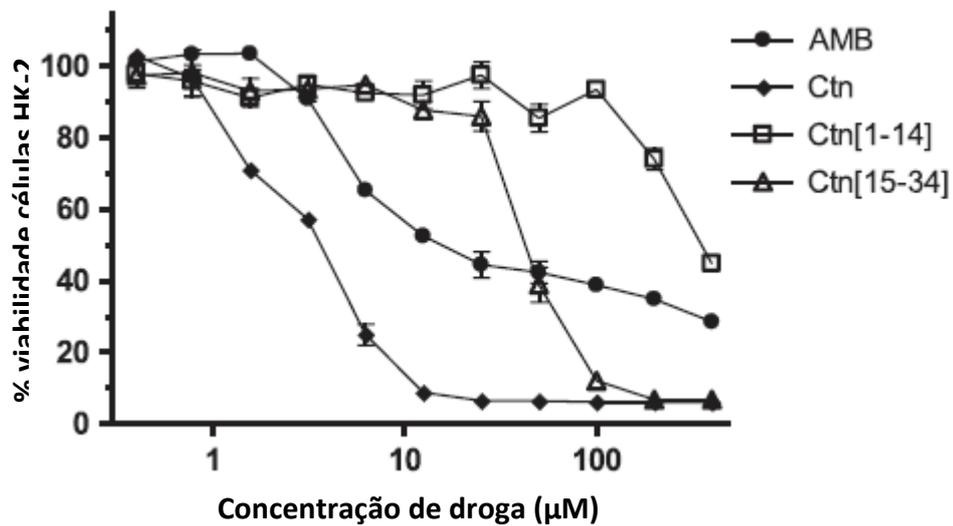


Figura 11. Viabilidade relativa de células renais humanas saudáveis (HK-2) após 24 h de tratamento com as Crotalicidinas (Ctn), e fragmentos Ctn[1–14] e Ctn[15–34], e AMB.

5.3.2 Atividade hemolítica em RBCs humanos

Para complementar os ensaios de avaliação da citotoxicidade dos peptídeos, os perfis de hemólise dos peptídeos e da AMB foram comparados utilizando os valores de absorvância da hemoglobina libertada como leitura. Como mostrado na Figura 12, a 1,5 μM,

aproximadamente a mesma CIM contra a maioria das amostras testadas, a AMB já apresentou percentuais significativos de hemólise (20%). Com 12,5 μ M observou-se hemólise em grande escala (70%). Novamente, Ctn e seus fragmentos Ctn[1-14] e Ctn[15-34] apresentaram perfis diferenciados. Assim, Ctn a 1,5 μ M apresentou um percentual de hemólise semelhante a AMB (20% de hemólise), mas não se observou mais aumento em concentrações até duas ordens de magnitude mais elevadas. Ctn[1-14] foi hemolítico apenas acima de 50 μ M, enquanto que Ctn[15-34], mesmo a 100 μ M, foi inerte aos RBCs.

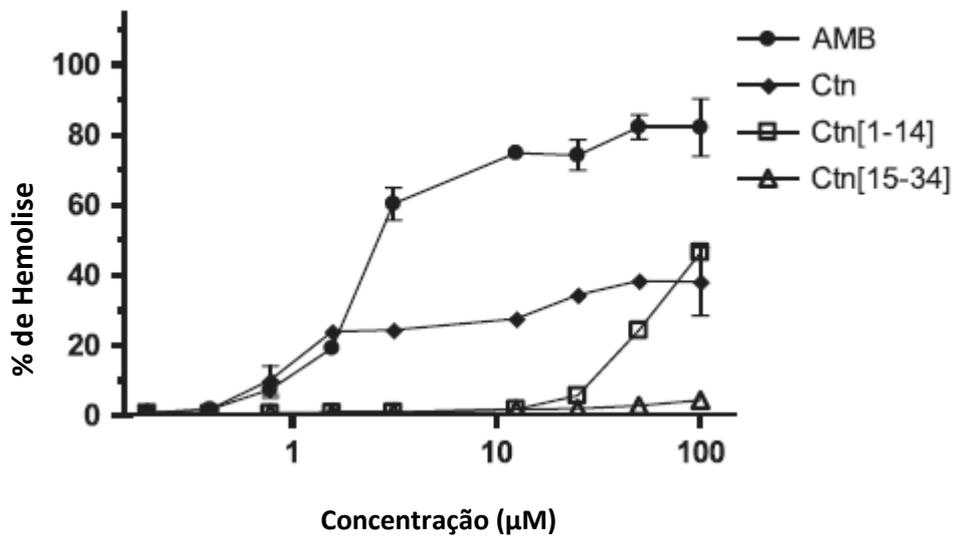


Figure 12. Percentual de hemólise após 1 h de tratamento com Crotalicidina (Ctn), fragmentos Ctn[1-14] e Ctn[15-34], e AMB.

5.4 Ctn, Ctn[1-14] e Ctn[15-34] apresentaram efeito sinérgico com a AMB contra cepas clínicas de *C. albicans*

Os resultados destas terapias combinadas contra as cepas de *C. albicans* isoladas clinicamente foram obtidos pela técnica do checkerboard (Tabela 5). A Tabela 5 apresenta a confirmação das CIMs dos fármacos utilizados isoladamente com as cepas testadas (Tabela 4). Quando associada a AMB, observou-se uma diminuição geral nas CIMs dos fármacos em todas as combinações testadas, com pelo menos quatro vezes e 64 vezes as reduções nas CIM de AMB e peptídeos, respectivamente. Os índices FIC calculados foram de cerca de 0,25 e 0,26, bem abaixo dos limiares $\leq 0,50$ para uma associação ser considerada como sinérgica. Esta potencialização da atividade por associação com AMB foi particularmente importante para o peptídeo mais ativo contra *Candida*, o Ctn [15-34], mas também, numa extensão ligeiramente menor, para Ctn [1-14] e Ctn.

Tabela 6. CIMs das Crotalícinas e AMB sozinhos ou combinados contra cepas de isolados clínicos de *C. albicans*.

Crotalícinas/ AMB	<i>C. albicans</i> LABMIC0108			<i>C. albicans</i> LABMIC0107			<i>C. albicans</i> ATCC90028		
	CIM (μ M) sozinho	CIM (μ M) combinado	ICIF ^a	CIM (μ M) sozinho	CIM (μ M) combinado	ICIF ^a	CIM (μ M) sozinho	CIM (μ M) combinado	ICIF ^a
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		2	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		2	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		2	0.5	

^a ICIF = Índice da Concentração Inibitória fracional

S = Sinergismo

5.4.1 Demonstração por citometria de fluxo do efeito sinérgico da associação do Ctn[15-34] com a AMB frente à C. albicans

Esta interação entre Ctn[15-34] e a AMB foi por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídio (PI) como um marcador de viabilidade das células da cepa de *C. albicans* LABMIC0107. As células começam a perder a sua viabilidade à medida que aumenta a intensidade da fluorescência do PI. Na Figura 13A, Ctn [15-34] sozinho a 0,31 μM não foi suficiente para aumentar a intensidade da fluorescência do PI nas células de *C. albicans* (linha verde) e os resultados foram semelhantes aos das células não tratadas (linha preta). Quando se utilizou AMB a 0,5 μM (Figura 13B), 25% (\pm SEM) de 10000 células vivas restantes (linha vermelha) apresentaram um sinal fluorescente aumentado relacionado com a coloração do PI em comparação com células não tratadas. Quando Ctn[15-34] e AMB foram associadas (Figura 13C), pode ser observado um aumento de 10% no sinal fluorescente ($35 \pm$ SEM%) nestas leveduras coradas com PI, em comparação com células tratadas apenas com o fármaco polieno.

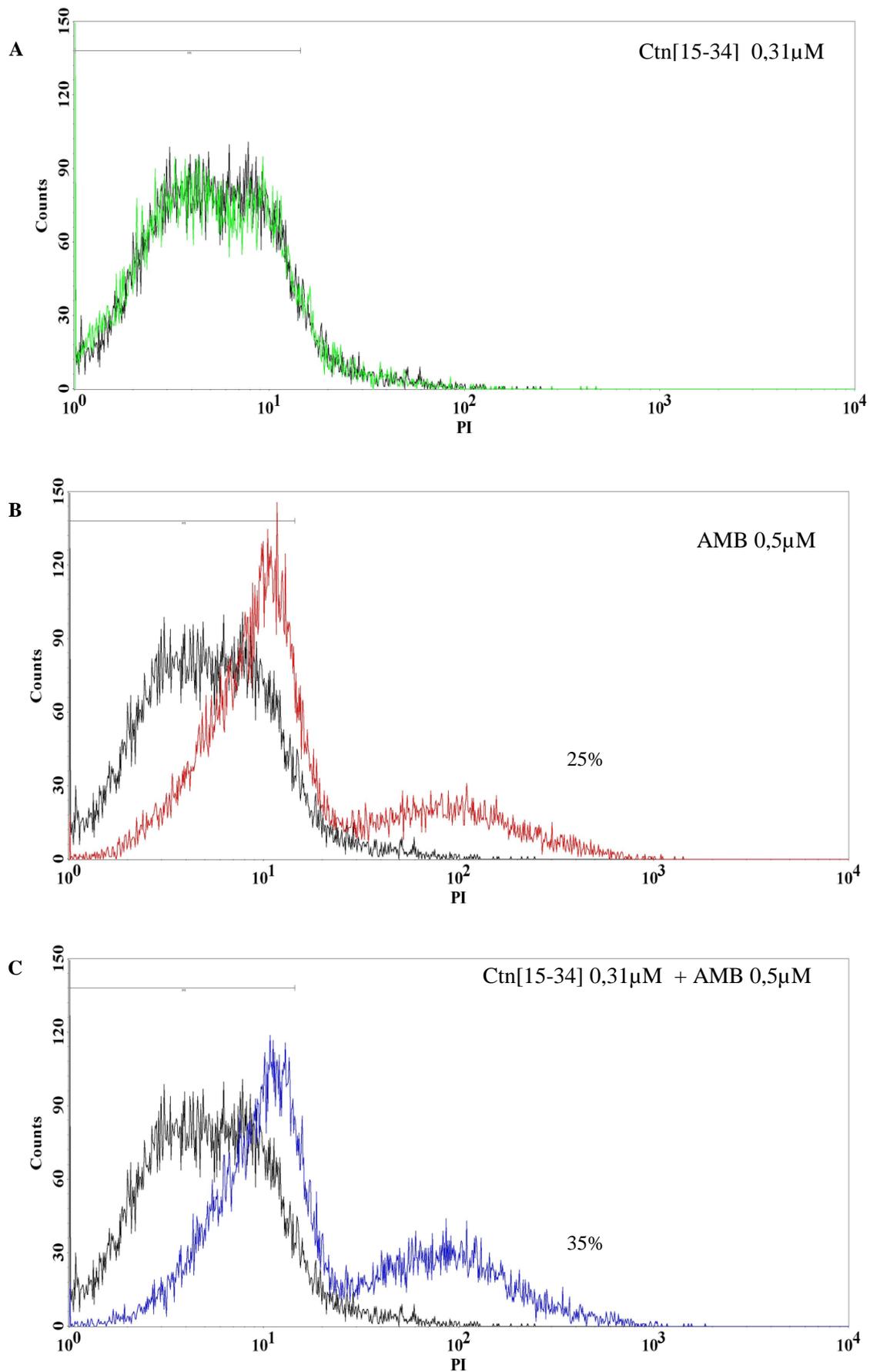


Figura 13. Detecção do efeito sinérgico do tratamento de *C.albicans* LABMIC0107 com Ctn[15-34] e AMB, após 24h.

5.5 Cinética de morte de *C. albicans* tratada com Ctn[15-34]

Com base nas CIM do Ctn[15-34] e AMB encontradas, os ensaios cinética de morte foram realizados para avaliar o perfil de morte de *C.albicans* (LABMIC0107) quando tratadas com estes fármacos ao longo do tempo. Os resultados apresentados na Figura 14 mostraram que ambos os fármacos inibiram o crescimento de *C.albicans* nas placas após 8 horas de tratamento com suas respectivas CIMs. No entanto, enquanto Ctn [15-34] reduziu o número de UFCs rapidamente entre 0 e 4 h e lentamente entre 4 e 8 h de tratamento, a AMB apresentou uma cinética de morte com perfil oposto (redução lenta das UFCs durante as primeiras 4 horas e uma rápida diminuição entre 4 e 8 h).

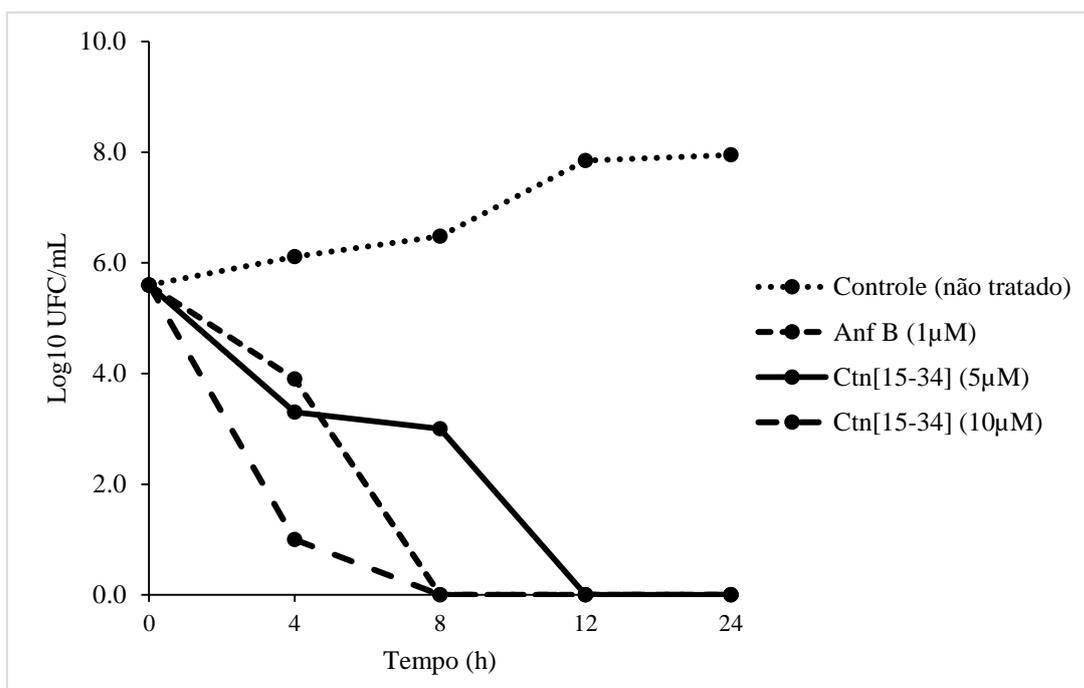


Figura 14. A cinética do tempo de morte de *C. albicans* LABMIC0107 pelo Ctn[15-34] e AMB nas respectivas CIMs. O ensaio foi realizado em meio RPMI-1640 com MOPS a 2% e incubado a 30° C durante 24 h.

5.6 Avaliação da atividade de fosfolipase do Ctn[15-34]

Após a incubação do peptídeo com o substrato 4N3OBA (fosfolípido), a atividade fosfolipásica gerada após com Ctn[15-34] a 5 e 10 μM foi medida por absorvância, em comprimento de onda de 425 nm. A maior atividade de fosfolipase foi observada com o substrato tratado com Ctn[15-34] a 10 μM , em todos os pontos de tempo, quando comparado com 4N3OBA tratado com 5 μM do peptídeo e não tratados. Os resultados dessa atividade enzimática do Ctn[15-34] estão demonstrados na Figura 15.

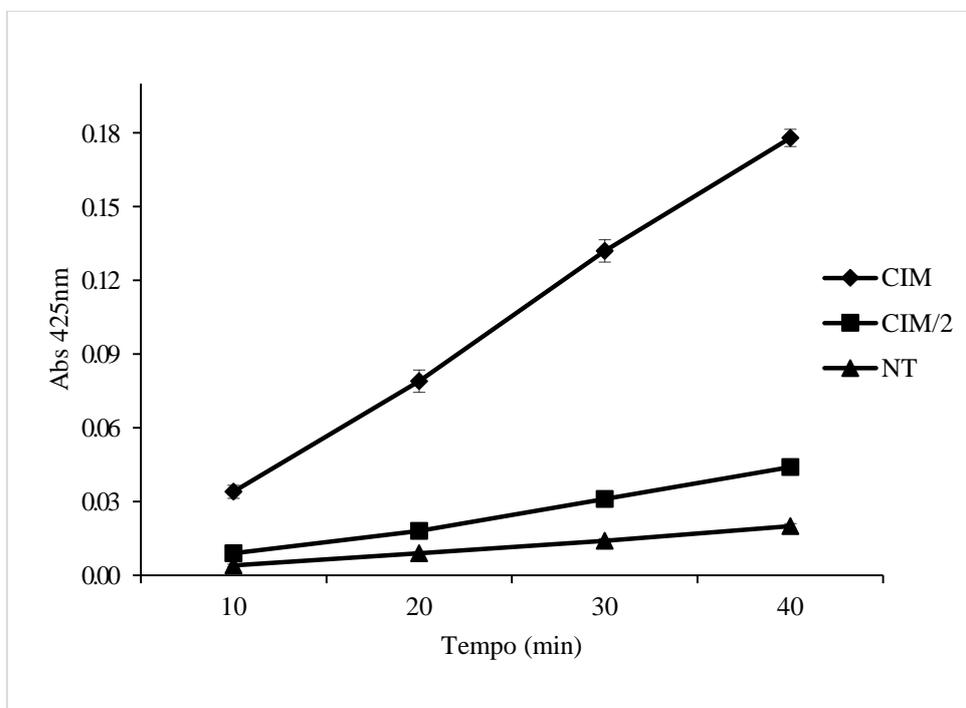


Figura 15. A atividade da fosfolipase (em unidades arbitrárias de absorvância, média \pm SEM com $n = 3$) em diferentes pontos de tempo após tratamento do fosfolípido com 0 (NT), 5 (MIC / 2) e 10 (MIC) μM de Ctn [15-34].

5.7 Capacidade do FITC-Ctn[15-34] de interagir com a membrana celular de *C. albicans*

Utilizando o FITC-Ctn[15-34] a 10 μ M, a Figura 16 mostra que, até aos primeiros 30 minutos de incubação, o peptídeo interagiu com células de *C. albicans* LABMIC0107 (fluorescência "FL1" verde) mas não causou dano à membrana devido à baixa coloração de PI (fluorescência "FL2" vermelha). Por conseguinte, a razão entre a fluorescência FL1 e FL2 foi comparativamente mais elevada. No entanto, após 1 hora de incubação, a interação peptídeo-*C.albicans* provocou um dano à membrana celular de levedura mais perceptível devido ao aumento do sinal fluorescente PI e, assim, a razão entre a fluorescência de FL1 e FL2 diminuiu.

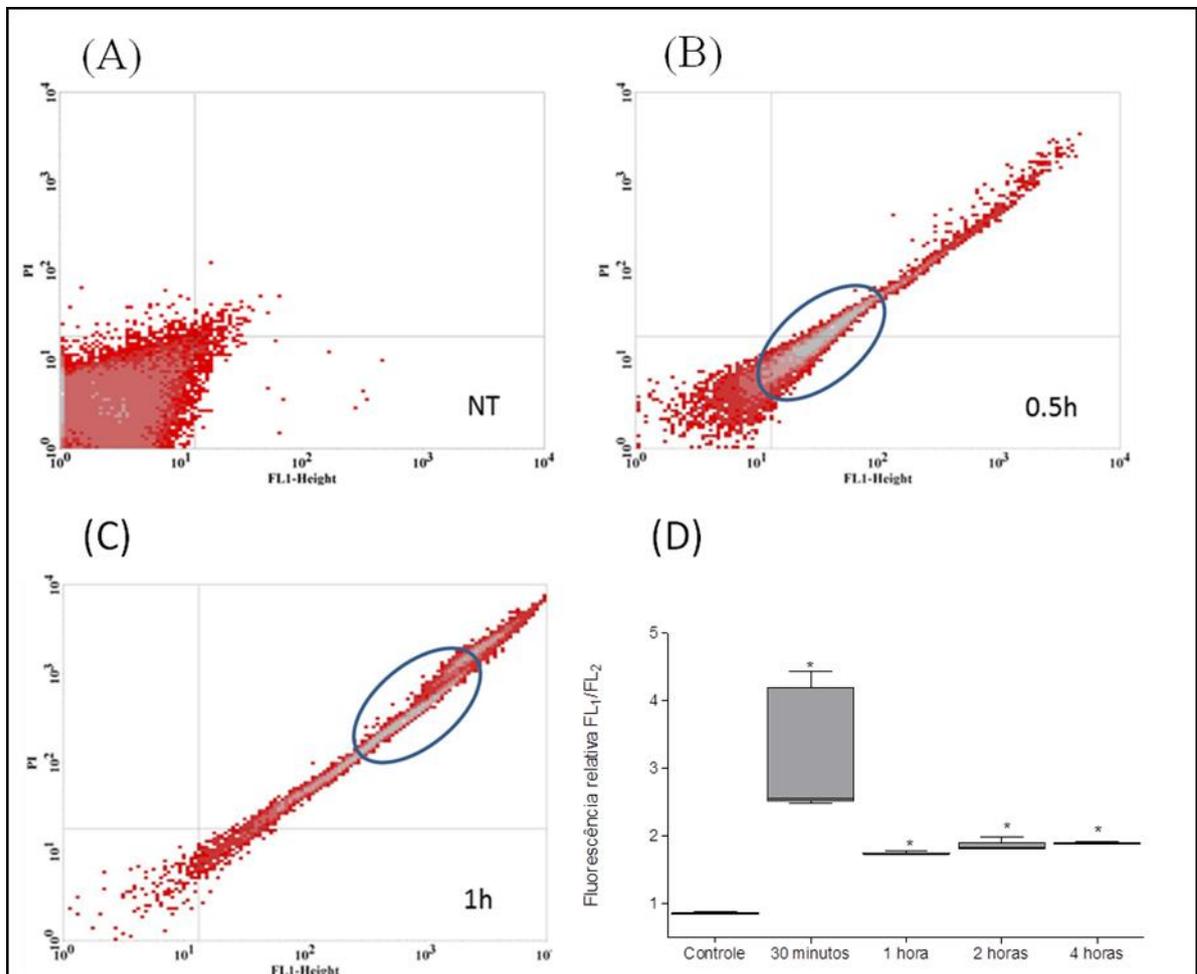


Figura 16. A relação entre as fluorescências (FL₁/FL₂)FITC-Ctn[15-34]/PI (média \pm SEM, n =3) após tratamento da *C. albicans* LABMIC0107 com 10 μ M do peptídeo durante 0 (NT), 0,5, 1, 2 e 4 horas.

5.8 Análise dos marcadores de necrose e apoptose

Finalmente, verificamos a principal via de morte celular da *C. albicans* LABMIC0107 induzida por Ctn[15-34] e comparada com a via de morte desencadeada pela AMB após tratamento em concentrações inibitórias e subinibitórias por 12 e 24 h (Figura 17). Conforme ilustrado na Figura 17A, a AMB promoveu principalmente necrose, que pode ser observada especialmente após tratamento a 2 μ M durante 24h (14,8% das células vivas restantes - quadrante superior esquerdo), mas também pode matar algumas destas células *C.albicans* 5,4% - quadrante inferior direito) por apoptose. Enquanto isso, na Figura 17B, Ctn[15-34] aparentemente mostrou que havia mais células passando por apoptose do que necrose em ambas as concentrações tratadas durante 12 horas (quadrantes inferiores direitos nos painéis superiores). No entanto, por 24 horas de incubação, a percentagem de células passando por apoptose quase desapareceu enquanto houve um grande aumento de células de *C.albicans* em necrose após tratamento com Ctn[15-34], notavelmente a 10 μ M (17,87% - quadrante superior esquerdo). Na Figura 18 pode-se observar o aumento progressivo no percentual de células de *C. albicans* marcadas com 7AAD sugerindo a morte por necrose.

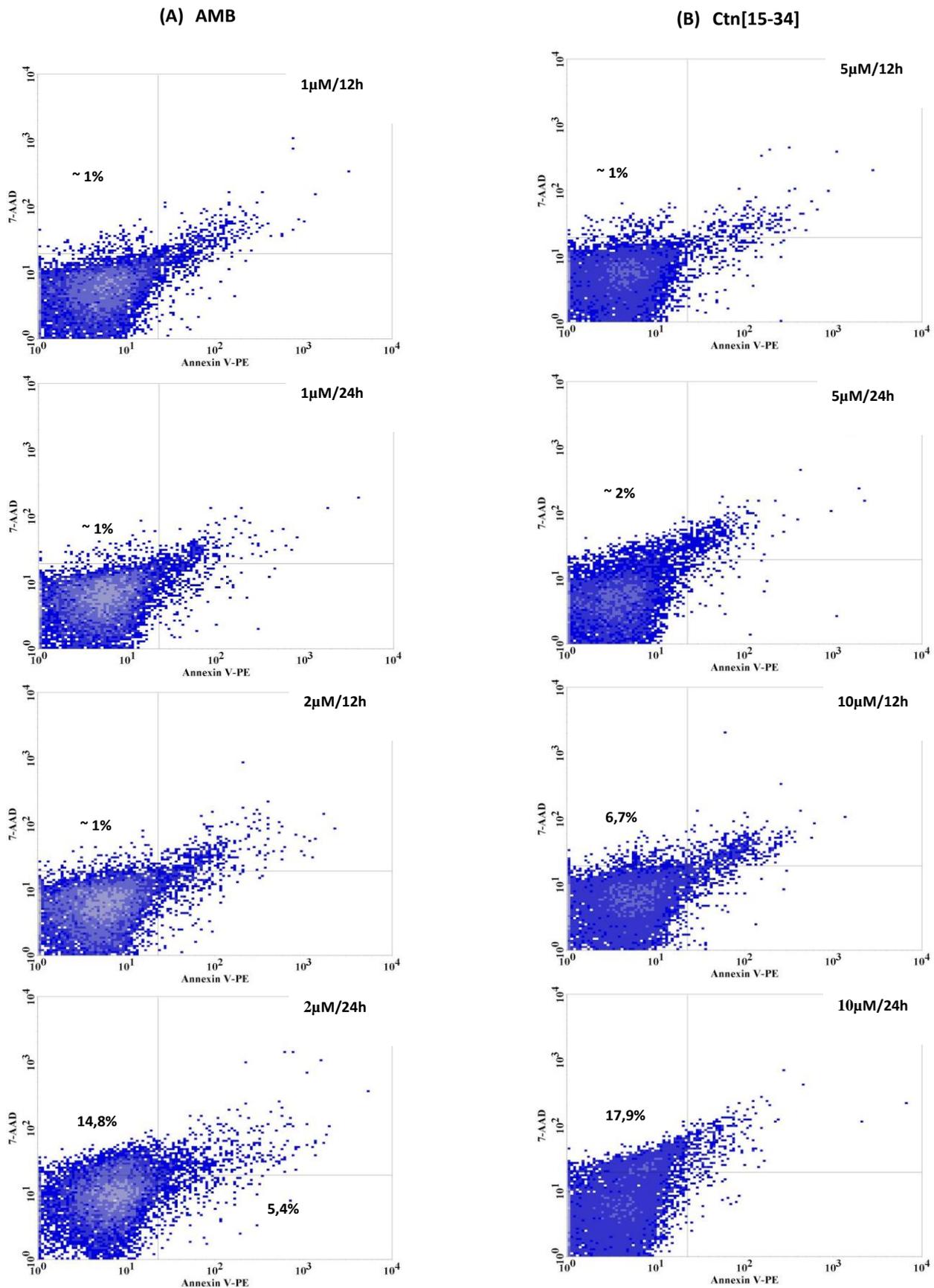


Figura 17. Detecção da via de morte celular após tratamento de células de *C.albicans* com (A) AMB ou (B) Ctn[15-34] em CIMs e 0.5CIMs durante 12 e 24 h. Os marcadores utilizados para necrose e apoptose foram 7-AAD e Anexina V PE, respectivamente (Os gráficos de dispersão de citometria de fluxo e os valores percentuais médios foram representativos de três experiências independentes, cada uma com 10.000 eventos ao vivo).

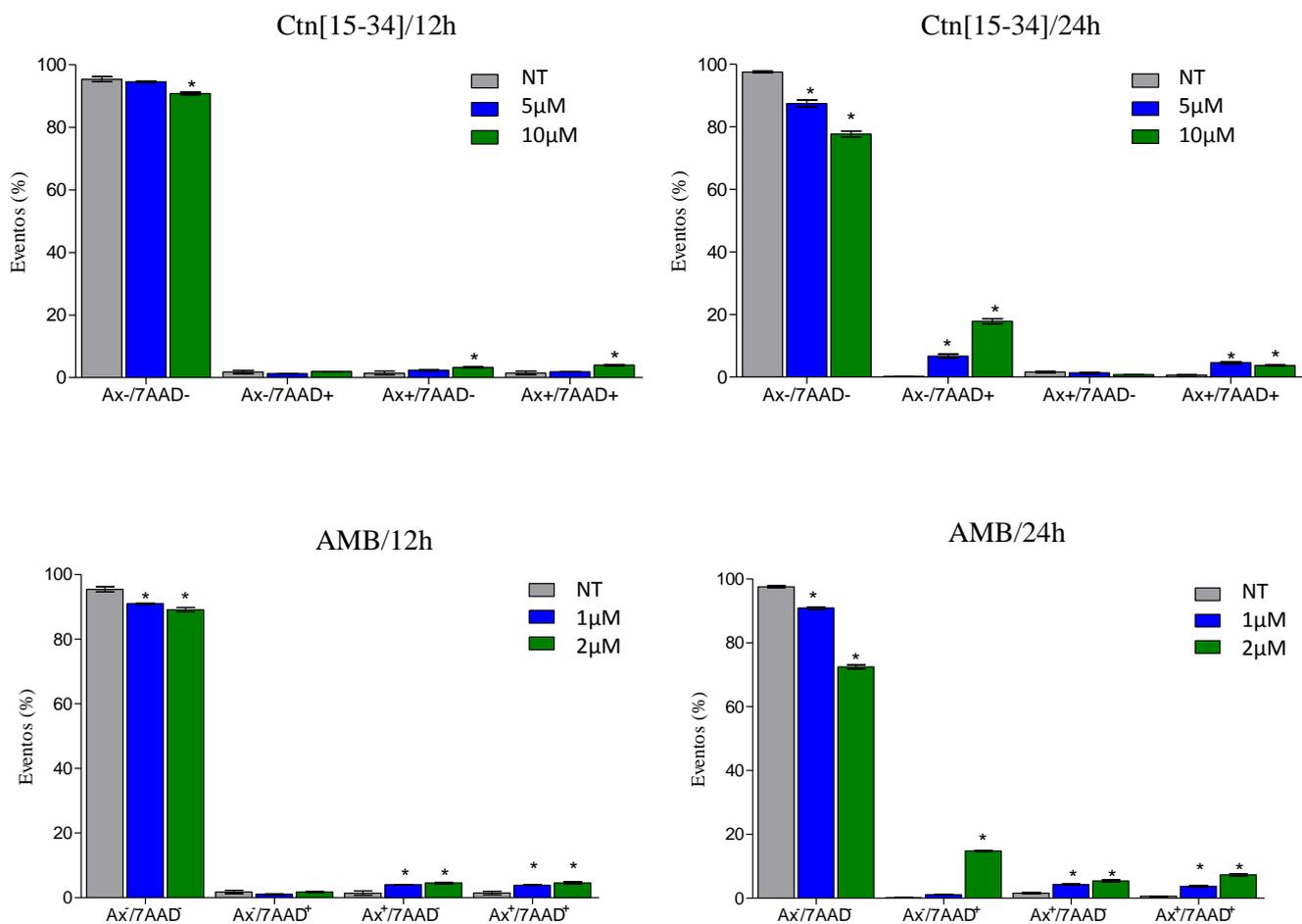


Figura18. Avaliação do potencial necrótico do Ctn[15-34] e da AMB em *C. albicans* LABMIC0107 in vitro. Aumento progressivo no percentual de células marcadas com 7AAD sugerindo a morte das células por necrose.

6 DISCUSSÃO

Conforme foi verificado anteriormente para as bactérias (FALCAO *et al.*, 2014; FALCAO *et al.*, 2015), e demonstrado aqui na Tabela 5, parece que o Ctn parental (MW = 4151), altamente carregado (+16) pode interagir melhor com a parede celular e as membranas dos dermatófitos do que com as das leveduras. Em contraste, o Ctn [1-14] altamente α -helicoidal, mais curto (MW = 1797) e com cerca de metade da carga líquida (+9) do Ctn, apresentou-se praticamente inerte contra as cepas de dermatófitos testadas, e demonstrou melhores atividades contra leveduras. Por outro lado, o Ctn [15-34], de tamanho intermediário (MW = 2371), e sem estrutura definida, foi o peptídeo que mais eficientemente interagiu com as membranas de levedura, a parede celular e / ou cápsula glicoproteica, no caso de *C. laurentii*.

Vale ressaltar que apesar de uma carga líquida (+8) semelhante a carga do fragmento Ctn [1-14], o fragmento Ctn [15-34] tem a maior hidrofobicidade ($H = 0,455$) e o menor momento hidróbico ($\mu H = 0,311$) entre todos os três peptídeos testados. Outros fatores, além de estruturas secundárias (α -hélice ou enrolamento aleatório) e/ou propriedades físico-químicas que podem explicar as diferentes atividades contra diferentes cepas, podem ser as diversas morfologias dos fungos testadas, conforme relatado para outros fármacos (KOHLENER *et al.*, 2006).

As condições de crescimento utilizadas para o cultivo de cepas fúngicas, dão origem a diversas formas dermatófitas, tais como macroconídios, microconídios e hifas, e formas de leveduriformes, compreendendo blastoconídios e pseudo-hifas. Embora a maioria das infecções por fungos filamentosos seja caracterizada pela presença de elementos tipo hifa no tecido, os arthroconídios constituem a morfologia primária de transmissão das dermatofitoses em humanos e animais (EGGIMANN *et al.*, 2003). Vários estudos sugerem que a diferença na susceptibilidade entre microconídios e arthroconídios dependendo do fármaco e da cepa e pode ser uma das causas da falha terapêutica (SILVA *et al.*, 2011). A *Candida* apresenta alternância morfológica entre uma forma de levedura e uma forma de hifa, e os diversos fatores de virulência que promovem a patogenicidade de cepas de *C. albicans* também estão ligados à formação de hifas (YAPAR, 2014). Foram identificadas como atributos de virulência, proteínas de hifa tais como a proteína de parede de hifa 1 (Hwp1) e a sequência de tipo aglutinina 3 (Als3p), promovendo a ligação e invasão epitelial (GUPTA; COOPER; 2008), que também pode ser alvo de ação de peptídeos.

A ação das crotalicidinas sobre a cepa clínica de *Cryptococcus laurentii* é digno de nota, uma vez que a criptococose é uma fungemia grave, emergente e que acomete principalmente pacientes submetidos à quimioterapia (SLAVIN; SHARON; CHEN; 2013). Comumente, a criptococose é causada por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, embora existam relatos sobre a incidência cada vez maior de espécies de *Cryptococcus* não-*neoformans* como *C. laurentii* (HAIDER *et al.*, 2013). Essa levedura encapsulada basidiomicetosa, é encontrada nos excrementos e amostras cloacais de pombos, e a infecção fúngica pode ser adquirida por inalação levando a infecção pulmonar assintomática ou através do uso de dispositivos médicos invasivos contaminados. Além desses, outros fatores de risco incluem: exposição prévia de esteróides e imunossupressores, uso prévio de derivados azólicos, baixa contagem de CD4 e neutropenia (BANERJEE *et al.*, 2013). Diante da emergência recente de fungemias associadas a essa espécie de *Cryptococcus*, embora não seja o objeto principal do presente trabalho, novos estudos devem ser conduzidos a fim de caracterizar o perfil de atividade das crotalicidinas frente a essas cepas.

Uma vez que as micoses invasivas (ou sistêmicas) mais prevalentes são causadas por leveduras, especialmente por *Candida* spp, (SARDI *et al.*, 2013) focamos nossos estudos voltados para essas cepas clinicamente mais importantes.

A atividade antifúngica do Ctn, Ctn [1-14] e Ctn [15-34] foi ainda investigada contra cepas selecionadas de leveduras através da avaliação da viabilidade celular com aproximadamente os mesmos intervalos de concentração dos peptídeos utilizados para determinação das CIMs. A viabilidade celular de levedura foi determinada por um ensaio metabólico utilizando ATP para libertar luz com o uso da enzima luciferase e do seu substrato luciferina, em células vivas. Existe uma relação linear entre a viabilidade celular e luminescência medida. O sinal luminescente registado foi proporcional à quantidade de ATP presente, que por sua vez, era diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura, conforme apresentado na Figura 10. O ensaio de bioluminescência tem uma vasta gama de aplicações, como teste de citotoxicidade, avaliação do impacto de biofilmes, e screening de drogas (CROUCH *et al.*, 1993; BOZORG; GATES; SEM; 2015; PALOQUE *et al.*, 2013). Além disso, tem sido utilizado por vários autores para testes antibacterianos (ANDREU *et al.*, 2012) e antifúngicos, tanto com leveduras quanto com fungos filamentosos (FINGER *et al.*, 2012; GALIGER *et al.*, 2013), com a vantagem de fornecer resultados quantitativos.

Anfotericina B é um agente crucial no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas graves. Apesar de seu histórico comprovado, seus conhecidos efeitos colaterais e toxicidade exigirão algumas vezes a descontinuação da terapia apesar de uma infecção fúngica sistêmica potencialmente fatal (LABORIN; VARGAS, 2009). Valiosos candidatos a fármacos que podem igualar a eficácia da AMB sem os seus efeitos tóxicos deletérios. A descoberta de que Ctn, Ctn [1-14] e Ctn [15-34], até então não testados contra leveduras, como agentes antifúngicos eficazes, levou-nos a investigar sua citotoxicidade em relação às células eucarióticas. Para avaliar possíveis efeitos tóxicos de Ctn, Ctn [1-14] e Ctn [15-34] com células eucarióticas saudáveis e compará-las com AMB realizamos dois ensaios diferentes. Em primeiro lugar, a nefrotoxicidade potencial foi avaliada *in vitro* medindo a viabilidade das células renais humanas HK-2 e atividade hemolítica dos peptídeos.

Conforme ilustrado na Figura 11, a nefrotoxicidade conhecida de AMB (CHAI *et al.*, 2013) foi evidente na medida em que tão baixa quanto 12,5 μM do fármaco polieno (~ um log acima da maioria das MICs contra leveduras testadas) matou 50% de células HK-2. Por sua parte, Ctn e os fragmentos Ctn [1-14] e Ctn [15-34] exibiram atividades citotóxicas de células renais diferentes entre si e de AMB. Ctn, o péptido mais tóxico, apresentou maior citotoxicidade do que a AMB (IC₅₀ ~ 3,12 μM), em sintonia com sua baixa seletividade previamente observada entre patógenos e células eucarióticas saudáveis (FALCAO *et al.*, 2015). Em contraste, Ctn [1-14] e Ctn [15-34] foram menos tóxicos para as células renais do que o Ctn parental e a AMB, com valores de IC₅₀ a 400 e 50 μM , respectivamente.

Num ensaio de citotoxicidade complementar aos estudos com células de rim humano saudáveis, os perfis de hemólise dos péptidos e AMB foram comparados utilizando os valores de leitura de absorvância da hemoglobina libertada.

Como a Figura 12 mostra, a 1,5 μM , aproximadamente a MIC contra a maioria das amostras testadas, a AMB já causou hemólise substancial (20%). Em 12,5 μM , observou-se hemólise em grande escala (70%), em sintonia com outros relatos (SERRANO; LARABI, 2013). Novamente, Ctn e seus fragmentos Ctn [1-14] e Ctn [15-34] apresentaram perfis diferenciados. Assim, Ctn a 1,5 μM era comparável a AMB (20% de hemólise), mas não se observou mais aumento em concentrações até duas ordens de magnitude mais elevadas. Ctn [1-14] tornou-se hemolítico apenas acima de 50 μM enquanto que Ctn [15-34], mesmo a 100 μM , era inerte em RBCs. Assim, apesar das suas MICs ligeiramente superiores (entre 5 e 10 μM) contra cepas de levedura (Tabela 4), Ctn [15-34] tem uma melhor janela de seletividade

do que AMB. Ctn [15-34] também é mais seletivo contra leveduras do que outras catelicidinas como LL-37, cujas MICs relatadas contra algumas cepas de *C. albicans* (15-20 µM) 8,12 mostraram ser tóxicas para células eucarióticas saudáveis (BALS; WILSON, 2003; DURR et al., 2006).

Como a farmacoterapia de pacientes críticos, doentes com micoses invasivas, baseia-se principalmente na combinação de dois ou mais fármacos antifúngicos (ENOCH *et al.*, 2006, também investigamos os efeitos da combinação de cada um dos peptídeos, *in vitro*, com a AMB nos intervalos de concentração utilizado na determinação de MIC. Como a *C. albicans* é a levedura mais prevalente em micoses invasivas (TSAI *et al.*, 2014) elas foram utilizadas nesses ensaios, e os resultados destas terapias combinadas foram obtidos pela técnica do checkerboard (Tabela 6).

A Tabela 5 mostra e confirma as MICs inicialmente encontradas dos fármacos utilizados isoladamente contra essas cepas. Quando associada à AMB, observou-se uma diminuição geral nas CIMs de ambos os fármacos em todas as combinações, com pelo menos quatro vezes e 64 vezes as reduções nas CIM de AMB e peptídeos, respectivamente. Os índices FIC calculados foram de cerca de 0,25 e 0,26, bem abaixo dos limiares $\leq 0,50$ para uma associação ser considerada como sinérgica. Esta potencialização da atividade anti-levedura por associação com AMB foi particularmente importante para o peptídeos mais ativo, o Ctn [15-34], mas também, numa extensão ligeiramente menor, para Ctn [1-14] e Ctn. Já foi demonstrado que muitos peptídeos antimicrobianos naturais ou sintéticos atuam sinergicamente com antibióticos peptídicos ou não peptídicos (ZHAI *et al.*, 2010).

Em seguida, os resultados do checkerboard foram demonstrados por citometria de fluxo. Após 24 h de incubação, as células vivas restantes foram analisadas com PI como um marcador de viabilidade e os resultados (Figura 13) mostraram que o marcador corou mais células quando as leveduras *C. albicans* foram tratadas com Ctn [15-34] e AMB em conjunto do que com o fármaco polieno sozinho. Embora os métodos de citometria de fluxo para testes de susceptibilidade antimicrobiana e antifúngica ainda não tenham sido padronizados, eles têm sido usados há mais de 20 anos e seus resultados são equivalentes aos dados obtidos com os métodos CLSI (MITCHEL *et al.*, 2005; BALOUIRI *et al.*, 2016). Além disso, a citometria de fluxo pode fornecer resultados mais rápidos do que os protocolos tradicionais (2-6 h em comparação com 24-72 h no caso de métodos de microdiluição, por exemplo), o que pode ter um tremendo impacto no resultado clínico para o paciente (GREEN *et al.*, 1994; BALOUIRI

et al., 2017). Diferentes estudos demonstraram que a citometria de fluxo funcionou para testar a atividade dos e fluconazol, caspofugina ou anfotericina B contra cepas de *C. albicans* (MITCHEL *et al.*, 2005; JOUNG *et al.*, 2007) e resultados semelhantes foram previamente obtidos com concentrações sub-inibitórias de AMB quando incubadas com actosídeo, um glicosídeo, contra uma cepa ATCC de *C. albicans* (ALI *et al.*, 2011). Neste caso, a citometria de fluxo e o checkerboards foram realizados com uma cepa clínica de *C. albicans* devido à importância de encontrar novos agentes antifúngicos, ou combinações, no tratamento da candidíase sistêmica quando a falha com a terapia farmacológica convencional é observada.

Foi percebido que a associação de qualquer dos peptídeos com a AMB pode tornar-se uma abordagem terapêutica muito útil contra infecções invasivas de levedura, na medida em que a dose eficaz de AMB, conseqüentemente a toxicidade e outros efeitos secundários, podem ser substancialmente reduzidos. Esta alternativa é particularmente promissora para Ctn [15-34], cuja notável estabilidade sérica (meia-vida 770 min) é susceptível de fazer associação com bastante promissora com a AMB in vivo (FALCAO *et al.*, 2015).

Experimentos destinados a estabelecer a curva do tempo de morte é o método mais apropriado para determinar os efeitos microbicidas de uma droga. Esta é a ferramenta ideal para obter informações sobre a dinâmica de interação entre o agente antimicrobiano e a cepa testada (PFALLER *et al.*, 2004) A cinética de morte é um parâmetro importante para avaliar o desempenho dos peptídeos antimicrobianos Embora só exista a padronização desses ensaios para bactérias, diferentes estudos utilizam esse método para determinar o efeito sinérgico entre drogas, e também estudos com cepas fúngicas (CLANCY *et al.*, 2006, KLEPSER *et al.*, 1998).

No ensaio para determinar a curva do tempo de morte foi observado que, o número de unidades formadoras de colónias (UFC) da *C. albicans* LABMIC0107 foram rapidamente reduzidas após tratamento com Ctn [15-34] na concentração equivalente a CIM (Figura 13). Embora ambos os fármacos pudessem inibir qualquer crescimento de levedura após 8 h de tratamento, eles não reduziram o número de UFCs da mesma forma, o que sugeriu que fragmento Ctn [15-34] e AMB poderiam ter diferentes mecanismos de ação contra *C.albicans*.

Antes de prosseguir com outros experimentos de citometria de fluxo, as atenções se voltaram para o Ctn[15-34]. Uma vez que os PAMs, incluindo as catelicidinas, interagem com os fosfolípidos bacterianos e fúngicos carregados negativamente e que induzem a ruptura da membrana (COTRIM *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2011; AGIER *et al.*, 2015) um teste rápido foi realizado para verificar se Ctn [15-34] sozinho poderia interagir com membranas lipídicas. Nesse ensaio, o dano da membrana plasmática foi estimado aproximadamente com base na quantidade de produto gerada pela atividade de fosfolipase após tratamento de lipídio 4N3OBA (substrato) com o fragmento Ctn [15-34]. Na sua CIM contra *C. albicans*, mas sem as células, pode ser observado um grande aumento proporcional na atividade de fosfolipase em comparação com os lípidos não tratados ou tratados com apenas com a concentração subinibitória do peptídeo (Figura 3). O lipídeo 4N3OBA (substrato) é frequentemente utilizado em estudos para avaliar a atividade enzimática de frações e substâncias isoladas de venenos de cobra (COTRIM *et al.*, 2011)

Após o teste com os lipídios sintético (4N3OBA), foi então utilizado um peptídeo marcado com fluoresceína, o FITC-Ctn-[15-34] a 10 µM para estudar a interação do peptídeo com células de *C. albicans* por citometria de fluxo. Nesta avaliação, PI foi novamente utilizado para monitorizar a perturbação da membrana da célula de levedura pelo peptídeo (Figura 16). Enquanto o peptídeo interagiu com as células nos primeiros 30 minutos de incubação, o que foi observado pela fluorescência verde associada às leveduras, demorou uma hora de tratamento para observar danos pronunciados da membrana de *C. albicans* (aumento da fluorescência vermelha associada à célula). Este conjunto de experimentos foi derivado de um trabalho anterior (FREIRE *et al.*, 2015), onde utilizaram a citometria de fluxo para examinar a permeabilização das células bacterianas com um PAM ao longo do tempo.

Por último, o estudo da via de morte celular de *C. albicans* foi também investigada por citometria de fluxo usando marcadores para necrose e apoptose (Figuras 17 e 18). Embora AMB e Ctn[15-34] promovessem principalmente a necrose das células vivas restantes, nas suas respectivas CIMs em 24 horas, a morte celular por necrose causada pelo peptídeo poderia já ser distinguida em concentrações sub-inibitórias em comparação com o fármaco polieno. Apesar de não ter sido realizado estudo para avaliar a formação de espécies reativas de oxigênio ROS em células de *Candida* tratadas com Ctn[15-34], vários estudos demonstraram que a entrada de peptídeos antimicrobianos em células de *Candida* resultou no acúmulo de (ROS) levando à necrose celular (MAURYA *et al.*, 2011; MAURYA *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de novos modelos antifúngicos tem sido objeto de estudo em todo o mundo. Aqui foi demonstrado que em conjunto, Ctn e seus fragmentos, particularmente Ctn [15-34], são uma alternativa promissora, sozinhos ou combinados com anfotericina B, para o tratamento de doenças fúngicas.

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho teve o objetivo de determinar o perfil de atividade antifúngica de Ctn e seus fragmentos Ctn [1-14] e], avaliar qual o possível mecanismo de ação do Ctn [15-34] contra *C. albicans*. Para isso, foram estabelecidas uma serie de metodologias e diante dos resultados obtidos podemos concluir que:

- O Ctn apresentou um potencial terapêutico limitado devido à sua baixa seletividade, conforme já descrito em estudo anterior. O fragmento Ctn[1-14], que foi inativo previamente contra bactérias e células cancerosas, apresentou atividade contra leveduras, mas tem uma atividade intermédia anti-levedura. E o Ctn[15-34] aparece como a molécula mais promissora para o desenvolvimento de um novo agente terapêutico para candidíases invasivas, uma vez que apresentou boa atividade contra cepas de leveduras e baixa toxicidade frente a células eucarióticas saudáveis.

- As crotalícinas apresentaram efeito sinérgico quando associadas a AMB contra cepas de *C. albicans*. De modo que os desempenhos relativamente modestos de Ctn e Ctn[1-14] podem ser melhorados quando associados com AMB, que tem sua dose ativa quatro vezes reduzida quando associada aos peptídeos.

- A atividade antilevedura do Ctn[15-34] merece destaque também devido aos perfil seletivo desse peptídeo, que apresentou muito menor citotoxicidade renal e atividade hemolítica do que a AMB. Além disso, a sua longa meia-vida no soro e a sua poderosa sinergia com AMB conferem ao Ctn[15-34] destaque entre os peptídeos testados.

- O Ctn [15-34] promove o rompimento da membrana celular de *C. albicans*, tal como outros PAMs. Além disso, a via de morte celular de *C. albicans* detectada após o tratamento com peptídeos foi a necrose, o que confirmou ainda mais a capacidade de dano da membrana celular por Ctn [15-34].

- O Ctn [15-34] demonstrou ser um candidato valioso para o futuro desenvolvimento de um antifúngico derivado de peptídeo, que pode ser utilizado sozinho no tratamento de candidíases invasivas, ou como adjuvante combinado com o antibiótico padrão, a AMB.

7 PERSPECTIVAS

Esta pesquisa abre a perspectiva para vislumbrar novos caminhos a fim de aperfeiçoar o novo modelo terapêutico aqui reportado, sempre considerando os principais problemas associados aos fármacos convencionais: o desenvolvimento de resistência das cepas após tratamento, e os severos efeitos adversos associados ao uso de algumas drogas.

Em relação ao desenvolvimento de resistência das cepas de *Candida* tratadas com os peptídeos, já foram iniciados ensaios, utilizando técnicas de biologia molecular, a fim de estabelecer o perfil de expressão dos genes que conferem resistência aos fármacos convencionais após o tratamento com as crotalidinas.

Uma outra frente de trabalho envolve a realização de estudos de microscopia visando estabelecer a rota de sinalização do Ctn[15-34] a fim de determinar qual é o alvo intracelular do peptídeo. Os ensaios de microscopia, além de completar as informações a cerca do mecanismo de ação do Ctn[15-34], podem trazer ainda mais informações sobre o potencial biotecnológico do peptídeo.

Ainda sobre a atividade do Ctn[15-34], faz-se necessário a realização de estudos de toxicidade e atividade modulatória *in vivo*. Alguns modelos vêm sendo pensados, e alguns estudos estabeleceram a relação entre a alta titulação de citocinas citolíticas com os efeitos citotóxicos associados ao uso de fármacos por longos períodos. Esses experimentos associados a análise histopatológica dos tecidos pode ser um modelo utilizado para avaliar a toxicidade do Ctn[15-34].

Além do que já foi citado, é preciso destacar que os dados preliminares da ação das crotalidinas sobre *Cryptococcus* sp. indicam que essa abordagem também é promissora. Logo, estudos voltados para estabelecer o perfil de sensibilidade com um número maior de cepas, bem como estudos da ação combinada de drogas e peptídeos devem ser encaminhados o quanto antes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIER, J.; EFENBERGER, M. et al. Cathelicidin impact on inflammatory cells. **Cent Eur J Immunol**, v.40(2), p. 225-235, 2015.

ALI, I.; SHARMA, P. et al. In vitro antifungal activities of amphotericin B in combination with acteoside, a phenylethanoid glycoside from *Colebrookea oppositifolia*. **J Med Microbiol**, v.60(Pt 9), p.1326-1336, 2011.

ANDREU, N.; FLETCHER, T.; KRISHNAN, T. et al. Rapid measurement of anti-tuberculosis drug activity in vitro and in macrophages using bioluminescence. **J.Antimicrob.Chemother**, v.67, p.404–414, 2012.

ARENDRUP, MC.; DZAJIC, E.; JENSEN, RH. et al. Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia: data from a nationwide fungaemia surveillance programme. **Clin Microbiol Infect**, v.19(8), p.E343–E353, 2013.

ASAI, K.; TSUCHIMORI, N.; OKONOGI, K.; PERFECT, J. R.; GOTOH, O.; YOSHIDA, Y. Formation of azole-resistant *Candida albicans* by mutation of sterol 14 α -demethylase P450. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1163-1169, 1999.

BALOUIRI, M. et al. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p.71–79, 2016.

BALOUIRI, M., BOUHDID, S. et al. Effect of preconditioning cobalt and nickel based dental alloys with *Bacillus* sp. extract on their surface physicochemical properties and theoretical prediction of *Candida albicans* adhesion **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v.71, p.111-117, 2017.

BALS, R.; WILSON, J. Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides. **Cell Mol Life Sci**, v.60(4), p.711-720, 2003.

BECKER, S.; TERLAU H. Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.79(1), p.1-9, 2008.

BERMAN, J.; SUDBERY, PE. *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nat Rev Genet**, v.3, p.918-30, 2002.

BIRRELL, GW.; EARL, ST.; WALLIS, TP.; MASCI, PP.; DE JERSEY, J.; GORMAN, JJ.; LAVIN, MF. The diversity of bioactive proteins in Australian snake venoms. **Mol Cell Proteomics**, v.6(6), p.973-986, 2007.

BOZORG, A.; GATES, I.D.; SEN, A. Using Bacterial bioluminescence to evaluate the impact of biofilm on porous media hydraulic properties. **J. Microbiol. Methods**, v.109, p.84–92, 2015.

BOUZA, E.; MUÑOZ, P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. **Int J Antimicrob Agents**. v.32, p.S87–S91, 2008.

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

BRINGANS, S.; ERIKSEN, S.; KENDRICK, T.; GOPALAKRISHNAKONE, P. et al. Proteomic analysis of the venom of *Heterometrus longimanus* (Asian black scorpion). **Proteomics**, v.8(5), p.1081-1096, 2008.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S. F.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; SOARES JUNIOR, F. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Phenotypic characterization and *in vitro* antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 147–153, 2007.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**. v.3, p. 238–250, 2005.

BROWN, KL.; HANCOCK, RE. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Curr Opin Immunol**, v.18, p.24–30, 2006.

CALDERONE, RA.; CLANCY, CJ. *Candida* and Candidiasis: ASM Press, Washington, DC, 2012.

CASTRO, T.L.; COUTINHI, H.D.M. COUTINHO; GEDEON, C.C.; SANTOS, J.M.; SANTANA, W.J.; DE SOUZA, L.B.S. Mecanismos de resistência da *Candida* sp wwa antifúngicos. **Infarma**, v.18, n.9, 2006.

CHARLES, PE.; DALLE, F.; AUBE, H. et al. Candida spp colonization significance in critically ill medical patients: A prospective study. **Intensive Care Med**, v.31(3), p.393–400, 2005.

CHAI, L. Y.; NETEA, M. G., et al. An elevated pro-inflammatory cytokine response is linked to development of amphotericin B-induced nephrotoxicity. **J Antimicrob Chemother**, v.68(7), p.1655-1659,2013.

CHEN, Y. P.; CHEN, F. Identifying targets for drug discovery using bioinformatics. **Expert Opin. Ther. Targets** , v.12 (4), p.383–389, 2008.

CHENG, G.; WOZNIAK, K.; WALLIG, MA.; FIDEL, PL. JR.; TRUPIN, SR.; HOYER LL. Comparison between *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression patterns in human clinical specimens and models of vaginal candidiasis. **Infect Immun**, v.73, p.1656-63, 2005.

CHONG, P. P.; HADI, S. R. A; LEE, Y. L.; PHAN, C. L.; TAN, B. C.; NG, K. P.; SEOWD,H. F. Genotyping and drug resistance profile of *Candida* spp. in recurrent and one-off vaginitis, and high association of non-*albicans* species with non-pregnant status. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, p. 449–456, 2007

CHOW, JK.; GOLAN, Y.; RUTHAZER, R. et al. Factors associated with candidemia caused by non-*albicans* *Candida* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit. **Clin Infect Dis**.v.46(8), p.1206–1213, 2008.

CLANCY, C.J.; HUANG, H.; CHENG, S. et al. Characterizing the effects of caspofungin on *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, and *Candida glabrata* isolates by simultaneous time-kill and post antifungal-effect experiments, **Antimicrob. Agents Chemother**, v.50, p.2569–2572, 2006.

CLSI M27A3. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard**. 3rd ed, 2008.

CLSI. M38-A2. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; approved standard** 2nd ed, 2008

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L.R.; DE ALMEIDA M. L.P.; CUNHA, A.K.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R.C. Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v.28, p.570-576, 2007.

CONLON, J. M.; AL-GHAFFER, N.; ABRAHAN, B. & LEPRINCE, J. Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. **Methods**, 42: 349–357. 2007.

COTRIM, C. A.; OLIVEIRA, S. C. B.; DIZ-FILHO, E. B. S.; FONSECA, F. V.; BALDISSERA JR, L.; ANTUNES, E.; XIMENES, R. M.; MONTEIRO, H. S. A.; RABELLO, M. .; HERNANDEZ, M. Z.; TOYAMA, D. O.; TOYAMA, M. H. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2. **Chemico-Biological Interactions.** v. 189, p. 9-16, 2011.

COUTO, E.M.P.; CARLOS; D.; MACHADO, E.R. Candidíase em Neonatos: Uma Revisão Epidemiológica. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde.** v.15, n.4, p. 197-213, 2011.

CROUCH, SP.; KOZLOWSKI, R.; SLATER, KJ. et al. The use of ATP Bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. **J.Immunol.Methods** 160,p. 81–88, 1993.

DALLE F, WÄCHTLER B, L'OLLIVIER C, HOLLAND G, BANNERT N, WILSON D, et al. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. **Cell Microbiol** v.12:248-71; 2010.

DAVIS DA. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. **Curr Opin Microbiol** v.12:365-70; 2009

DATHE, M.; WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1462: 71–87, 1999.

DIEKEMA D, ARBEFEVILLE S, BOYKEN L, KROEGER J, PFALLER M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagn Microbiol Infect Dis.**;73(1):45–48. 2012

DIMOPOULOS G, NTZIORA F, RACHIOTIS G, ARMAGANIDIS A, FALAGAS ME. *Candida albicans* versus non-*albicans* intensive care unit-acquired bloodstream infections: differences in risk factors and outcome. **Anesth Analg**, 106(2):523–529, 2008.

DURR, U. H., SUDHEENDRA, U. S. et al. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. **Biochim Biophys Acta**, 1758(9): 1408-1425, 2006.

EGGIMANN, P., J. GARBINO, et al. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. **Lancet Infect Dis** 3(12): 772-785. 2003

ENOCH, D. A., H. A. LUDLAM, et al. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. **J Med Microbiol** 55(Pt 7): 809-818. 2006.

ESTRADA G, VILLEGAS E, CORZO G. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. **Nat Prod Rep**. 24(1):145-161, 2007.

FALCÃO, C.B.; LA TORRE, B.G.; PEREZ-PEINADO, C.; BARRON, A.E.; ANDREU, D.; RÁDIS-BAPTISTE, G. Viperidins: a novel family of cathelicidin- related peptides from the venom gland of South American pit vipers. **Amino Acids**, v.46, n.11, p.2561-71, 2014.

FALCAO, C. B.; PEREZ-PEINADO, C. et al. Structural Dissection of Crotalicidin, a Rattlesnake Venom Cathelicidin, Retrieves a Fragment with Antimicrobial and Antitumor Activity. **J Med Chem**, v.58(21), p.8553-8563, 2015.

FANNING S, MITCHELL AP. Fungal biofilms. **PLoS Pathog**; 8:e1002585; 2012.

FINGER, S.; WIEGAND, C.; BUSCHMANN, H. et al. Antimicrobial properties of cyclodextrin–antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay, **Int.J.Pharm.**436, p.851–856,2012.

FINKEL JS, MITCHELL AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nat Rev Microbiol** v.9, p.109-18, 2011.

FREIRE, J. M., D. GASPAR, et al. Monitoring antibacterial permeabilization in real time using time-resolved flow cytometry. **Biochim Biophys Acta** 1848(2): 554-560. 2015.

- GALIGER, C.; BROCK, M.; JOUVION, G. et al., Assessment of efficacy of antifungals against *Aspergillus fumigatus* : value of real-time bioluminescence imaging. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.57, p.3046–3059, 2013
- GARCIA MC, LEE JT, RAMSOOK CB, ALSTEENS D, DUFRÊNE YF, LIPKE PN. A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. **PLoS One** 2011.
- GIOLO, M.P.; SVIDZINSKI, T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.46, n.3, p. 225-234, 2010.
- GIULIANI A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, SF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics, **Cent. Eur. J. Biol.** 2, 1–33, 2007.
- GIULIANI, A.; RINALDI, AC. Beyond natural antimicrobial peptides: multimeric peptides and other peptidomimetic approaches. **Cell Mol Life Sci** 68(13): 2255-2266. 2001.
- GREEN, L., B. PETERSEN, et al. Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry. **J Clin Microbiol** 32(4): 1088-1091. 1994.
- GUDLAUGSSON O, GILLESPIE S, LEE K, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. **Clin Infect Dis.** 37(9):1172–1177. 2003.
- GUPTA, A. K.; COOPER, E. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. **Mycopathologia** 166(5-6): 353-367. 2008.
- HAIDER, M.; TREHAN, V. et al. *Cryptococcus laurentii* fungemia. **Indian J Med Microbiol.**;31:75-7. 2013
- HANCOCK RE, SAHL HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nat Biotechnol** 24: 1551–7. 2006.
- HENRIQUE, M.; NEGRI, M.; SILVA, S. O impacto clínico de biofilmes de espécies de *Candida*. In: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. (Org.). **Biofilmes: Na Saúde, no Ambiente, na Indústria**. Porto: Publindústria, 2012. Cap. 11, p. 95-103.
- HOSER, R.T. A reassessment of the higher taxonomy of the viperidae. **Australian Journal of herpetology**, v.10, p. 35-48, 2012.

IZADPANA, A.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 52: 381–390. 2005.

JACOBSEN ID, WILSON D, WÄCHTLER B, BRUNKE S, NAGLIK JR, HUBE B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert Rev Anti Infect Ther**; 10:85-93; 2012.

JOHNSON, M. D., C. MACDOUGALL, et al. (2004). "Combination antifungal therapy." **Antimicrob Agents Chemother** **48**(3): 693-715.

JOUNG, Y. H., H. R. KIM, et al. (2007). "Fluconazole susceptibility testing of *Candida* species by flow cytometry." **J Infect** **54**(5): 504-508.

JUYAL, D.; SHARMA, M.; PAL, S.; RATHAN, V.K.; SHARMA, N. Emergence of non-albicans *Candida* species in neonatal Candidemia. **N Am J Med Sci**, v.5, n.9, p.541-5, 2013.

KALKANCI, A.; BERK, E.; AYKAN, B.; CAGLAR, K.; HIZEL, K.; ARMAN, D.; KUSTIMUR, S. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida species* isolated from hospitalized patients. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 17, p. 16-20, 2007.

KAKEYA, H.; MIYAZAKI, Y.; MIYAZAKI, H.; NYSWANER, K.; GRIMBERG, B.; BENNETT, J. E. Genetic analysis of azole resistance in the Darlington strain of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 2985-2990, 2000.

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.

KAMIYA H, SAKAI R, JIMBO M. Bioactive molecules from sea hares. **Prog Mol Subcell Biol**. 43:215-239, 2006.

KOHLER, L. M., B. M. SOARES, et al. (2006). "In vitro susceptibility of isolates of *Sporothrix schenckii* to amphotericin B, itraconazole, and terbinafine: comparison of yeast and mycelial forms." **Can J Microbiol** **52**(9): 843-847.

LANIADO-LABORIN, R. AND M. N. CABRALES-VARGAS (2009). "Amphotericin B: side effects and toxicity." **Rev Iberoam Micol** **26**(4): 223-227.

LEROY O, GANGNEUX JP, MONTRAVERS P, et al; AmarCand Study Group. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006). **Crit Care Med.**;37(5):1612–1618. 2009.

LEWIS RE. Overview of the changing epidemiology of candidemia. **Curr Med Res Opin.** 25(7):1732–1740,2009.

MARÓTI G, KERESZT A, KONDOROSI E, MERGAERT P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. **Res Microbiol** 162:363–74. 2011.

MARTINEZ, M.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; KIRKPATRICK, W. R.; BACHMANN, S. P.; PEREA, S.; RUESGAB, M. T.; PATTERSON, T. F. Heterogeneous mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from an HIV-infected patient on continuous fluconazole therapy for oropharyngeal candidosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 515-524, 2002.

MAURYA, I. K., S. PATHAK, et al. (2011). "Antifungal activity of novel synthetic peptides by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of cell wall against *Candida albicans*." Peptides **32**(8): 1732-1740.

MAURYA, I. K., C. K. THOTA, et al. (2013). "Rationally designed transmembrane peptide mimics of the multidrug transporter protein Cdr1 act as antagonists to selectively block drug efflux and chemosensitize azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*." J Biol Chem **288**(23): 16775-16787.

MAYER, F. L., D. WILSON, et al. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence** **4**(2): 119-128, 2013.

MEDRANO, D. J.; BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO A.; ROCHA, M. F.; RABENHORST, S. H.; SIDRIM, J. J. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**,v. 48, p. 17–20, 2006.

MITCHELL, M., M. HUDSPETH, et al. (2005). "Flow cytometry susceptibility testing for the antifungal caspofungin." J Clin Microbiol **43**(6): 2586-2589.

MITTA, G., HUBERT, F., DYRYNDA, E. A., BOUDRY, P., ROCH, P. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. **Dev. Comp. Immunol.** 24, 381–393, 2000.

MUJICA, M. T.; FINQUELIEVICH, J. L.; JEWTOUCHOWICZ, V.; IOVANNITTI, C. A. Prevalence of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in clinical samples during 1999–2001. **Rev. Argent Microbiol.**, v. 36, p.107–112, 2004.

NAGLIK JR, MOYES DL, WÄCHTLER B, HUBE B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes Infect** 13:963-76; 2011

NAGLIK, J. R., J. P. RICHARDSON, et al. (2014). "Candida albicans pathogenicity and epithelial immunity." PLoS Pathog **10**(8): e1004257.

NAKAMURA, T.; TAKAHASHI, H. Epidemiological study of *Candida* infections in blood: susceptibilities of *Candida* spp. to antifungal agents, and clinical features associated with the candidemia. **J. Infect. Chemother.**, v. 12, p. 132–138, 2006.

NICHOLLS S, MACCALLUM DM, KAFFARNIK FA, SELWAY L, PECK SC, BROWN AJ. Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. **Fungal Genet Biol** v.48:297-305; 2011.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J Antimicrob Chemother** 52(1): 1. 2003.

OLIVEIRA, V.K.P.; RUIZ, L.S.; PAULA, C.R. Fungemia caused by *Candida* species in a children's public hospital in the city São Paulo, Brazil, study in the period 2007-2010. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.56, n.04, p. 301-305, 2014.

OZAWA, H.; OKABAYASHI, K.; KANO, R.; WATARI, T.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Rapid identification of *Candida tropicalis* from canine cystitis. **Mycopathologia**, v. 160, p. 159-162, 2005.

PALOQUE, L.; VIDAL, N.; CASANOVA, M. et al. A new, rapid and sensitive bioluminescence assay for drug screening on *Leishmania*, **J. Microbiol. Methods** v.95, p.320–323, 2013

PAPPAS PG. Invasive candidiasis. **Infect Dis Clin North Am.** V.20(3), p. 485–506, 2006.

PASQUALOTTO, AC.; DENNING, DW. New and emerging treatment for infections, **J. Antimicrob. Chemother.** 61 (2008) 119–130.

PEREA, S.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; KIRKPATRICK, W. R.; McATEE, R. K.; SANTILLAN, R. A.; MARTINEZ, M.; CALABRESE, D.; SANGLARD D.; PATTERSON, T. F. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 676–2684, 2001.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; SADER, H. S.; FLUIT, A. C.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 3254–3259, 2001.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):133–163.

PLAYFORD GE, MARRIOTT D, NGUYEN Q, et al. Candidemia in nonneutropenic critically ill patients: Risk factors for non-albicans *Candida* spp. *Crit Care Med.* 2008;36(7):2034–2039.

POSTERARO, B.; TUMBARELLO, M.; LA SORDA, M.; SPANU, T.; TRECARICHI, E.M.; DE BERNARDIS, F.; SCOPPETTUOLO, G.; SANGUINETTI, M.; FADDA, G. Azole resistance of *Candida glabrata* in a case of recurrent fungemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 3046-7, 2006.

POWERS, J. P.; HANCOCK, R. E.. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, 24: 1681–1691. 2003.

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.** 19(2): 211-225, 2008.

RIZZA, M.D.; DELLAYALLE, P.D.; NARANCIO, R.; CABRERA, A.; FERREIRA, F. Biomolecules as Host Defense Weapons Against Microbial Pathogens. **Recent Patents on DNA & Gene Sequences**, v.2, n.2, p.82-96, 2008.

ROBBINS N, UPPULURI P, NETT J, RAJENDRAN R, RAMAGE G, LOPEZ-RIBOT JL, et al. Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. **PLoS Pathog**; 7:e1002257; 2011.

ROSA, R.D.; BARRACCO, M.A. Antimicrobial peptides in crustaceans. **Invertebrate Survival Journal**, v.7, p.262-284, 2010.

SANTOS, M. L., D. O. TOYAMA, et al. (2011). "Modulation of the pharmacological activities of secretory phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* induced by naringin." Molecules **16**(1): 738-761.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; GIANNINI, M. J. S. M. *Candida* species: current formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**. v. 62, pp. 10-24, 2013.

SAVILLE SP, LAZZELL AL, MONTEAGUDO C, LOPEZ-RIBOT JL. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. **Eukaryot Cell**, v.2, p.1053-60; 2003.

SCHWEIZER, F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. **Eur. J. Pharmacol**, v. 625 (1-3), p. 190-194. 2009.

SENEVIRATNE, C. J.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Dis.**, v. 14, p. 582-590, 2008.

SERRANO, D. R. et al. Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. **Int. J. Pharm.**v. 447, p.38-46, 2013.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1462: 55-70. 1999.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **Biopolymers**, 66: 236-48. 2002.

SIEVERT DM, RICKS P, EDWARDS JR, et al; National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and Participating NHSN Facilities. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. **Infect Control Hosp Epidemiol**. 34(1):1–14, 2013.

SILVA, S., M. NEGRI, et al. (2011). "Adherence and biofilm formation of non-Candida albicans Candida species." **Trends Microbiol** **19**(5): 241-247.

SILVA, M.S.; BRANDÃO, D.O; CHAVES, T.P.; FORMIGA FILHO, A.L.N.; COSTA, E.M.M.B.; SANTOS, V.L.; MEDEIROS, A.C.D. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid Northeast: Contribution to the control of oral microorganisms. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, 2012.

SLAVIN MA, SHARON C, CHEN A. Cryptococcosis, lymphoproliferative disorders and modern day chemotherapy regimens. **Leuk Lymphoma**. 2013;54:449-50.

TSAI, P. W., Y. L. CHENG, et al. (2014). "Responses of *Candida albicans* to the human antimicrobial peptide LL-37." **J Microbiol** **52**(7): 581-589.

UPPULURI P, CHATURVEDI AK, SRINIVASAN A, BANERJEE M, RAMASUBRAMANIAM AK, KÖHLER JR, et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. **PLoS Pathog**; 6:e1000828, 2010.

VANDEN BOSSCHE, H.; ENGELEN, M.; ROCHETTE, F. Antifungal agents of use in animal health – chemical, biochemical and pharmacological aspects. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 5–29, 2003.

VANDEPUTTE, P.; LARCHER, G.; BERGES, T.; RENIER, G.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J. P. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 4608–4615, 2005.

VERSTREPEN KJ, KLIS FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Mol Microbiol**; 60:5-15; 2006

WÄCHTLER B, WILSON D, HAEDICKE K, DALLE F, HUBE B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. **PLoS One**; 6:e17046; 2011.

WANG, Y.; HONG, J.; LIU, X.; YANG, H.; LIU, R.; WU, J.; WANG, A.; LIN, D.; LAI, R. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. **PLoS One** 3 (9), e3217. 2008.

WANG, H.; KE, M.; TIAN, Y.; WANG, J.; LI, B.; WANG, Y.; DOU, J.; ZHOU, C. BF-30 selectively inhibits melanoma cell proliferation via cytoplasmic membrane permeabilization and DNA-binding in vitro and in B16F10-bearing mice. **Eur. J. Pharmacol.** V.707 (1–3), p.1–10, 2013.

WISHART, D. S. Bioinformatics in drug development and assessment. **Drug Metab. Rev**, v.37 (2), p.279–310, 2005.

YANMEI LI, QI XIANG, QIHAO ZHANG, YADONG HUANG, ZHIJIAN SU. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides** 37,207–215.2012.

YAPAR, N. (2014). "Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis." *Ther Clin Risk Manag* **10**: 95-105.

YEAMAN, M. R. & YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, 55: 27–55. 75, 2003

ZAKIKHANY K, NAGLIK JR, SCHMIDT-WESTHAUSEN A, HOLLAND G, SCHALLER M, HUBE B. *In vivo* transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. **Cell Microbiol**; 9:2938-54; 2007.

ZHAI, B., H. ZHOU, et al. Polymyxin B, in combination with fluconazole, exerts a potent fungicidal effect. **J Antimicrob Chemother** 65(5): 931-938. 2010.

ZHAO, H. Mode of action of antimicrobial peptides. Academic Dissertation Helsinki Biophysics & Biomembrane Group - Institute of Biomedicine, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Finland, 2003.

ZHAO, H.; GAN, T. X.; LIU, X. D.; JIN, Y.; LEE, W. H.; SHEN, J. H.; ZHANG, Y. Identification and characterization of novel reptile cathelicidins from elapid snakes. **Peptides** 29 (10), 1685–1691. 2008.

ZHOU, H.; DOU, J.; WANG, J.; CHEN, L.; WANG, H.; ZHOU, W.; LI, Y.; ZHOU, C. The antibacterial activity of BF-30 in vitro and in infected burned rats is through interference with cytoplasmic membrane integrity. **Peptides**, 32 (6), 1131–1138, 2011.

ZHU W, FILLER SG. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. **Cell Microbiol**, 12:273-82; 2010.

ANEXO I

Insights into the candidacidal mechanism of Ctn[15-34] as revealed by multiparametric flow cytometry

Insights sobre o mecanismo de ação candidicida do Ctn[15-34] revelado por citometria de fluxo multiparamétrica.

Insights into the candidacidal mechanism of Ctn[15-34] as revealed by multiparametric flow cytometry

Carolina Sidrim P. Cavalcante^{1,2,5}, Cláudio B. Falcão^{1,2}, Francisca Lidiane Linhares de Aguiar^{1,2}, Raquel O.S. Fontenelle³, Ramon Roseo de P. P. B. de Menezes⁴, Alice Maria Costa Martins⁴, David Andreu^{5*}, Gandhi Rádis-Baptista^{1,2*}

¹Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Ceará, 60740-000, Fortaleza, CE, Brazil.

²Laboratory of Biochemistry and Biotechnology, Institute for Marine Sciences, Federal University of Ceará, Av. da Abolição, 3207, 60165-081, Fortaleza-CE, Brazil.

³Centre of the Agricultural Sciences and Biological, Acaraú Valley State University, 62040-370, Sobral, CE, Brazil.

⁴Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

⁵Department of Experimental and Health Sciences, Pompeu Fabra University, Barcelona Biomedical Research Park, Dr Aiguader 88, 08003, Barcelona, Spain.

*Authors for correspondence: Gandhi Rádis-Baptista; E-mail: gandhi.radis@ufc.br

Abstract

Ctn[15–34], its fragment of Crotalicidin, a cathelicidin from a South American rattlesnake, and have shown candidicidal activity against clinical strains of *Candida sp.* We now report the anti-fungal activity of Ctn[15–34] and characterize the possible mechanisms of action against *Candida albicans*. To characterize the anti-Candida activity of Ctn[15-34] were performed the phospholipase activity assay, time killing assay, and flow cytometry techniques. The plasmatic membrane damage was roughly estimated based on the amount of product generated by phospholipase activity after treatment of 4N3OBA lipid (substrate) with Ctn[15-34]; At 10 µM a big increase in phospholipase activity could be noticed compared to non-treated and treated lipids at 5µM. Analysis of the time killing assays of cells treated with Ctn [15-34] and AMB, showed that they did not reduce the number of CFUs in the same fashion, which suggested that Ctn[15-34] and AMB could have different mechanisms of action against *C.albicans*. Ctn[15-34] alone promoted cell membrane disruption, like other AMPs, in yeasts. Moreover, the *C. albicans* cell death pathway detected after the peptide treatment was necrosis, which further confirmed cell membrane damage capacity by Ctn[15-34]. The Ctn [15-34] is a valuable candidate for further development as an antifungal therapeutic peptide lead, particularly against yeast infections where it could be usefully applied either alone or in combination with a standard antibiotic such as AMB.

Key words: antimicrobial peptides/candidacidal mechanism/crotalicidin/pathogenic eukaryotes/therapeutic peptides/flow cytometry

Introduction

Systemic fungal infections have drastically increased over the past three decades due to the rising immunocompromised population as a result of transplantation, cancer chemotherapy, steroid therapy and, HIV infection³. The major fungal pathogens include *Candida* species. *C. albicans* is normally a commensal organism in humans, but when the host is unable to mount an adequate immune response, it results in mucosal, cutaneous or invasive mycosis. 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 increased awareness of the limitations in their spectrum of activity, pharmacokinetics, and risk for pharmacokinetic drug interactions⁴. Amphotericin B (AMB) has also been commonly used to treat serious fungal infections. Nevertheless, resistance to AMB is slowly developing in selected *Candida* species and there are significant side effects associated with its use, including nephrotoxicity⁵. Although, recent antifungal agents, including the peptide-based agents⁶⁻⁸, micafungin⁹ and caspofungin¹⁰, have been developed but their clinical utility is limited by their potential sensitivity to proteases, bioavailability, toxicity to host cell and high cost. In this context, increase the importance of continued development of new antifungal agents.

Host defense peptides or cationic antimicrobial peptides (AMPs) are emerging as potential therapeutic antifungal agents, primarily because the development of resistance to them is very low¹¹. Though it has been well established that AMPs alter the cell membrane function through increased permeability, it is not a sole mode of action and more subtle mechanisms determine the specificity and toxicity of the peptides¹².

In previous studies, cathelicidin precursors from the venom glands of South American pit vipers were reported¹. Ctn[15–34] is a fragment of a viperidins—i.e., crotalicidin (Ctn) from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*— that presents anti-

bacterial and anticancer activities of Ctn, with low toxicity to healthy eukaryotic cells². More recently we demonstrated the antifungal activities of Ctn[15–34] on different opportunistic yeast and dermatophyte strains. Ctn[15–34], were less toxic and more active against yeasts than AMB¹³. In this study We describe the killing kinetics and Insights into the candidacidal mechanism of Ctn[15-34] on *C. albicans* clinical strain.

