

XU Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica

28^o

Encontro de Iniciação Científica da UENF

20^o

Circuito de Iniciação Científica do IFFluminense

16^a

Jornada de Iniciação Científica da UFF



U III Congresso Fluminense de Pós-Graduação

23^a

Mostra de Pós-Graduação da UENF

8^a

Mostra de Pós-Graduação do IFFluminense

8^a

Mostra de Pós-Graduação da UFF

Peptídeo desenhado WR é internalizado pelas células de *Candida albicans* e ion K⁺ causa reversão da morte celular

Filipe Zaniratti Damica, Douglas Ribeiro Lucas, Estefany Braz Toledo, Ana Eliza Zeraik, Luis Alberto Mansor Basso, Sergio Henrique Seabra, Gabriel Bonan Taveira, Valdirene Moreira Gomes, André de Oliveira Carvalho

Devido a crescente resistência dos microrganismos a antibióticos utilizados atualmente, há a necessidade de novas substâncias terapêuticas. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas de defesa dos organismos e possuem vasta atividade inibitória sobre microrganismos sendo, portanto, uma classe promissora de novas substâncias terapêuticas. Nosso grupo vem trabalhando com um AMP denominado Vu-Def1, da família das defensinas, isolado de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda). A partir do γ -core de Vu-Def1 e de um estudo onde correlacionamos a estrutura primária dos γ -cores e a atividade biológica de diversas defensinas, desenhamos o peptídeo A_{42,44}R_{37,38}W₃₆₋₃₉Y₃₂₋₄₆Vu-Def (WR), mais catiônico e hidrofóbico que o original, com o intuito de melhorar sua atividade biológica. Previamente, WR demonstrou forte atividade antifúngica sobre leveduras do gênero *Candida*, e baixa toxicidade para monócitos humanos e macrófagos murinos. Para *C. albicans* foi determinada a dose letal de 27,5 μ M e tempo de morte de 1h. Verificamos por diversas sondas que WR afeta organelas intracelulares com destaque para disfunção vacuolar e mitocondrial que induz morte celular acidental em *C. albicans*. Porém observamos encolhimento celular que não é associado com este tipo de morte. Devido a disfunção observada em organelas intracelulares e o encolhimento celular, o objetivo deste trabalho foi estudar a interação e a entrada de WR em *C. albicans* e também analisamos o papel do íon K⁺, descrito como regulador do volume celular em fungos. Para isso fizemos um ensaio com 100 e 200mM de fosfatos de K⁺ e Na⁺, CaCl₂ e 5mM EGTA, onde observamos que todos os íons revertem parcialmente a morte. Para determinar se WR entra na célula, fizemos o ensaio em microscópio confocal com Calcofluor White 2% e WR marcado com o fluoróforo 5-FAM e concluímos que houve a internalização de WR, e que a entrada ocorrer mesmo na presença de K⁺ indicando que a proteção observada anteriormente pode não estar relacionada com bloqueio da carga entre WR e da superfície celular. Para diferenciarmos o efeito de interação com membranas, testamos a atividade hemolítica de WR e não houve lise de eritrócitos, e usando Dicroísmo Circular analisamos as interações biofísicas de WR com modelos de membranas artificiais (SUVs). Observamos que em água ou em fosfato de K⁺ ou Na⁺ e na presença de POPC, POPC/POPE ou ergosterol 15 e 35% a conformação de WR é desordenada e apenas em TFE (100%) e POPC/POPG, há a formação de α -hélices. Nossos resultados sugerem que WR não tem como alvo a membrana plasmática e os íons não bloqueiam carga, mas, repõem o que a células está perdendo, bloqueando o sinal que leva à morte.

Instituição do Programa de IC, IT ou PG: UENF

Eixo temático: PPG Biociências Biotecnologia

Fomento da bolsa (quando aplicável): UENF/FAPERJ

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:



XU Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica

28^o
Encontro de Iniciação Científica da UENF

20^o
Circuito de Iniciação Científica do IFFluminense

16^a
Jornada de Iniciação Científica da UFF



U III Congresso Fluminense de Pós-Graduação

23^a
Mostra de Pós-Graduação da UENF

8^a
Mostra de Pós-Graduação do IFFluminense

8^a
Mostra de Pós-Graduação da UFF

WR designed peptide is internalized by *Candida albicans* cells and K⁺ ion causes reversal of cell death

Filipe Zaniratti Damica, Douglas Ribeiro Lucas, Estefany Braz Toledo, Ana Eliza Zeraik, Luis Alberto Mansor Basso, Sergio Henrique Seabra, Valdirene Moreira Gomes, André de Oliveira Carvalho

Due to the increasing resistance of microorganisms to currently used antibiotics, there is a need for new therapeutic substances. Antimicrobial peptides (AMPs) are defense molecules of organisms and have broad inhibitory activity against microorganisms, therefore being a promising class of new therapeutic substances. Our group has been working with an AMP called *Vu-Def1*, from the defensin family, isolated from *Vigna unguiculata* (cowpea). From the γ -core of *Vu-Def1* and a study where we correlated the primary structure of γ -cores and the biological activity of various defensins, we designed the peptide $A_{42,44}R_{37,38}W_{36-39}V_{32-46}$ *Vu-Def* (WR), more cationic and hydrophobic than the original, with the aim of improving its biological activity. Previously, WR demonstrated strong antifungal activity against *Candida* yeast and low toxicity to human monocytes and murine macrophages. The lethal dose for *C. albicans* was determined to be 27.5 μ M and the time of death was 1 h. We verified with various probes that WR affects intracellular organelles, mainly vacuolar and mitochondrial dysfunction that induces accidental cell death in *C. albicans*. However, we observed cell shrinkage that is not associated with this type of death. Due to the dysfunction observed in intracellular organelles and cell shrinkage, the aim of this work was to study the interaction and entry of WR in *C. albicans* and we also analyzed the role of the ion K⁺, described as a regulator of cellular volume in fungi. To do this, we performed an assay with 100 and 200mM of K⁺ and Na⁺ phosphates, CaCl₂, and 5mM EGTA, where we observed that all ions partially reversed death. To determine if WR enters the cell, we performed the assay in a confocal microscope with 2% Calcofluor White and WR labeled with the fluorophore 5-FAM and concluded that there was internalization of WR, and that the entry occurs even in the presence of K⁺, indicating that the protection previously observed may not be related to the charge counteraction between WR and cell surface. To differentiate the effect of interaction with membranes, we tested the hemolytic activity of WR and there was no lysis of erythrocytes, and using Circular Dichroism, we analyzed the biophysical interactions of WR with artificial membrane models (SUVs). We observed that in water, K⁺ or Na⁺ phosphates and in the presence of POPC, POPC/POPE or ergosterol 15 and 35%, the conformation of WR is disordered and only in TFE (100%) and POPC/POPG, there is the formation of α -helices. Our results suggest that WR does not target the plasma membrane and the ions do not block charge, but instead replace what the cell is losing, blocking the signal that leads to death.

Institution of the CI, IT or PG Program: UENF
Thematic axis: PPG Biosciences Biotechnology
Scholarship promotion (when applicable): UENF/FAPERJ

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:

