



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - *CAMPUS DE CASCAVEL*
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JULIANA BEAL MENEGOTTO

**Isolamento e sequenciamento do gene PcAFP codificante para peptídeo
antifúngico de *Penicillium crustosum***

Orientador (a): Prof. Dr. José Luis da Conceição Silva

CASCAVEL – PR

2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

MENEGOTTO, JULIANA BEAL

Isolamento e sequenciamento do gene PcAFP codificante para peptídeo antifúngico de *Penicillium crustosum* / JULIANA BEAL MENEGOTTO; orientador(a), JOSE LUIS DA CONCEIÇÃO SILVA, 2019.

55 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Graduação em Farmácia Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2019.

1. Peptídeos Antifúngicos. 2. Sequenciamento. 3. *Penicillium crustosum*. I. DA CONCEIÇÃO SILVA, JOSE LUIS . II. Título.

JULIANA BEAL MENEGOTTO

**Isolamento e sequenciamento do gene PcAFP codificante para peptídeo
antifúngico de *Penicillium crustosum***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde.

Orientador (a): Prof. Dr. José Luis da Conceição Silva

**CASCADEL - PR
2019**

JULIANA BEAL MENEGOTTO

Isolamento e sequenciamento do gene homólogo PcAFP codificante para
peptídeo antifúngico em *Penicillium crustosum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde.

Orientador: Prof^o. Dr. José Luis da Conceição Silva

BANCA EXAMINADORA:



Prof^o. Dr. José Luis da Conceição Silva
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE
Orientador



Prof^a Dr^a. Marina Kimiko Kadowaki
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE



Prof.^a Dr^a. Adriana Fiorini Rosado
Universidade Federal do Paraná – UFPR
Campus Palotina

JULIANA BEAL MENEGOTTO

BIOGRAFIA RESUMIDA

Juliana Beal Menegotto, natural de Cascavel, Paraná, Brasil, nascida no dia 01 de janeiro de 1993, formou-se em Farmácia na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, campus de Cascavel, em dezembro de 2014. Ingressou no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2017. Trabalha no Laboratório de Análises e Pesquisas Clínicas BIOVEL, desde dezembro de 2014. Desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha de Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde, orientado pelo Dr. José Luis da Conceição Silva.

Isolamento e sequenciamento do gene PcAFP codificante para peptídeo antifúngico de *Penicillium crustosum*

Resumo: Infecções fúngicas vêm aumentando significativamente em todo o mundo, devido à incidência de doenças infecciosas graves que debilitam principalmente pacientes imunocomprometidos. Em virtude da elevada resistência aos medicamentos antifúngicos em uso, novas moléculas estão tornando-se alvo de pesquisas. Enquadram-se nessas os chamados peptídeos antifúngicos. Esses são estudados por causa de sua capacidade de atingir as células alvo sem danificar o organismo hospedeiro. Assim, este estudo investigou a presença do peptídeo antifúngico no *Penicillium crustosum* utilizando como referência a sequência homóloga do gene PgAFP de *Penicillium chrysogenum*. Ao aplicar técnicas de biologia molecular, o gene homólogo PgAFP de *P. crustosum* foi obtido e sequenciado, bem como o peptídeo foi isolado, a partir do crescimento do fungo em meio de cultivo líquido estressante para expressão do peptídeo. O gene foi amplificado através da técnica de PCR convencional, na qual foram desenhados oligonucleotídeos (primers) específicos para o gene PgAFP. A sequência completa do gene PcAFP de 405 pb foi obtida com primers desenhados na região a montante e a jusante do gene PgAFP. A sequência genômica foi comparada com sequências depositadas no banco de dados do NCBI com a ferramenta *Blastn*. Após essa ação, o gene mostrou 96,30% de identidade ao gene PgAFP do *P. chrysogenum*. A comparação da sequência completa do gene PcAFP com o PgAFP permitiu revelar uma região de 279 pb codificante para o peptídeo antifúngico. Esta sequência foi traduzida em sua sequência de aminoácidos, comparada ao modelo do peptídeo antifúngico PgAFP do *P. chrysogenum* e demonstrou homologia de 98,28% com esse. A modelagem do PcAFP revelou o peptídeo sinal conservado da família das proteínas antifúngicas, estrutura tridimensional conservada com 3 pontes dissulfeto e domínio conservado λ -core encontrado nas PAFs. O peptídeo foi analisado com a ferramenta para previsão do pI/Mw, que indicou massa molecular de 6,48 kDa e pI 8,83. O extrato obtido a partir do sobrenadante do meio de cultura AFPIM mostrou um peptídeo de 6,9 kDa em gel de poliacrilamida Tricina SDS-PAGE 16%, contudo, ainda não conclusivo quanto ao peptídeo de *P. crustosum*. O extrato bruto extracelular do cultivo líquido foi testado quanto à atividade antimicrobiana contra bactérias e levedura. No ensaio de microdiluição em caldo, os microrganismos foram expostos a diferentes diluições do extrato extracelular contendo o peptídeo. Nesse, obteve-se atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Em síntese, ao concluir o isolamento desse peptídeo em *P. crustosum* contribuiremos com a caracterização de um novo peptídeo antifúngico com potencial para aplicação na saúde, além de aumentar o conhecimento sobre a estrutura e função dessas moléculas bioativas.

Palavras-chave: Gene AFP, *Penicillium crustosum*, Peptídeos Antifúngicos, Sequenciamento.

Isolation and sequencing of PcAFP gene coding for antifungal peptide of *Penicillium crustosum*

Abstract: Fungal infections have been increasing significantly throughout the world due to the incidence of serious infectious diseases that primarily weaken immunocompromised patients. Due to high resistance to antifungal drugs in use, new molecules are becoming the target of researches and in this class are so-called antifungal peptides. These studies are being carried out due to the need to develop new active molecules against pathogenic fungi, since these are becoming increasingly resistant to existing drugs and increasing the number of immunocompromised hosts. This study investigated the presence of the antifungal peptide in *Penicillium crustosum* using as reference the homologous sequence of the PgAFP gene of *Penicillium chrysogenum*. Applying molecular biology techniques, the homologous PgAFP gene of *P. crustosum* was obtained and sequenced, as well as the peptide was isolated from the fungus growth in stressful liquid culture medium for expression of the peptide. The gene was amplified by the conventional PCR technique, in which specific oligonucleotides (primers) were designed for the PgAFP gene. The complete PcAFP gene sequence of 405 bp genomic fragment was obtained with primers designed upstream and downstream of the PgAFP gene. The genomic sequence was compared to sequences deposited in the NCBI database with the Blastn tool and the gene showed 96.30% identity to the *P. chrysogenum* PgAFP gene. Comparison of the complete PcAFP gene sequence with the PgAFP gene revealed a 279 bp region encoding the antifungal peptide. This sequence has been translated into its amino acid sequence and was compared to the PgAFP sequence of *P. chrysogenum* peptide model demonstrating 98.21% homology with this peptide. The PcAFP modeling revealed the conserved signal peptide of the antifungal family of proteins, three-dimensional conserved structure with 3 disulfide bonds and λ -core conserved domain found in the PAFs. The peptide was analyzed with the pI / Mw prediction tool, in which it obtained 6.48 kDa and pI 8.83. The extract obtained from the AFPIM culture medium supernatant showed a 6.9 kDa peptide on Tricine SDS-PAGE 16% polyacrylamide gel, however, not yet conclusive for the *P. crustosum* peptide. The extracellular crude extract from the liquid culture was tested for antimicrobial activity against bacteria and yeast. In the broth microdilution assay the microorganisms were exposed to different dilutions of the extracellular extract containing the peptide, where activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* was obtained. In conclusion, the isolation of this peptide in *P. crustosum* will contribute with the characterization of a new antifungal peptide with potential application, besides increasing the knowledge about the structure and function of these bioactive molecules.

Key words: AFP gene, Antifungal Peptides, *Penicillium crustosum*, Sequencing.

DEDICATÓRIA

É chegado o fim de um ciclo de muitas risadas, choro, felicidade e frustrações. Dedico este trabalho a todos que fizeram parte desta etapa da minha vida. Agradeço a Deus por ter iluminado o meu caminho, aos meus pais Edna e Gelson por terem propiciado a realização deste sonho, ao meu orientador por todo o ensinamento e a todos os meus amigos pelo apoio nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Edna e Gelson, que apesar de todas as dificuldades, ajudaram-me na realização do meu sonho. Por proporcionarem-me a oportunidade de estudar e de crescer, por incentivarem-me a persistir e principalmente por todo amor. Tudo o que faço é por vocês.

A toda minha família que acreditou em mim e compartilhou um pouco de tudo o que vivi nesses dois anos e meio. Também não posso deixar de agradecer à minha família de “quatro patas” que sempre me receberam com muito amor, após cada dia difícil, tornando as situações um pouco mais fáceis e felizes.

Aos meus amigos de trabalho, parceiros de pesquisa e integrantes do Laboratório de Bioquímica, em especial à Letícia Rasbold e ao Jorge William por toda ajuda, apoio, companheirismo, parceria e pelas risadas durante este período tão importante da minha formação acadêmica.

A todos os professores, por todos os conselhos e ajuda durante os meus estudos e elaboração da minha Dissertação.

Quero agradecer especialmente ao meu professor orientador, Dr. Jose Luis da Conceição Silva, pelo empenho dedicado ao meu projeto de pesquisa e por todo apoio e paciência ao longo da elaboração do meu projeto final.

À Profa. Dra. Marina Kimiko Kadowaki que compartilhou seus conhecimentos e ajudou a resolver os problemas pelo caminho, acrescentando muito ao nosso trabalho.