Materials and Methods/Experimental Procedure

Peptides. Ctn[15-34] (KKRLKKIFKKPMVIGVTIPF-amide) was prepared by solid phase synthesis, purified by HPLC and characterized by mass spectrometry analysis, as previously described (referencia). Before deprotection of all radical groups, a 1.1 equivalent of FITC was added to the resin and left overnight for the completion of coupling. For all experiments, 1 mM peptide stock solutions were prepared in deionized water and stored at 4 °C for up to six weeks.

Phospholipase activity. Ctn[15-34] was mixed with reaction buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, pH 8.0) containing 4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid (2 mM 4N3OBA,). Absorbance at 425 nm was read after 0, 10, 20, 30, 40 minutes of incubation at 37 °C.

Fungi. The *Candida albicans* strains used in this study were kindly donated by Santa Casa de Misericordia Hospital at Sobral (Ceara, Brazil). Their identification were confirmed with CHROMagar-Candida (CHROMagar Company, Paris, France) in a VITEK 2 automated system (BioMerieux, 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. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of Ctn [15-34] against the fungal strains were determined by the broth microdilution method, based essentially on documents M27-A3¹⁴ for yeasts from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Determination of these MICs for all *Candida albicans* strains were performed in 96-well microtiter plates (E & K Scientific, Santa Clara, CA, USA). The peptide stock solutions were used to make two-fold serial dilutions with RPMI 1640 medium to a final volume of 100 µL/well. Subsequently, 100 µL of fungal suspension, containing 2×10^6 cfu/mL (equivalent to 0.5 in the McFarland's scale), in RPMI were added to each well. Final peptide concentrations ranged from 0.0195 to 40 µM. Amphotericin B (AMB; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) was used as a standard antibiotic (positive control) against yeasts. MIC was defined as the lowest peptide concentration at which no fungal growth was visually observed after 48 h at 30 °C.

Synergism detection assays. 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 microtiter plates, 50 µl of fungal suspensions (with 2×10^6 cfu/mL \approx 0.5 in the McFarland's scale) in RPMI medium were added to wells containing one of the peptides and AMB in the same final concentration ranges (0.0195-40 µM peptide, 0.0312-16 µM AMB) previously used 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 demonstrated in *Candida* cells by flow cytometry using propidium iodide (PI) as a viability marker. Cells treated with Ctn [15-34] and AMB alone, at their respective MIC combined values, for 4 h and 24 h. Flow cytometry was performed via a FACS, Calibur flow cytometer (Becton–Dickinson, San Jose, CA, USA). The synergistic effect of Ctn[15-34] with AMB was further evaluated with *C. albicans* cells by flow cytometry. Fungal suspensions containing 2×10^6 cfu/mL (≈ 0.5 in the McFarland’s scale) in RPMI were treated with Ctn[15-34] (0.31 μ M) and AMB (0.5 μ M), either alone or combined, for 4 h and 24 h. After these incubation periods, cells were washed and propidium iodide (PI) at a final concentration of 1.49 μ M was added to the yeasts as a viability marker. *C. albicans* cells were then run in a FACSCalibur flow cytometer (Becton–Dickinson, San Jose, CA, USA) and 10,000 live events were analyzed with the Cell Quest software (Becton-Dickinson). Cells without treatment were used as controls and experiments were carried out in triplicate.

Time kill assay. *C. albicans* cells ($\sim 1 \times 10^6$ CFU/ml) were inoculated in RPMI-1640 medium containing Ctn[15-34] (10 μ M), or AMB (2 μ M). The tubes were incubated (30 °C; 200 rpm), and 100 μ l aliquots were removed at predetermined time points (0, 2, 4, 6, 8, 12, and 24 h).

The aliquots were serially diluted (10-fold) in saline and plated on YEPD agar plates. The numbers of colonies were counted after incubating the plates at 30 °C for 48 h.

Ctn[15-34] - C. albicans interaction assay by flow cytometry analysis. *C. albicans* cells ($\sim 1 \times 10^6$) were first harvested at the logarithmic phase and suspended in RPMI-1640 medium. Next, these yeasts were incubated at 30 °C with FITC-labeled Ctn[15-34] at MIC and 0.5MIC values, for 0, 0.5, 1, 2, and 4 h... After each incubation period, cells were harvested by centrifugation and re-suspended in phosphate buffered saline (PBS). These yeasts were then run in a FACSCalibur flow cytometer (Becton–Dickinson) and 10,000 live events were analyzed with the Cell Quest software (Becton-Dickinson). Cells without treatment or treated with PI (1.49 μ M) were used as controls and experiments were carried out in triplicate.

Analysis of necrotic and apoptotic markers. *C. albicans* cells were treated at 30 °C with Ctn[15-34] or AMB, at their respective MIC and 0.5MIC values, for 0, 0.5, 1, 2, 4, 12 and 24 h. After each treatment period, these yeasts were incubated with 7-actinomycin D (7-AAD) and Annexin V by using the PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™) to assess cellular integrity and the externalization of phosphatidylserine (PS), according to the manufacturer's protocol. The cells were then run in a FACSCalibur flow cytometer (Becton–Dickinson) and 10,000 live events were analyzed with the Cell Quest software (Becton-Dickinson). Yeasts without treatment were used as controls and experiments were carried out in triplicate.

Results

Ctn[15-34] and FITC-labeled Ctn[15-34]

The peptides Ctn[15-34] and its FITC-labeled analogue were prepared as C-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 LC-MS. The peptide stock solutions at 1mM with deionized water did not show signs of degradation for at least 6 weeks at 4°C.

Anti-fungal activity and killing kinetics

Initially, the MICs of Ctn[15-34] and AMB against standard and clinical isolates of *C. albicans* were determined (**Table 1**) not only to confirm our previous findings¹³ but also to set up a basis for the subsequent studies. Based on these Ctn[15-34] and AMB found MICs for both strains, the time kill (killing kinetics) assays were next performed to evaluate *C.albicans* death profile when treated with these drugs over time. Results displayed in **Figure 1** showed that both drugs could inhibit the growth of *C.albicans* in agar plates after 8 hours of treatment at their MICs. However, while Ctn[15-34] quickly reduced the number of colony forming units between 0 and 4 h and slowly between 4 and 8 h, AMB profile was the opposite (slow reduction during the first 4 hours and a fast decrease between 4 and 8 h).

Ctn[15-34] display synergy with AMB against clinical strains of C. albicans

Drug interaction studies between Ctn[15-34] and AMB were also re-checked *in vitro* by the checkerboard dilution assay against the above *C. albicans* strains. According to the MICs results, 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 both *C. albicans* strains. This drug interaction that is classified as a synergism could be further observed by flow cytometry

using the clinical *C. albicans* strain and propidium iodide (PI) as a viability marker (cells start losing their viability as PI staining increases) (**Figure 2**). In **Figure 2A**, Ctn[15-34] alone at 0.31 μM was not enough to allow PI staining of *C. albicans* cells (green line) and results were similar to untreated cells (black line). When AMB at 0.5 μM was used instead (**Figure 2B**), 25% (\pm SEM) of 10,000 remaining live cells (red line) 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 (**Figure 2C**), a (significant) 10% increase in fluorescent signal ($35 \pm$ SEM %) could be observed in these PI stained yeasts (blue line), compared to cells treated with only the polyene drug.

Measurement of phospholipase activity

Since PI is an impermeable nucleic acid fluorescent dye which can only enter the cells with compromised membrane permeability and phospholipid plasmatic membrane disruption is the main mechanism of action of most antimicrobial peptides, our next step was to evaluate whether Ctn[15-34] could elicit phospholipase activity. Enzymatic activity generated after treatment of 4N3OBA (phospholipid) with Ctn[15-34] at 5 and 10 μM (equivalent to sub- and inhibitory concentrations to prevent *C.albicans* growth, but without the cells) was monitored at 425 nm wavelength. The highest phospholipase activity was observed with the phospholipid treated with 10 μM of Ctn[15-34] at all time points compared to 4N3OBA treated with 5 μM of peptide and non-treated treated phospholipids (**Figure 3**).

C. albicans cell membrane disruption capacity by FITC-Ctn[15-34]

This later result prompted us to investigate *C.albicans* membrane disruption capacity by the peptide. Using a FITC-labeled Ctn[15-34] at 10 μ M, **Figure 4** shows that up to the first 30 minutes of incubation, the peptide interacted with *C.albicans* cells (green “FL1” fluorescence) but it did not cause much membrane damage because of low PI staining (red “FL2” fluorescence). Therefore, the fluorescence ratio between FL1 and FL2 had a comparatively higher median. However, after 1 hour incubation, the peptide-*C.albicans* interaction provoked a more noticeable yeast cell membrane damage due to the increase in PI fluorescent signal and, thus, the ratio between FL1 and FL2 decreased.

Analysis of necrotic and apoptotic markers.

Finally, we verified the main *C .albicans* cell death pathway induced by Ctn[15-34] and compared with the death pathway triggered by AMB after treatment at sub- and inhibitory concentrations for 12 and 24 h (**Figure 5**). As depicted in **Figure 5A**, AMB mainly promoted necrosis, which can be observed especially after treatment at 2 μ M for 24h (14.8% of the remaining live cells – upper left quadrant), but it could also kill some of these *C.albicans* cells (5.4% - lower right quadrant) by apoptosis. Meanwhile, in **Figure 5B**, Ctn[15-34] apparently showed that there were more cells going through apoptosis than necrosis at both treated concentrations for 12 hours . However, by 24 hours of incubation, the percentage of cells going through apoptosis almost disappeared while there was a great increase of *C.albicans* yeasts committed to necrosis after Ctn[15-34] treatment, remarkably at 10 μ M (17.87%).

Discussion

The search and the development of new anti-fungal agents are urgent due to the potential drug resistance surge and spread, especially in *Candida* spp. strains that cause invasive candidiasis, the most prevalent systemic mycoses worldwide. Previously, the *in vitro* anti-fungal activity of Ctn[15-34] against standard and clinical isolates of *Candida* species was reported. Ctn[15-34] showed good activity against *Candida* spp. strains, and much lower toxicity to healthy eukaryotic cells, such as human kidney-2 (HK-2) cell lineage, than AMB¹³. In this follow-up study, we presented insights into the candidacidal mechanism of Ctn[15-34] using a clinical strain of *Candida albicans*, the most common yeasts found in invasive mycosis.

After the MICs (**Table 1**) from both standard and clinical *C.albicans* strains were confirmed with our previous study¹³, time killing assays were next performed to evaluate Ctn[15-34] and AMB capacities over time to prevent *C.albicans* growth on agar plates. Although both drugs could inhibit any yeast growth after 8 h of treatment, they did not reduce the number of CFUs in the same fashion (**Figure 1**), which suggested that Ctn[15-34] and AMB could have different mechanisms of action against *C.albicans*. With that in mind, the checkerboard assays were re-tested to corroborate with our earlier findings¹³ that, when used together, the peptide and AMB could potentiate the anti-fungal effect of each other. The combination of antifungal agents can play an important role in the management of candidiasis when clinical failure with standard drug dosing is observed. Our results demonstrated that Ctn[15-34] acted synergistically ($FICI \leq 0.5$) with AMB at lower concentrations than their respective MICs against *C. albicans* strains (**Table 1**). It has been shown that many natural and synthetic antimicrobial peptides act synergistically with peptide or non-peptide antibiotic¹⁵.

Additionally, these checkerboard results were demonstrated by flow cytometry. After 24 h of incubation, the remaining live cells were analyzed with PI as a viability marker and results (**Figure 2**) showed that the dye stained more cells when *C.albicans* yeasts were treated with Ctn[15-34] and AMB together than with the polyene drug alone. Although flow cytometry

methods for antimicrobial/anti-fungal susceptibility tests have not been standardized yet, they have been used for more than 20 years and their quantifiable results are equivalent to the data obtained with the CLSI methods¹⁶. Moreover, flow cytometry can provide quicker results than the traditional protocols (2-6 h compared to 24-72 h in the case of microdilution methods, for example), which can have a tremendous impact on a patient clinical outcome¹⁷. Previous publications and studies have shown that flow cytometry worked for the testing of *Candida albicans* and fluconazole, caspofugin or amphotericin B^{16,18}, and similar results were previously obtained with AMB at sub-inhibitory concentrations when incubated with acteoside, a glycoside, against an ATCC *C. albicans* strain¹⁹. Herein, this flow cytometry and the remaining assays were performed with a patient-isolated *C. albicans* strain because of the clinical importance of finding new anti-fungal agents, or combinations, in the management of systemic candidiasis when failure with standard drug therapy can be observed.

Before proceeding with further flow cytometry experiments, we turned our attentions back to Ctn[15-34]. Since AMPs, including cathelicidins, interact with the negatively charged bacterial and fungal phospholipids and induce membrane disruption²⁰, a rapid test was carried out to verify whether Ctn[15-34] alone could interact with a (phospho)lipid. In that assay, plasmatic membrane damage was roughly estimated based on the amount of product generated by phospholipase activity after treatment of 4N3OBA lipid (substrate) with Ctn[15-34]. At its MIC against *C.albicans*, but without the cells, a big increase in phospholipase activity could be noticed compared to non-treated and treated lipids at 5 μ M (**Figure 3**). The 4N3OBA lipid (substrate) is often used in studies to evaluate the enzymatic activity of fractions and substances isolated from snake venoms²¹⁻²².

After the above screening method, a FITC-labeled Ctn[15-34] at 10 μ M was then used to study the interaction of the peptide with *C.albicans* cells by flow cytometry. In this evaluation, PI was used again to monitor yeast cell membrane disruption by the peptide

(**Figure 4**). While the peptide interacted with the cells in the first 30 minutes of incubation, which was noticed by the green fluorescence associated to the yeasts, it took an hour of treatment to observe pronounced *C.albicans* membrane damage (increased cell-associated red fluorescence). This set of experiments was derived from a previous work by Freire and colleagues (2015)²³ where they used flow cytometry to examine bacterial cell permeabilization with an AMP over time.

Last but not least, *C.albicans* cell death pathway was also investigated by flow cytometry using markers for necrosis and apoptosis (**Figure 5**). Although both AMB and Ctn[15-34] promoted mostly necrosis of the remaining live cells at their respective MICs by 24 hours, the necrotic cell death caused by the peptide could be already distinguished at sub-inhibitory concentrations compared to the polyene drug. Several studies demonstrated that entry of the antimicrobial peptides in *Candida* cells resulted in accumulation of reactive oxygen species (ROS) leading to cell necrosis²⁴⁻²⁵.

In conclusion, this study shed some light on the anti-Candida activity of Ctn[15-34] with the help of flow cytometry techniques. Time killing assays showed that Ctn[15-34] could inhibit the growth of *C. albicans* after the same incubation period as AMB at their respective MICs. When peptide and the polyene drug were used together, synergism was observed. In addition, Ctn[15-34] alone promoted cell membrane disruption, like other AMPs, in yeasts. Moreover, the *C. albicans* cell death pathway detected after the peptide treatment was necrosis, which further confirmed cell membrane damage capacity by Ctn[15-34].

Acknowledgements

We are very thankful 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 to our projects.

Funding

Research work at the Institute for Marine Sciences, Federal University of Ceará, was funding by 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 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 Ceara. 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.).

Transparency Declarations

None to declare

Supplementary Data

No supplementary materials

Figure Legends

Figure 1. Time kill kinetics of *C. albicans* by Ctn[15-34] and AMB at their respective MICs. Assay was performed in triplicate and RPMI-1640 medium with 2% MOPS and incubated at 30 °C for 24 h. Samples were withdrawn at the indicated times and evaluated for colony forming units (CFUs).

Figure 2. Synergism detection after Ctn[15-34] and/or AMB treatment of *C. albicans* cells for 24 h and PI staining (A) Ctn[15-34] at 0.31 μM , (B) AMB at 0.5 μM , (C) Ctn[15-34] at 0.31 μM + AMB at 0.5 μM (Representative histograms and mean percentage values were from three independent experiments, each with 10,000 live events).

Figure 3. Phospholipase activity (Absorbance arbitrary units, mean \pm SEM with n =3) at different time points after phospholipid treatment with 0 (NT), 5 (MIC/2) and 10 (MIC) μM of Ctn[15-34].

Figure 4. FITC-Ctn[15-34]/PI fluorescence ratio (mean \pm SEM, n =3) after *C. albicans* (yeast) treatment with peptide at 10 μM for 0 (NT), 0.5, 1, 2 and 4 hours.

Figure 5. Cell death pathway detection after treatment of *C. albicans* cells with (A) AMB or (B) Ctn[15-34] at sub- and inhibitory concentrations for 12 and 24 h. Markers used for necrosis and apoptosis were 7-AAD and Annexin V PE, respectively (Representative flow cytometry scattering graphs and mean percentage values were from three independent experiments, each with 10,000 live events).

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

References

- 1 Falcao CB, de La Torre BG, Perez-Peinado C *et al.* Viperacidins: a novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers. *Amino Acids* 2014; **46**: 2561-71.
- 2 Falcao CB, Perez-Peinado C, de la Torre BG *et al.* Structural Dissection of Crotalicidin, a Rattlesnake Venom Cathelicidin, Retrieves a Fragment with Antimicrobial and Antitumor Activity. *J Med Chem* 2015; **58**: 8553-63.
- 3 Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002; **2**: 73-85.
- 4 Lewis RE. Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin Proc* 2011; **86**: 805-17.
- 5 Laniado-Laborin R, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol* 2009; **26**: 223-7.
- 6 Kim DH, Lee DG, Kim KL *et al.* Internalization of tenecin 3 by a fungal cellular process is essential for its fungicidal effect on *Candida albicans*. *Eur J Biochem* 2001; **268**: 4449-58.
- 7 Koo JC, Lee B, Young ME *et al.* Pn-AMP1, a plant defense protein, induces actin depolarization in yeasts. *Plant Cell Physiol* 2004; **45**: 1669-80.
- 8 Lee DG, Kim PI, Park Y *et al.* Design of novel peptide analogs with potent fungicidal activity, based on PMAP-23 antimicrobial peptide isolated from porcine myeloid. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **293**: 231-8.
- 9 Hashimoto S. Micafungin: a sulfated echinocandin. *J Antibiot (Tokyo)* 2009; **62**: 27-35.
- 10 Pappas PG, Rotstein CM, Betts RF *et al.* Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* 2007; **45**: 883-93.
- 11 Giuliani A, Rinaldi AC. Beyond natural antimicrobial peptides: multimeric peptides and other peptidomimetic approaches. *Cell Mol Life Sci* 2011; **68**: 2255-66.
- 12 Marcos JF, Gandia M. Antimicrobial peptides: to membranes and beyond. *Expert Opin Drug Discov* 2009; **4**: 659-71.
- 13 Cavalcante CS, Falcao CB, Fontenelle RO *et al.* Anti-fungal activity of Ctn[15-34], the C-terminal peptide fragment of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin. *J Antibiot (Tokyo)* 2016.
- 14 *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts-Third Edition: Approved Standard M27-A3*. CLSI: Wayne, PA, USA, 2008.
- 15 Zhai B, Zhou H, Yang L *et al.* Polymyxin B, in combination with fluconazole, exerts a potent fungicidal effect. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 931-8.
- 16 Mitchell M, Hudspeth M, Wright A. Flow cytometry susceptibility testing for the antifungal caspofungin. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 2586-9.
- 17 Green L, Petersen B, Steimel L *et al.* Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 1088-91.
- 18 Joung YH, Kim HR, Lee MK *et al.* Fluconazole susceptibility testing of *Candida* species by flow cytometry. *J Infect* 2007; **54**: 504-8.
- 19 Ali I, Sharma P, Suri KA *et al.* In vitro antifungal activities of amphotericin B in combination with acteoside, a phenylethanoid glycoside from *Colebrookea oppositifolia*. *J Med Microbiol* 2011; **60**: 1326-36.
- 20 Agier J, Efenberger M, Brzezinska-Blaszczyk E. Cathelicidin impact on inflammatory cells. *Cent Eur J Immunol* 2015; **40**: 225-35.
- 21 Cotrim CA, de Oliveira SC, Diz Filho EB *et al.* Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2. *Chem Biol Interact* 2011; **189**: 9-16.

- 22 Santos ML, Toyama DO, Oliveira SC *et al.* Modulation of the pharmacological activities of secretory phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* induced by naringin. *Molecules* 2011; **16**: 738-61.
- 23 Freire JM, Gaspar D, de la Torre BG *et al.* Monitoring antibacterial permeabilization in real time using time-resolved flow cytometry. *Biochim Biophys Acta* 2015; **1848**: 554-60.
- 24 Maurya IK, Pathak S, Sharma M *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**: 1732-40.
- 25 Maurya IK, Thota CK, Sharma J *et al.* Mechanism of action of novel synthetic dodecapeptides against *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 2013; **1830**: 5193-203.

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

Crotalidina/ AMB	<i>C. albicans</i> LABMIC0108			<i>C. albicans</i> LABMIC0107			<i>C. albicans</i> ATCC90028		
	CIM (μM) alone	CIM (μM) together	FICI ^a	CIM (μM) alone	CIM (μM) together	FICI ^a	CIM (μM) alone	CIM (μM) together	FICI ^a
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	

^a FICI = Fractional inhibitory concentration index

S = Sinergy

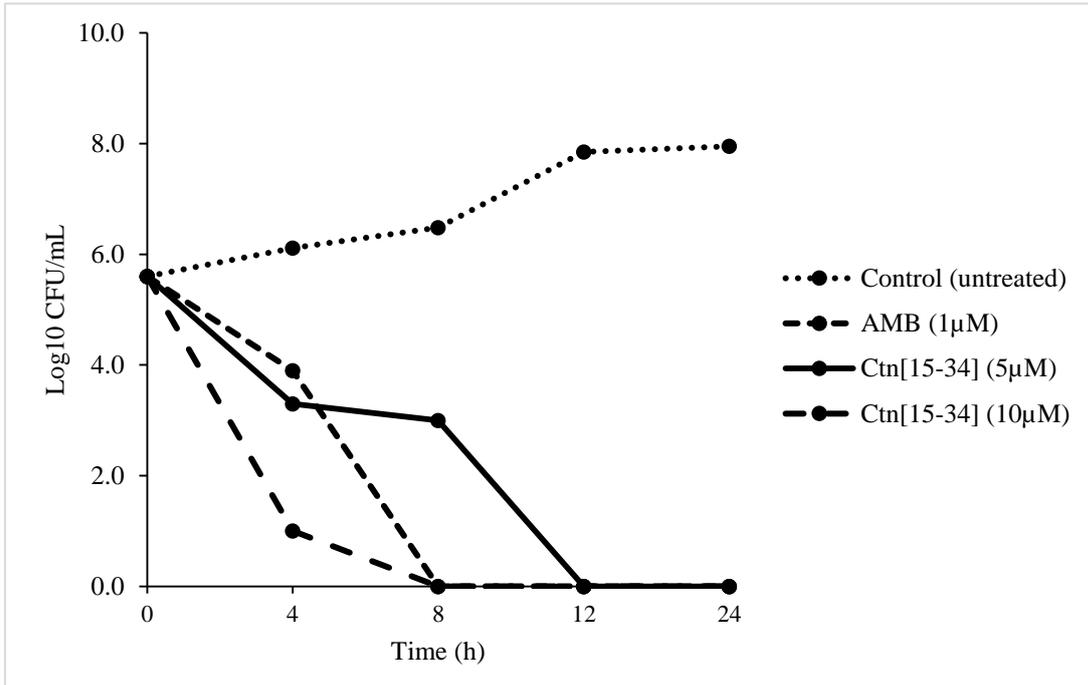


Figure 1. Time kill kinetics of *C. albicans* by Ctn[15-34] and AMB at their respective MICs. Assay was performed in triplicate and RPMI-1640 medium with 2% MOPS and incubated at 30 °C for 24 h. Samples were withdrawn at the indicated times and evaluated for colony forming units (CFUs).

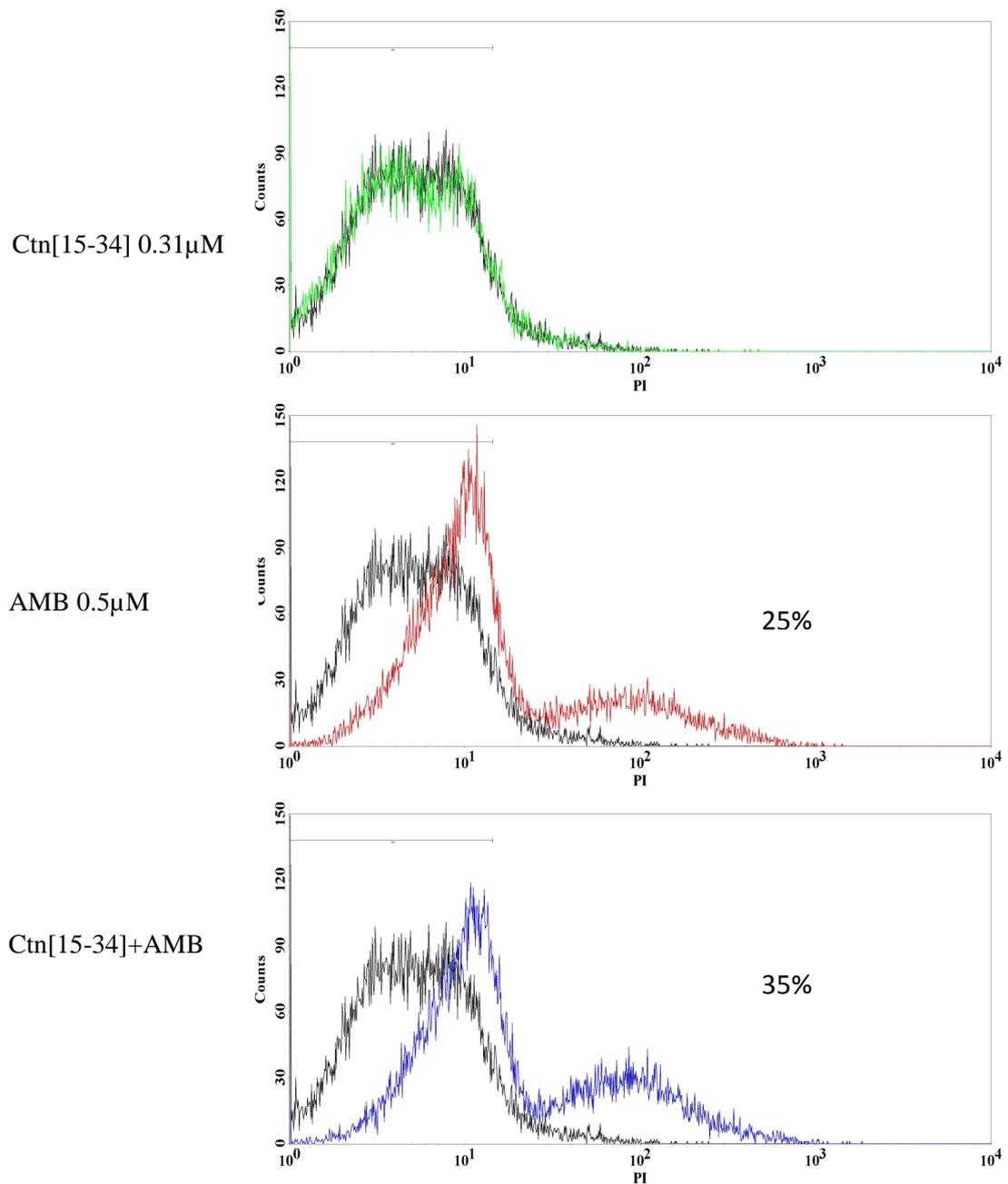


Figure 2. Synergism detection after Ctn[15-34] and/or AMB treatment of *C. albicans* cells for 24 h and PI staining (A) Ctn[15-34] at 0.31 μ M, (B) AMB at 0.5 μ M, (C) Ctn[15-34] at 0.31 μ M + AMB at 0.5 μ M (Representative histograms and mean percentage values were from three independent experiments, each with 10,000 live events).

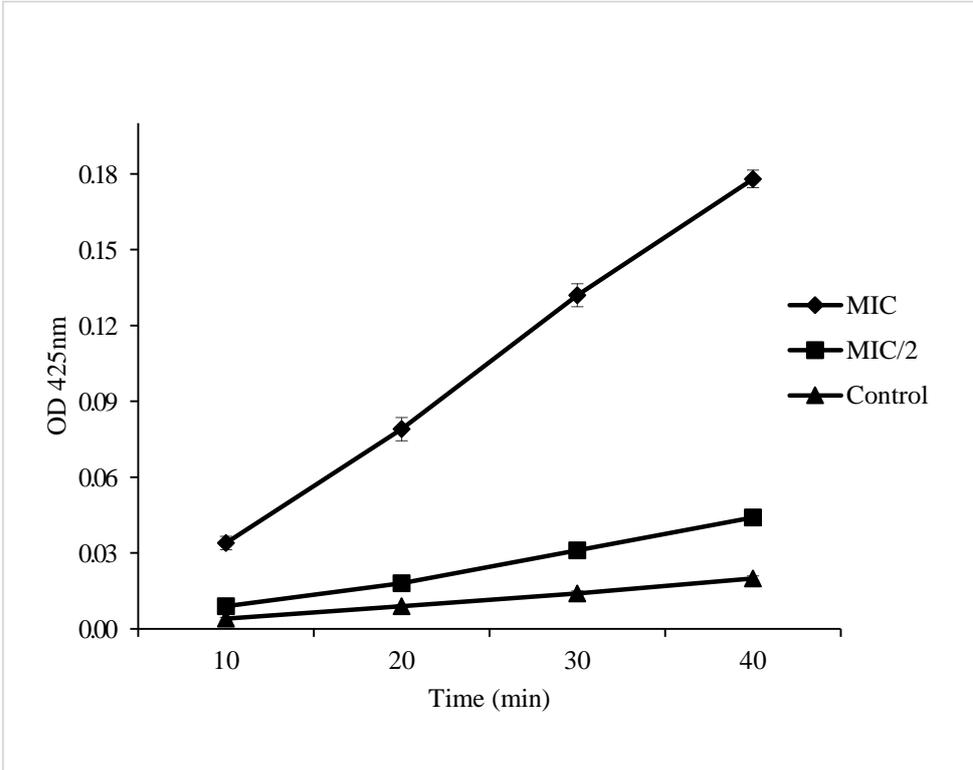


Figure 3. Phospholipase activity (Absorbance arbitrary units, mean \pm SEM with n =3) at different time points after phospholipid treatment with 0 (NT), 5 (MIC/2) and 10 (MIC) μ M of Ctn[15-34].

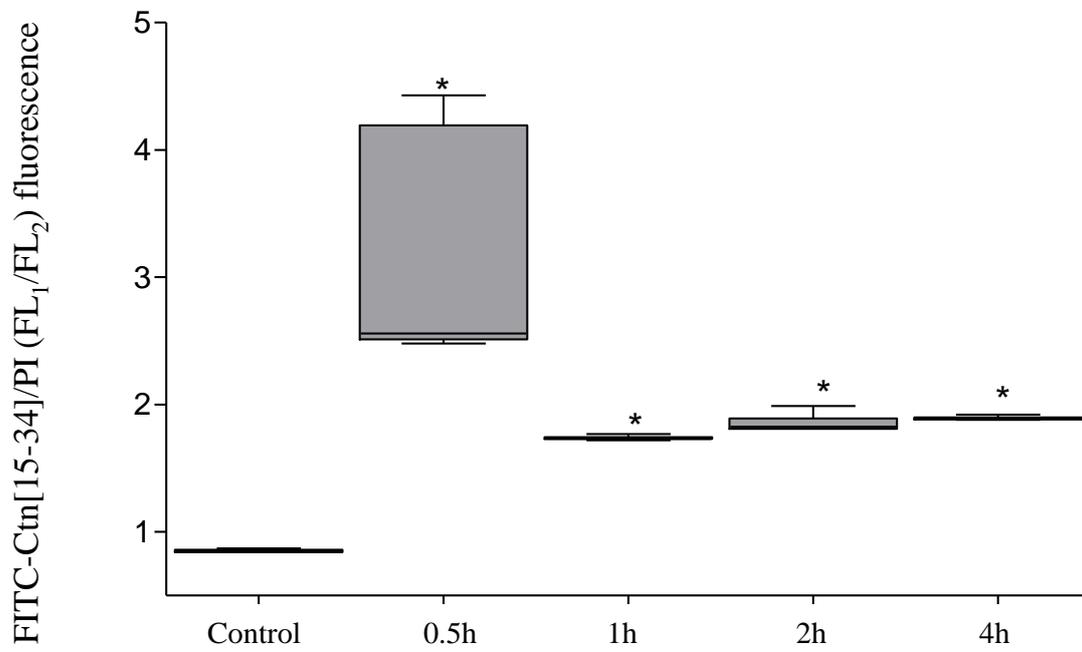


Figure 4. FITC-Ctn[15-34]/PI fluorescence ratio (mean \pm SEM, n =3) after *C.albicans* (yeast) treatment with peptide at 10 μ M for 0 (NT), 0.5, 1, 2 and 4 hours.

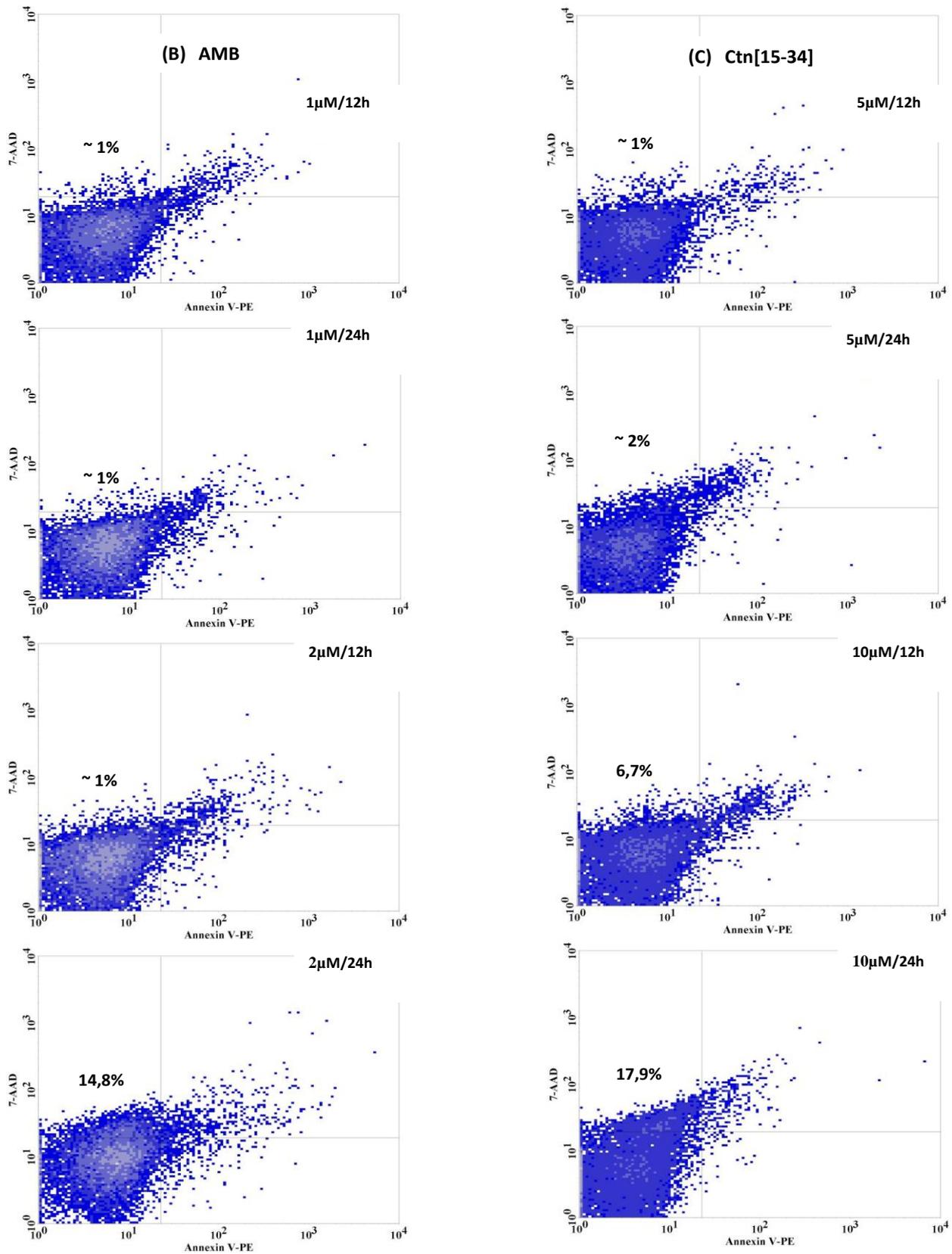


Figure 5. Cell death pathway detection after treatment of *C.albicans* cells with (A) AMB or (B) Ctn[15-34] at sub- and inhibitory concentrations for 12 and 24 h. Markers used for necrosis and apoptosis were 7-AAD and Annexin V PE, respectively (Representative flow cytometry scattering graphs and mean percentage values were from three independent experiments, each with 10,000 live events). 121

ANEXO II

Anti-fungal activity of Ctn[15–34], the C-terminal peptide fragment of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin

Atividade antifúngica do Ctn[15-34], fragment da porção C-terminal da crotalicidina, uma catelicidina de veneno de serpente

Artigo publicado no periódico *The Journal of Antibiotics*, 2016.

ORIGINAL ARTICLE

Anti-fungal activity of Ctn[15–34], the C-terminal peptide fragment of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin

Carolina Sidrim P Cavalcante^{1,2,3}, Cláudio B Falcão^{1,2}, Raquel OS Fontenelle⁴, David Andreu³ and Gandhi Rádis-Baptista^{1,2}

Crotalicidin (Ctn), a 34-residue cathelicidin from a South American rattlesnake, and its fragment (Ctn[15–34]) have shown anti-infective and cytotoxic activities against Gram-negative bacteria and certain tumor lines, respectively. The extent of such effects has been related to physicochemical characteristics such as helicity and hydrophobicity. We now report the anti-fungal activity of Ctn and its fragments (Ctn[1–14]) and (Ctn[15–34]). MIC determination and luminescent cell viability assays were used to evaluate the anti-infective activity of Ctn and its fragments (Ctn[1–14]) and (Ctn[15–34]) as anti-fungal agents against opportunistic yeast and dermatophytes. Cytotoxicity towards healthy eukaryotic cells was assessed *in vitro* with healthy human kidney-2 (HK-2) cells and erythrocytes. The checkerboard technique was performed to estimate the effects of combining either one of the peptides with amphotericin B. Ctn was the most active peptide against dermatophytes and also the most toxic to healthy eukaryotic cells. Fragments Ctn[1–14] and Ctn[15–35] lost activity against dermatophytes, but became more active against pathogenic yeasts, including several *Candida* species, both clinical isolates and standard strains, with MICs as low as 5 μM . Interestingly, the two peptide fragments were less cytotoxic to healthy HK-2 cells and less hemolytic to human erythrocytes than the standard-of-care amphotericin B. Also noteworthy was the synergy between Ctn peptides and amphotericin B, with consequent reduction in MICs of both drug and peptides. Altogether, Ctn and its fragments, particularly Ctn[15–34], are promising leads, either alone or in combined regimen with amphotericin B, for the treatment of fungal diseases.

The Journal of Antibiotics advance online publication, 23 November 2016; doi:10.1038/ja.2016.135

INTRODUCTION

Human mycoses are caused by primary pathogenic fungi that invade the tissues of a healthy host, or by opportunistic fungi that invade the tissues of individuals with severe alterations in the immune system. Dermatomycosis is one of the most frequent dermal lesions that affect humans and animals, and is often caused by dermatophytes of the genera *Epidermophyton*, *Microsporum* and *Trichophyton*. These fungi infect keratinized tissue such as skin, nails and scalp, causing lesions characterized by irritation, scaling, local redness, swelling and inflammation.^{1,2} In addition, some dermatomycoses may be associated with the presence of opportunistic yeast pathogens, including the genus *Candida*, that can quickly colonize damaged nails or skin, especially the mucous membranes.³

Candidemia and other forms of invasive candidiasis are unquestionably the most prevalent among invasive mycoses worldwide.

Candida species belong to the normal microbiota of an individual's mucosal oral cavity, gastrointestinal tract and vagina, and are responsible for various clinical manifestations from mucocutaneous overgrowth to bloodstream infections.⁴

The pathogenicity of *Candida* species is attributed to capabilities such as adherence and biofilm formation (on host tissues and on medical devices), as well as to production of tissue-damaging enzymes (proteases, phospholipases, hemolysins) and other virulence factors that allow the fungus to evade host defenses.⁵ The risk of candidiasis is increased by underlying malignancies such as immunosuppressive diseases, hematopoietic stem cell or solid organ transplantation, the use of wide-spectrum antibiotics or corticosteroids, invasive interventions, aggressive chemotherapy, parenteral nutrition alimentation and contaminated internal prosthetic devices.⁶ The situation is worsened by the rapid development of resistance against many currently used anti-fungals—e.g.,

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Ceará, Brazil; ²Laboratory of Biochemistry and Biotechnology, Institute for Marine Sciences, Federal University of Ceará, Ceará, Brazil; ³Department of Experimental and Health Sciences, Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain and ⁴Center of the Agricultural Sciences and Biological, Acaraú Valley State University, Ceará, Brazil

Correspondence: Professor D Andreu, Department of Experimental and Health Sciences, Pompeu Fabra University, Barcelona Biomedical Research Park, Dr Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain.

E-mail: david.andreu@upf.edu

or Professor G Rádis-Baptista, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Av. da Abolição, 3207, Fortaleza 60165081, Ceará, Brazil.

E-mail: gandhi.radis@ufc.br

Received 5 July 2016; revised 25 September 2016; accepted 17 October 2016

fluconazole, itraconazole and amphotericin B (AMB)—that can seriously compromise anti-fungal therapies. Therefore, the discovery and the development of new anti-fungals is a pressing, urgent need.^{7,8}

Prospective therapeutic application of anti-microbial peptides (AMPs) has received much attention recently, because of their broad spectrum of activity and reduced likelihood of inducing resistance.⁹ AMPs are gene-encoded products made by the innate immune cells of plants and animals and acting as a first line of defense against invading pathogens. Also called host defense peptides, their primary mechanism of action is the destabilization of pathogen membranes, mainly by electrostatic interaction between the cationic AMP and negatively charged cell wall/membrane components such as phospholipids, teichoic acids and lipopolysaccharides in bacteria,^{10,11} and mannoproteins or membrane-bound enzymes such as β -glucan and chitin synthases in fungi.¹² Recent studies have also pointed out that AMPs may act on intracellular targets such as nucleic acids and/or components of the protein synthesis machinery,¹³ as well as on organelles such as the mitochondria, where apoptosis can be initiated.¹⁴ Moreover, AMPs can have an important role as multi-effector immunomodulatory agents connecting innate and adaptive immunity responses. For example, in an epithelial invasion by *Candida* hyphae, AMPs such as β -defensins, alarmins and cathelicidins stimulate immune cells to secrete chemotactic proteins to recruit other immune cells to fight the pathogen. Once the pathogen is eliminated, AMPs also contribute to promote epithelial remodeling and barrier repair.^{15–17}

Cathelicidins are among the most important classes of AMPs. Found in the tissue of organisms of distinct phyla, from primitive hagfish to humans, all cathelicidins share in common a conserved N-terminal preproregion containing the signal peptide and a cathelin—cathepsin L inhibitor—domain. The anti-microbial activity is confined to a variable C-terminal domain (mature sequence) that is released by proteolysis at an inflammatory site. Distinct cathelicidin precursors generate diverse peptide sequences that can adopt different secondary structures such as α -helixes, β -hairpins, dimeric β -hairpins and linear non- α -helixes.^{18,19} The *in vitro* efficiency of cathelicidins as anti-bacterial agents has been extensively and systematically documented. In contrast, the anti-fungal activity of these peptides is less well defined, and has not yet been comparatively evaluated, although there is sufficient evidence that they should also be effective in this respect.^{20,21} Examples include the porcine protegrins and human cathelicidin hCAP18/LL-37, the only human multi-effector cathelicidin reported to date.^{22,23}

In previous studies, cathelicidin precursors from the venom glands of South American pit vipers were reported. These precursors encode mature cathelicidin-like sequences, named collectively viperidins (cathelicidins from pit vipers), that display good anti-bacterial activities, especially against Gram-negative species, as well as low cytotoxic profiles.²⁴ More recently, one of these viperidins—i.e., crotalicidin (Ctn) from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*—was structurally and functionally dissected into two fragments, termed Ctn[1–14] and Ctn[15–34]. Although Ctn[1–14] kept the α -helical structure of Ctn, it lost all anti-bacterial and anticancer activity of the parental peptide. On the other hand, largely random coil Ctn[15–34] preserved the anti-bacterial and anticancer activities of Ctn, with much lower toxicity to healthy eukaryotic cells than the full sequence.²⁵

Herein, we have continued the anti-infective evaluation of Ctn and its fragments (Ctn[1–14] and Ctn[15–34]) by assessing their anti-fungal activities on different opportunistic yeast and dermatophyte

strains. Ctn was the most active peptide against dermatophytes and also the most toxic to eukaryotic cells, while the two fragments, especially Ctn[15–34], were less toxic and more active against yeasts. When combined with a standard anti-fungal such as AMB, the doses of both Ctn[15–34] and AMB could be significantly reduced, their synergy providing a basis for an efficient and safe chemotherapy against invasive mycoses.

MATERIALS AND METHODS

Peptides

Ctn (KRFKKFFKKVKKSVKKRLKIKFKPKPMVIGVTIPF-amide) and its fragments (Ctn[1–14] (KRFKKFFKKVKKSV-amide) and Ctn[15–34] (KKRLKIKFKPKPMVIGVTIPF-amide)) were prepared by solid-phase synthesis, purified by HPLC and characterized by MS analysis, as reported previously.^{24,25} For all experiments, 1 mM peptide stock solutions were prepared by weighting and dissolving in deionized water the right amount of each peptide to give a final concentration of 1 mM. Peptide stock solutions were stored at 4 °C for up to 6 weeks. Physicochemical properties such as net charge at neutral pH, hydrophobicity and hydrophobic moment of Ctn, Ctn[1–14] and Ctn[15–34], were obtained by the 'Peptide property calculator' (<http://www.pepcalc.com>) and 'Heliquet' (<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/>) softwares.

Fungi

The yeast and dermatophyte strains used in this study were kindly donated by Santa Casa de Misericórdia Hospital at Sobral (Ceara, Brazil). Identification of yeast strains was performed with CHROMagar-Candida (CHROMagar Company, Paris, France) in a VITEK 2-automated system (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) with YST card. The dermatophyte strains were identified by their morphological characteristics and biochemical profiles. Yeast 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 phosphate-buffered saline (PBS) (phosphate 35 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4). Dermatophytes were grown on Sabouraud agar slants at 30 °C for 7 days. The fungal colonies were then covered with 3 ml of PBS and gently scraped with a sterile pipette. 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.

Anti-fungal assays

The MICs of the peptides against the fungal strains were determined by the broth microdilution method, based essentially on documents M27-A3²⁶ and M38-A2²⁷ for yeasts and dermatophytes, respectively, from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Determination of these MICs for all fungal strains was carried out in 96-well microtiter plates (E & K Scientific, Santa Clara, CA, USA). The peptide stock solutions (at 1 mM) were prepared as above and used to make twofold serial dilutions with RPMI-1640 medium to a final volume of 100 μ l per well. Subsequently, 100 μ l of fungal suspension, containing 2×10^6 CFU ml^{-1} (equivalent to 0.5 in the McFarland's scale), in RPMI were added to each well. Final peptide concentrations ranged from 0.0195 to 40 μM . AMB and ketoconazole (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) were used as controls for yeasts and dermatophytes, respectively. MIC was defined as the lowest peptide concentration at which no fungal growth was visually observed after 48 h at 30 °C for yeasts and after 5 days at room temperature for dermatophytes.

Microbial cell viability assays

After MIC determination, Ctn, Ctn[1–14], Ctn[15–34] and AMB were incubated again with the yeast strains (*Cryptococcus laurentii* and *Candida* spp.). The yeast suspensions (100 μ l) containing 2×10^6 CFU ml^{-1} were added to 100 μ l of peptide dilutions in 96-well microtiter plates, with final peptide and AMB concentrations in the 2.5–40 and 0.06–1 μM range, respectively. After 48 h incubation at 30 °C, 100 μ l of BacTiter-Glo (Promega, Madison, WI, USA) was added to each well and plates were reincubated for 15 min at room temperature with gentle shaking. Luminescence was then measured in a Synergy HT

Table 1 Structural characteristics and physicochemical properties of Ctn and amino- and carboxyl-terminal fragments

Peptides ^a	Size	Experimental MW ^b	Secondary structure ^c	Hydrophobicity (H) ^d	Hydrophobic moment (μ_H) ^d	Net charge ^e
Ctn	34-mer	4151.41	α -helical	0.263	0.440	+16
Ctn[1-14]	14-mer	1797.30	α -helical	-0.012	0.763	+9
Ctn[15-34]	20-mer	2371.10	Unstructured	0.455	0.311	+8

Abbreviations: Ctn, crotalictidin; MW, molecular weight.

^aC-terminal amidated peptides.

^bMW as determined by LC-MS.

^cPDB Data Bank accession code 2MWT; Ctn is α -helical at the N terminus and unstructured at the C terminus.

^dCalculated with the 'Heliquest' software (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>).

^eAt neutral pH, calculated with the 'Peptide property calculator' software (<http://pepcalc.com>).

(BioTek, Winooski, VT, USA) multidetection microplate reader. Untreated yeast suspensions were used as positive controls and wells containing only RPMI-1640 medium were used to obtain background luminescence values. The assays were carried out in triplicate.

Cell culture

The healthy human kidney-2 (HK-2) cell lineage was obtained from the Cancer Cell Line Repository of the Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM) at the Barcelona Biomedical Research Park (Barcelona, Spain). Cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with fetal bovine serum 10%, penicillin/streptomycin 1%, L-glutamine 1% and ITS-G (insulin-transferin-selenium) 0.5% solutions, and maintained in T-75 cm² flasks at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Cells were subcultured every time they reached 80–90% confluence after being harvested with a solution of trypsin 0.25% and EDTA 2.21 mM.

Evaluation of potential peptide nephrotoxicity

HK-2 cells (5 × 10³ per well) were seeded in 96-well plates. After 24 h incubation at 37 °C and 5% CO₂, the medium was removed and new medium containing fetal bovine serum 2% and either peptides or AMB in twofold serial dilutions (0.39–400 μ M) was added. After an additional 30 min incubation, 15 μ l of Cell Titer Blue (Promega) were added to each well and plates were reincubated for 24 h. Fluorescence intensity was then measured at λ_{em} = 590 and λ_{ex} = 530 nm in a Synergy HT (BioTek) reader. Relative HK-2 cell viability was calculated with cells treated with only RPMI-1640 containing 2% fetal bovine serum as controls, and the assays were carried out in triplicate.

Hemolytic activity

Fresh blood (10 ml) was collected in EDTA tubes and centrifuged at 1000 g for 10 min at 4 °C. After plasma removal, the pellet containing red blood cells was washed five times with PBS and resuspended in PBS to obtain an 8% (v v⁻¹) suspension. One hundred microliters of aliquots of this suspension were added to different microcentrifuge tubes, each containing 100 μ l of twofold serially diluted peptides or AMB, ranging from 0.2 to 200 μ M. The final concentrations were as follows: erythrocyte (red blood cell) suspension 4% (v v⁻¹) and 0.1–100 μ M of peptides or AMB. These resulting suspensions were incubated with agitation for 1 h at 37 °C. After incubation, samples were centrifuged for 2 min at 1000 g. Supernatants were transferred to 96-well plates and hemoglobin release was measured at 540 nm in a Synergy HT (Biotek) reader. Triton X-100 1% and untreated red blood cells 4% (v v⁻¹) in PBS were used as positive and negative controls, respectively. Percentage hemolysis was calculated as ((OD_{540 nm} (treated) – OD_{540 nm} (untreated)) / (OD_{540 nm} (Triton X-100-treated) – Abs_{540nm} (untreated))) × 100, and experiments were carried out in triplicate.

Checkerboard assays

The anti-fungal activity of Ctn, Ctn[1-14] and Ctn[15-34] peptides 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 microtiter plates, 50 μ l of fungal suspensions (with 2 × 10⁶ CFU ml⁻¹ ≈ 0.5 in the McFarland's scale) in RPMI medium were added to wells containing twofold serial dilutions of one of the

peptides and AMB in the same final concentration ranges (0.0195–40 μ M peptides, 0.0312–16 μ M AMB) as previously used for the MIC determination. Cells treated with either peptides 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 peptides (Ctn or Ctn [1-14] or Ctn[15-34]) and 'A' AMB. FIC^P, in turn, was calculated as the MIC^P (combined)/MIC^P (alone) ratio, whereas FIC^A was calculated as the MIC^A (combined)/MIC^A (alone) ratio. Drug interaction was classified as synergism if FICI ≤ 0.5; no interaction when 0.5 < FICI ≤ 4.0; and antagonism if FICI > 4.0.^{28,29}

RESULTS AND DISCUSSION

Ctn, Ctn[1-14] and Ctn[15-34] peptides

Ctn and its fragments (Ctn[1-14] and Ctn[15-34])^{24,25} were obtained by solid-phase synthesis in high purity (>95% by HPLC) and with the expected molecular weights as determined by LC-MS and summarized in Table 1. Some physicochemical properties, such as their secondary structures, hydrophobicities, hydrophobic moments and net charge (at neutral pH) are also listed in Table 1, which will be useful for later insights on structure–activity relationships.

Anti-fungal activity

The *in vitro* anti-fungal activities of Ctn and its fragments (Ctn[1-14] and Ctn[15-34]) against standard and clinical isolates of yeasts and dermatophytes were determined as MIC values (Table 2). As to controls, AMB showed MIC values ranging from 0.5 to 2 μ M (0.265–1.85 μ g ml⁻¹) for yeasts and ketoconazole from 0.25 to 0.5 μ M (0.133–0.265 μ g ml⁻¹) for dermatophytes.

Ctn showed differing activities towards the various fungal types. On the one hand, it was the only peptide with significant MIC values for the three dermatophyte strains, in the low micromolar range (1.25 μ M against *Microsporium canis* and 5 μ M against both *Trichophyton rubrum* strains). On the other hand, it needed higher concentrations (from 10 to above 40 μ M, the highest concentration tested) to inhibit yeast growth. For their part, fragments Ctn[1-14] and Ctn[15-34] differed substantially from Ctn in anti-fungal activities. Thus, while both fragments were basically inactive against dermatophytes, toward yeasts they had, in general, better MIC values compared with the parental peptide. In particular, Ctn[15-34], with MICs ranging mostly from 5 to 10 μ M (11.85–23.7 μ g ml⁻¹), was the best-performing peptide against yeasts, with MIC values only slightly higher (2.5-fold, on a molar basis) compared with the AMB control against clinically isolated strains of *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*.

As previously found for bacteria^{24,25} (also see Table 1), it appears that the full-sized (MW = 4151) and highly charged (+16) Ctn can interact better with the cell wall and membranes of dermatophytes than with those of yeasts. In contrast, the highly α -helical Ctn[1-14],

Table 2 MICs of Ctn, Ctn[1–14] and Ctn[15–34] against standard strains and clinical isolates of yeasts and dermatophytes

Fungal strains	Source/comments ^a	MIC in μM ($\mu\text{g ml}^{-1}$) ^b		
		Ctn[1–14]	Ctn[15–34]	Ctn
Yeasts				
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	Culture collection	>40 (> 71.9)	40 (94.8)	>40 (> 166)
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	Culture collection	40 (71.9)	5 (11.85)	40 (166)
<i>Candida tropicalis</i> LABMIC 0109	Clinical isolate	20 (35.95)	10 (23.7)	40 (166)
<i>Candida albicans</i> LABMIC 0107	Clinical isolate	20 (35.95)	10 (23.7)	40 (166)
<i>Candida albicans</i> LABMIC 0108	Clinical isolate	40 (71.9)	10 (23.7)	40 (166)
<i>Candida parapsilosis</i> LABMIC 0113	Hemoculture	20 (35.95)	5 (11.85)	2.5 (10.38)
<i>Candida tropicalis</i> LABMIC 0112	Hemoculture	10 (17.98)	5 (11.85)	10 (41.5)
<i>Candida albicans</i> LABMIC 0101	Hemoculture	10 (17.98)	10 (23.7)	20 (83)
<i>Candida albicans</i> LABMIC 0102	Hemoculture	10 (17.98)	10 (23.7)	40 (166)
<i>Candida albicans</i> LABMIC 0103	Urine	10 (17.98)	10 (23.7)	40 (166)
<i>Cryptococcus laurentii</i> LABMIC 0404	Endotracheal aspirate	20 (35.95)	5 (11.85)	20 (83)
Dermatophytes				
<i>Microsporum canis</i> LABMIC 0401	Clinical isolate	10 (17.98)	>40 (> 94.8)	1.25 (5.18)
<i>Trichophyton rubrum</i> LABMIC 0203	Clinical isolate	>40 (> 71.9)	>40 (> 94.8)	5 (20.75)
<i>Trichophyton rubrum</i> LABMIC 0204	Clinical isolate	>40 (> 71.9)	>40 (> 94.8)	5 (20.75)

Abbreviation: Ctn, crotalidicin.

^aMICs of amphotericin B against pathogenic yeasts ranged from 0.5 to 2 μM (0.265–1.85 $\mu\text{g ml}^{-1}$); MICs of ketoconazole against dermatophytes ranged from 0.25 to 0.5 μM (0.133–0.265 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

over 50% shorter (MW = 1797) and with about half the net charge (+9) of Ctn, while practically inert against dermatophytes, performed better against yeasts. For its part, the mid-size (MW = 2371), mainly unstructured Ctn[15–34]²⁵ was the peptide targeting more efficiently yeast membranes, cell wall and/or—in the case of *C. laurentii*—the glycoprotein capsule.

It is worth noting that, despite a net charge (+8) similar to Ctn[1–14], Ctn[15–34] has the highest hydrophobicity ($H=0.455$) and the lowest hydrophobic moment ($\mu_H=0.311$) among all three peptides. Other factors, in addition to secondary structures (α -helix or random coil) and/or physicochemical properties, that may account for the different peptide anti-infective activities against fungal strains may be the various fungal morphologies, as observed for small drugs.³⁰ In this study, the growth conditions used gave rise to diverse dermatophyte forms, such as macroconidia, microconidia and hyphae, yeasts forms comprising blastoconidia and pseudohyphae. Although most infections by filamentous fungi are characterized by the presence of hyphal elements in tissue, arthroconidia, a type of fungal asexual spore produced by segmentation of fungal hyphae, constitute the primary transmission mode of dermatophyte infections in humans and animals.³¹ Several studies suggest that the difference in susceptibility between microconidia (small single-celled spore) and arthroconidia depends on the drug and on the strain, and may be one of the causes of therapeutic failure.³² *Candida* is able to undergo morphological switching between a yeast and a hyphal form, and the diverse virulence factors that promote *Candida albicans* pathogenicity are also linked to hypha formation.³³ Several unique hyphal proteins such as hyphal wall protein 1 and agglutinin-like sequence 3 have been identified as virulence attributes by promoting epithelial attachment and invasion,³⁴ which can also be targeted by the peptides.

As the most prevalent invasive (or systemic) mycoses are caused by yeasts, especially by *Candida* spp.,³⁵ we focused our remaining studies on these clinically important strains. The anti-fungal activity of Ctn, Ctn[1–14] and Ctn[15–34] was further investigated against selected pathogenic yeast strains by evaluating cell viability with approximately

the same concentration ranges used for MIC determinations. Yeast cell viability was determined by a metabolic assay using ATP from viable yeasts to release light with the use of the enzyme luciferase and its substrate luciferin. In this sensitive assay, the luminescent signal recorded is proportional to the amount of ATP present, which accordingly corresponds to the number of viable cells in culture. Results are presented in Figure 1 as relative viability (in percentage) with non-treated yeasts as controls ($\approx 100\%$ viability).

After 48 h, all yeast strains treated with either one of the peptides or AMB at concentrations below their respective MIC values (subinhibitory concentrations) overall kept their viabilities close to untreated cells, except *C. krusei* with AMB. Once the observed MICs of the drug (peptide or AMB) were reached for each strain, yeast viabilities dropped sharply to $\leq 1\%$.

AMB is a crucial agent in the management of serious systemic fungal infections. In spite of its proven track record, its well-known side effects and toxicity will sometimes require discontinuation of therapy despite a life-threatening systemic fungal infection.³⁶ Therefore, there is a persistent need to find valuable drug candidates that can match the efficacy of AMB without its deleterious toxic effects. The finding that Ctn, Ctn[1–14] and Ctn[15–34], hitherto untested against yeasts, were effective anti-fungal agents led us to investigate their cytotoxicity toward eukaryotic cells.

Comparative toxicity of Ctn, Ctn[1–14], Ctn[15–34] and AMB

To evaluate possible toxic effects of Ctn, Ctn[1–14] and Ctn[15–34] with healthy eukaryotic cells and compare them with AMB, we carried out two different assays. First, potential nephrotoxicity was assessed *in vitro* by measuring the human kidney (HK-2) cell viability after treatment for 24 h with either one of the peptides or AMB at increasing concentrations. Percentage relative viability results are presented in Figure 2.

As shown in Figure 2, the known nephrotoxicity of AMB³⁷ was evident in that as low as 12.5 μM of the polyene drug (~ 1 log above most of the MICs against tested yeasts) killed 50% of HK-2 cells. For

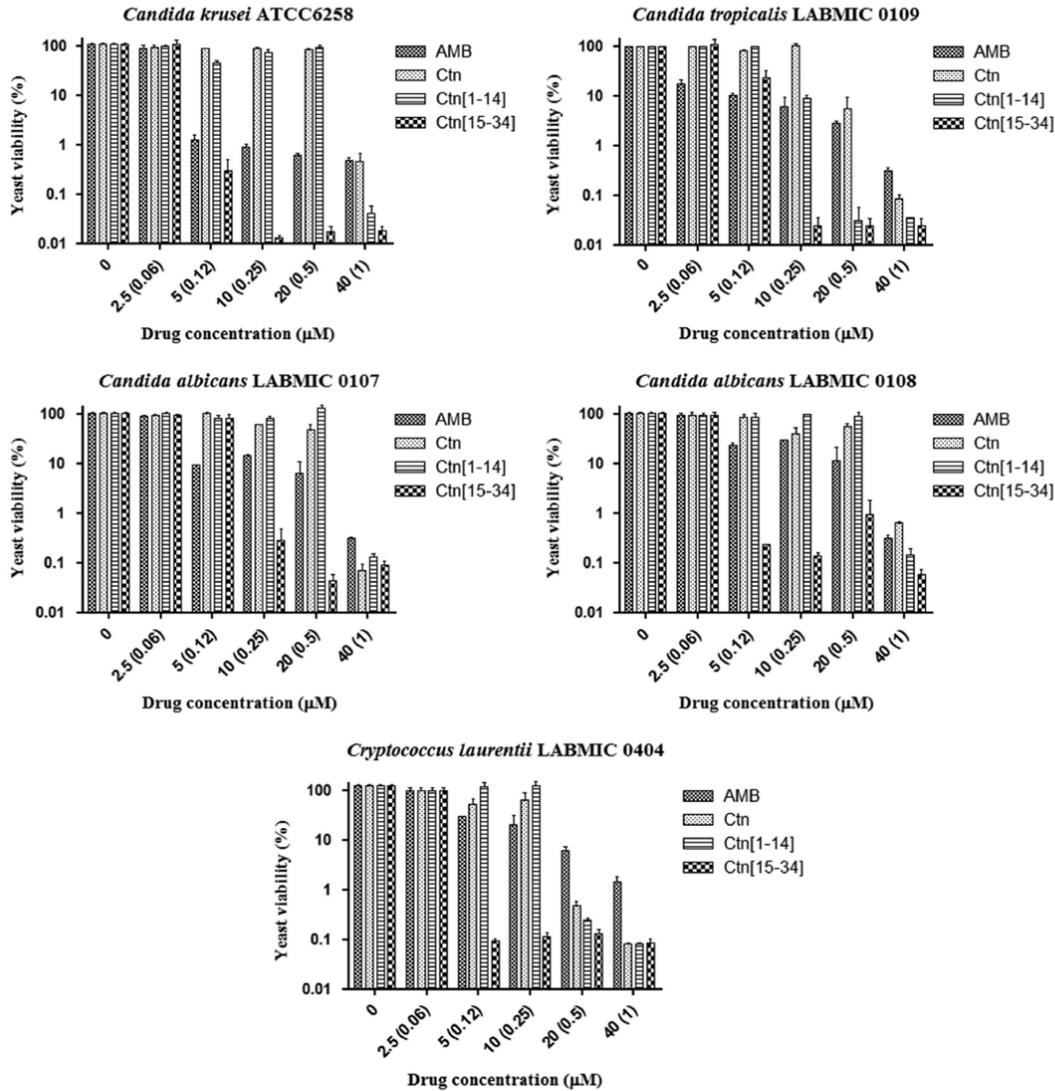


Figure 1 Relative viability of some yeast strains after treatment with peptides or amphotericin B (AMB) at increasing concentrations. Numbers within parentheses are AMB concentrations.

their part, Ctn and its fragments (Ctn[1–14] and Ctn[15–34]) displayed kidney cell cytotoxic activities different from each other and from AMB. Ctn, the most toxic peptide, had higher cytotoxicity than AMB ($IC_{50} \sim 3.12 \mu M$), in tune with its previously observed low selectivity between pathogens and healthy eukaryotic cells.²⁵ In contrast, Ctn[1–14] and Ctn[15–34] were less toxic to kidney cells compared with either the parental Ctn or AMB, with IC_{50} values at 400 and 50 μM , respectively.

In a complementary cytotoxicity assay with healthy human kidney cells, shown in Figure 3, the hemolysis profiles of the peptides

and AMB were compared using absorbance values from released hemoglobin as readout. As Figure 3 shows, at 1.5 μM , roughly the MIC against most tested strains, AMB already caused substantial (20%) hemolysis. At 12.5 μM , large-scale (70%) hemolysis was observed, in tune with other reports.^{38,39} Again, Ctn and its fragments (Ctn[1–14] and Ctn[15–34]) had differing profiles. Thus, Ctn at 1.5 μM was comparable to AMB (20% hemolysis) but no further increase was observed at concentrations up to two orders of magnitude higher. Ctn [1–14] became hemolytic only above 50 μM , whereas Ctn[15–34], even at 100 μM , was inert on red blood cells. Thus, despite its slightly

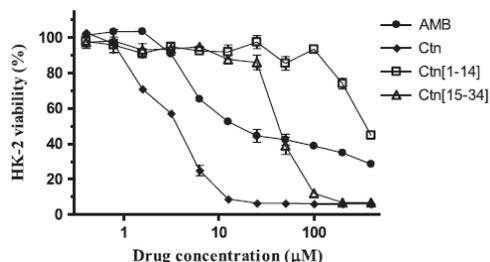


Figure 2 Relative human kidney-2 (HK-2) cell viability after 24 h treatment with crotalacidin (Ctn), peptide fragments Ctn[1-14] and Ctn[15-34] and amphotericin B (AMB).

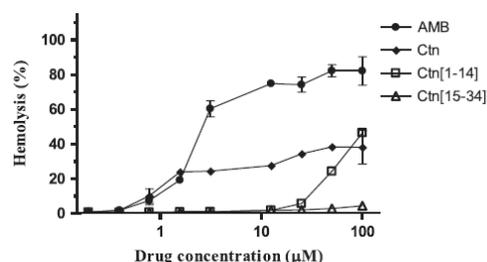


Figure 3 Percentage hemolysis after 1 h of treatment with crotalacidin (Ctn), peptide fragments Ctn[1-14] and Ctn[15-34] and amphotericin B (AMB) at increasing concentrations.

higher MICs (between 5 and 10 µM) against yeast strains (Table 2), Ctn[15-34] has a better selectivity window than AMB. Ctn[15-34] is also more selective against yeasts compared with other cathelicidins such as the human cathelicidin hCAP18/LL-37, whose reported MICs against some *Candida albicans* strains (15–20 µM)^{8,12} were shown to be toxic to healthy eukaryotic cells.^{19,22}

Ctn, Ctn[1-14] and Ctn[15-34] show synergy with AMB against clinical strains of *Candida albicans*

As the pharmacotherapy of patients critically ill with invasive mycosis is mainly based on combining two or more anti-fungal drugs,⁴⁰ we have also investigated the *in vitro* effects of combining one of the peptides with AMB at the concentration ranges used in the MIC determination. Results of these combined therapies against two clinically isolated *Candida albicans* strains, the most prevalent yeasts in invasive mycosis,²³ were obtained by the checkerboard technique (Table 3).

Table 3 shows and confirms the initially found MICs of the drugs used alone with these strains (Table 2). When associated with AMB, a general decrease in the MICs of both drugs in all combinations was observed, with at least 4- and 64-fold reductions in the MICs of AMB and peptides, respectively. Calculated FIC indexes were around 0.25 and 0.26, well below the ≤0.50 thresholds for an association to be considered as synergistic. This potentiation of anti-yeast activity by association with AMB was particularly important for the most active peptide Ctn[15-34] and also, to a slightly minor extent, for Ctn[1-14] and Ctn. Therefore, association of either of the peptides with AMB can become a very useful chemotherapeutical approach against invasive yeast infections, inasmuch as the AMB effective dose, hence toxicity and other side effects, may be substantially reduced. This alternative is

Table 3 MICs of the crotalacidin peptides and AMB either alone or combined against clinically isolated strains of *Candida albicans*

Crotalacidin derived/drug	<i>C. albicans</i> LABMIC 0108			<i>C. albicans</i> LABMIC 0107		
	MIC (µM) alone	MIC (µM) combined	FICI	MIC (µM) alone	MIC (µM) combined	FICI
Ctn[1-14]	40	0.007	0.25 (S)	20	0.31	0.26 (S)
AMB	2	0.5		2	0.5	
Ctn[15-34]	20	0.31	0.26 (S)	20	0.31	0.26 (S)
AMB	2	0.5		2	0.5	
Ctn	20	0.31	0.26 (S)	20	0.31	0.26 (S)
AMB	2	0.5		2	0.5	

Abbreviations: AMB, amphotericin B; Ctn, crotalacidin; FICI, fractional inhibitory concentration index; S, synergism.

particularly promising for Ctn[15-34], whose remarkable serum stability (770 min half-life)²⁵ is likely to make association with AMB therapeutically rather promising *in vivo*.

In conclusion, the anti-fungal activity of Ctn and its fragments (Ctn[1-14] and Ctn[15-34]) completes the already reported anti-bacterial and anticancer profiles of these peptides. Ctn shows once more a limited therapeutic potential because of its low selectivity. Ctn[1-14], for its part, is inactive against bacteria and cancer cells but has an intermediate anti-yeast activity. The relatively modest performances of both Ctn and Ctn[1-14] can be improved towards *C. albicans* when associated with AMB. Still, the only Ctn-derived peptide emerging as truly promising from our analysis is Ctn[15-34]. Its anti-yeast activity, slightly lower than AMB, is more than compensated by its much lower kidney cell cytotoxicity and practically nil hemolytic activity relative to the polyene antibiotic. In addition, its long half-life in serum and its powerful synergy with AMB make Ctn [15-34] a most valuable candidate for further development as an anti-fungal therapeutic peptide lead, particularly against yeast infections where it could be usefully applied either alone or in combination with a standard antibiotic such as AMB.

CONFLICT OF INTEREST

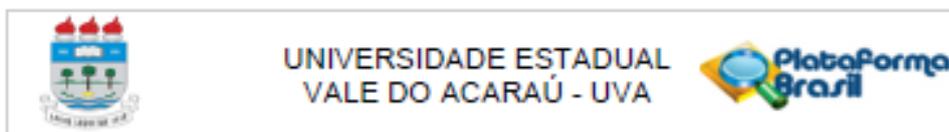
The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Research work at the Institute for Marine Sciences, Federal University of Ceará, was funded by the Program on Toxinology (Issue 2010). We are very thankful to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the Ministry of Education (ME) of the Federal Government of Brazil and the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (Proc. 310845/2012-2 and Proc 247970/2013-1), the Ministry of Science, Technology and Innovation (MCTI) for their constant endorsement and financial support to our projects. CBF 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. CSPC 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 DA).

- 1 Gupta, A. K. & Cooper, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. *Mycopathologia* **166**, 353–367 (2008).
- 2 Patel, G. A. & Schwartz, R. A. Tinea capitis: still an unsolved problem? *Mycoses* **54**, 183–188 (2011).
- 3 Eggimann, P., Garbino, J. & Pittet, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect. Dis.* **3**, 685–702 (2003).
- 4 Eggimann, P., Garbino, J. & Pittet, D. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet Infect. Dis.* **3**, 772–785 (2003).
- 5 Silva, S. et al. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol.* **19**, 241–247 (2011).
- 6 Yapar, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther. Clin. Risk Manag.* **10**, 95–105 (2014).
- 7 van der Warden, N. L., Bleackley, M. R. & Anderson, M. A. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 3545–3570 (2013).
- 8 Mehra, T. et al. Alternative approaches to antifungal therapies. *Exp. Dermatol.* **21**, 778–782 (2012).
- 9 Reddy, P. A. et al. Synthesis of hemopressin peptides by classical solution phase fragment condensation. *Int. J. Pept.* **2012**, 186034 (2012).
- 10 Hancock, R. E. & Sahl, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1551–1557 (2006).
- 11 Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389–395 (2002).
- 12 Matejuk, A. et al. Peptide-based antifungal therapies against emerging infections. *Drugs Fut.* **35**, 197 (2010).
- 13 Li, Y. et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* **37**, 207–215 (2012).
- 14 Barlow, P. G. et al. The human cathelicidin LL-37 preferentially promotes apoptosis of infected airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **43**, 692–702 (2010).
- 15 Tomalka, J. et al. Beta-defensin 1 plays a role in acute mucosal defense against *Candida albicans*. *J. Immunol.* **194**, 1788–1795 (2015).
- 16 Yano, J., Noverr, M. C. & Fidel, P. L. Jr. Cytokines in the host response to *Candida vaginitis*: Identifying a role for non-classical immune mediators, S100 alarmins. *Cytokine* **58**, 118–128 (2012).
- 17 Kovach, M. A. et al. Cathelicidin-related antimicrobial peptide is required for effective lung mucosal immunity in Gram-negative bacterial pneumonia. *J. Immune* **189**, 304–311 (2012).
- 18 Tomasinsig, L. & Zanetti, M. The cathelicidins—structure, function and evolution. *Curr. Protein Pept. Sci.* **6**, 23–34 (2005).
- 19 Bals, R. & Wilson, J. M. Cathelicidins—a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 711–720 (2003).
- 20 Lopez-Garcia, B. et al. Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in *Candida albicans* skin infection. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 108–115 (2005).
- 21 Benincasa, M. et al. Fungicidal activity of five cathelicidin peptides against clinically isolated yeasts. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 950–959 (2006).
- 22 Durr, U. H., Sudheendra, U. S. & Ramamoorthy, A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 1408–1425 (2006).
- 23 Tsai, P. W. et al. Responses of *Candida albicans* to the human antimicrobial peptide LL-37. *J. Microbiol.* **52**, 581–589 (2014).
- 24 Falcao, C. B. et al. Viperidins: a novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers. *Amino Acids* **46**, 2561–2571 (2014).
- 25 Falcao, C. B. et al. Structural dissection of crotalicidin, a rattlesnake venom cathelicidin, retrieves a fragment with antimicrobial and antitumor activity. *J. Med. Chem.* **58**, 8553–8563 (2015).
- 26 CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; approved standard third edition. CLSI document M27-A3.* (Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008).
- 27 CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; approved standard-second edition: CLSI document M38-A2.* (Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008).
- 28 Odds, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 1 (2003).
- 29 Johnson, M. D. et al. Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 693–715 (2004).
- 30 Kohler, L. M. et al. *In vitro* susceptibility of isolates of *Sporothrix schenckii* to amphotericin B, itraconazole, and terbinafine: comparison of yeast and mycelial forms. *Can. J. Microbiol.* **52**, 843–847 (2006).
- 31 Achterman, R. R. & White, T. C. Dermatophyte virulence factors: identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections. *Int. J. Microbiol.* **2012**, 358305 (2012).
- 32 Coelho, L. M. et al. *In vitro* antifungal drug susceptibilities of dermatophytes microconidia and arthroconidia. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 758–761 (2008).
- 33 Naglik, J. R., Richardson, J. P. & Moyes, D. L. *Candida albicans* pathogenicity and epithelial immunity. *PLoS Pathog.* **10**, e1004257 (2014).
- 34 Zhu, W. & Filler, S. G. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiol.* **12**, 273–282 (2010).
- 35 Sardi, J. C. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J. Med. Microbiol.* **62**, 10–24 (2013).
- 36 Laniado-Laborin, R. & Cabrales-Vargas, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev. Iberoam. Micol.* **26**, 223–227 (2009).
- 37 Chai, L. Y. et al. An elevated pro-inflammatory cytokine response is linked to development of amphotericin B-induced nephrotoxicity. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 1655–1659 (2013).
- 38 Serrano, D. R. et al. Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. *Int. J. Pharm.* **447**, 38–46 (2013).
- 39 Larabi, M. et al. Study of the toxicity of a new lipid complex formulation of amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 81–88 (2004).
- 40 Enoch, D. A., Ludlum, H. A. & Brown, N. M. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J. Med. Microbiol.* **55**, 809–818 (2006).

ANEXO III



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Isolamento, Identificação e fatores de risco de aquisição de fungos causadores de micoses sistêmicas em um hospital de ensino da Zona Norte do Ceará.

Pesquisador: Camila Gomes Virgíno Coelho

Área Temática:

Versão:

CAAE: 30192714.6.0000.5053

Instituição Proponente: Santa Casa de Misericórdia de Sobral

Patrocinador Principal: Santa Casa de Misericórdia de Sobral

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 644.365

Data da Relatoria: 23/04/2014

Apresentação do Projeto:

Pesquisa Institucional, tendo como proponente a Santa Casa de Misericórdia de Sobral. Trata-se de um estudo em que participarão todos os pacientes internados na Santa Casa de Misericórdia de Sobral (nos setores de Neurologia, Clínica Médica, Maternidade, UTI adulta, UTI pediátrica, Infectologia, Ala de alta complexidade da Emergência Adulta, Pediatria, Oncologia, Nefrologia, Cirurgia) cuja amostra (sangue, urina, aspirado traqueal, líquido, líquido pleural, biópsia de órgãos internos, cateteres de hemodiálise, etc) for positiva para fungos por cultura fúngica e/ou exame direto, e que aceitarem a participar da pesquisa por meio da assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido.

Objetivo da Pesquisa:

Estudo com o objetivo principal de averiguar a prevalência de micose sistêmica em pacientes internados na Santa Casa de Misericórdia de Sobral (SCMS).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto apresenta riscos mínimos e como benefícios a contribuição científica para o diagnóstico e detecção de fatores de risco para micoses sistêmicas na região Norte do Estado do Ceará.

Endereço: Av Comandante Neucélio Rocha Ponte, 150
Bairro: Derby CEP: 62.041-040
UF: CE Município: SOBRAL
Telefone: (88)3677-4255 Fax: (88)3677-4242 E-mail: uva_comitedeetica@hotmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARAÚ - UVA



Continuação do Parecer: 644.305

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Bem escrita, bem embasada teoricamente, apresenta todos os itens necessários e mostra ser relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo de pesquisa apresentou os Termos de apresentação obrigatória adequadamente: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Consentimento pós-informado; Carta de anuência da Instituição em que a pesquisa será realizada e Instrumentos para coleta de informações.

Recomendações:

O relatório final deverá ser enviado utilizando-se do botão -Notificações-, no Item - Enviar Notificação-. Guia disponível no menu - Ajuda-, Guia De Orientação Para Inserção De Notificação De Evento.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto não apresenta pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Após devida análise do projeto de pesquisa o Colegiado do CEP considerou APROVADO.

SOBRAL, 12 de Maio de 2014

Assinador por:
CIBELLY ALINY SIQUEIRA LIMA FREITAS
(Coordenador)

Endereço: Av Comandante Maurocêlio Rocha Ponte, 150
Bairro: Derby CEP: 62.041-040
UF: CE Município: SOBRAL
Telefone: (88)3677-4255 Fax: (88)3677-4242 E-mail: uva_comitedeetica@hotmail.com

Página 02 de 02