Ao meu namorado, Marco, que chegou no final desta etapa, mas que foi uma pessoa imprescindível para a conclusão deste projeto, dando todo o apoio, carinho e incentivo.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização da minha pesquisa.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Estrutura celular dos fungos.....	16
3.2 Infecção fúngica.....	18
3.3 Peptídeos antifúngicos.....	20
3.4 Estrutura e ação dos Peptídeos Antifúngicos (PAFs).....	24
3.5 Busca de gene homólogo ao PgAFP em <i>Penicillium crustosum</i>	26
CAPÍTULO 1 – ARTIGO.....	27
Resumo	27
1 Introdução	28
2 Materiais e Métodos	29
2.1 Cepas microbianas	29
2.2 Condições de crescimento do fungo <i>Penicillium crustosum</i>	29
2.3 Extração de DNA do micélio do fungo <i>P. crustosum</i>	30
2.4 Desenho e síntese dos primers para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	31
2.5 Reação de PCR e purificação dos produtos de PCR.....	31
2.5.1 Reações de PCR com DNA genômico de <i>P. crustosum</i>	31
2.5.2 Purificação e sequenciamento dos produtos de PCR.....	32
2.6 Análise da sequência de DNA genômico e modelagem do peptídeo PcAFP ..	32
2.7 Produção do peptídeo PcAFP a partir do meio de cultivo.....	33
2.8 Dosagem de proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida Tricina SDS- PAGE	33
2.9 Teste de atividade antimicrobiana.....	34
2.9.1 Microdiluição em caldo	34
3 RESULTADOS	36
3.1 Extração de DNA do <i>P. crustosum</i> e isolamento do gene PcAFP	36
3.2 Análise da sequência do gene PcAFP e comparação a família AFPs	36
3.3 Estrutura terciária predita da proteína predita de <i>P. crustosum</i>	40
3.4 Características bioquímicas do peptídeo PcAFP.....	41
3.5 Teste de atividade antimicrobiana.....	43

3.5.1 Microdiluição em caldo	43
4 DISCUSSÃO	44
5 CONCLUSÕES.....	46
6 CONCLUSÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO	46
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
8 REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO	48
11 REFERÊNCIAS DO ARTIGO.....	52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura da parede e membrana celular de fungo filamentosos.17
- Figura 1. A- Fragmento do gene PcAFP de 405 pb amplificado indicado com os primers Forward/Reverse do gene PgAFP e B- amostras amplificadas por PCR com os primers PR2/PF3 Am1, Am2 (PR4/PF3) e Am3 (Prev/PF3).....36
- Figura 2. Alinhamento da sequência completa do gene *afp* de *P. crustosum* e da sequência GQ911150.1.....37
- Figura 3. Sequência completa do gene PcAFP *P. crustosum*.....38
- Figura 4. Alinhamento clustal W das proteínas antifúngicas de *P. chrysogenum* (ACX54052.1) e da proteína deduzida PcAFP de *P. crustosum*.....38
- Figura 5. Proteína madura do PgAFP de *P. chrysogenum* e PcAFP de *P. crustosum* mostrando as pontes dissulfeto formadas entre os resíduos de cisteína e o único resíduo de aminoácido diferente destacado em letra vermelha.....39
- Figura 6. Análise filogenética obtida pelo método da Máxima Verossimilhança.....39
- Figura 7. Estrutura 3D gerada por modelagem molecular, usando o software PyMol..41
- Figura 8. Gel de poliacrilamida tricina SDS-PAGE 16% corado com Comassie Blue..42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Mapa demonstrativo de cada microrganismo com suas respectivas diluições.....	35
Quadro 2. Valores das diferenças de absorvâncias obtidas no tempo zero e depois da incubação.....	43

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as infecções fúngicas têm aumentado de maneira surpreendente, bem como o número de mortes, principalmente em pacientes com câncer, transplantados ou com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Nos países em desenvolvimento, o número de jovens afetados por infecções fúngicas é próximo a 1 bilhão.

A velocidade de crescimento dos fungos é lenta, silenciosa e de difícil identificação em humanos. Devido a esse crescimento disseminado, a oferta de antifúngicos também está aumentando, deixando-os susceptíveis a contrair uma certa resistência frente a esses agentes. Os pacientes que recebem antibióticos fortes por um período prolongado têm pré-disposição a infecções fúngicas, uma vez que os antibióticos matam, além das bactérias nocivas, as benéficas, que ajudam na proteção do organismo frente a outros microrganismos patogênicos.

O resultado é uma mudança de equilíbrio na microflora de diversas áreas do corpo, como a vagina, os intestinos e a boca. No entanto, infecções fúngicas geralmente recebem menos atenção do público do que infecções virais e bacterianas, porque estas espalham-se rapidamente e têm fortes efeitos sobre a saúde humana; porém, é preciso salientar que algumas espécies de fungos também são patógenos graves. Avanços na medicina, particularmente no tratamento da AIDS e do câncer, e as crescentes taxas de sucesso para o transplante de órgãos, levaram ao aumento no número de pessoas imunocomprometidas. Esses indivíduos são altamente suscetíveis a infecções fúngicas.

O aparecimento da resistência à antimicrobianos contribui negativamente para a tentativa de cura de pacientes acometidos por infecções, dentre elas, as causadas por fungos. A falha terapêutica ocorre quando um paciente não responde ou não responde mais a um medicamento administrado em uma dose padrão. Vários fatores do hospedeiro, do medicamento e dos microrganismos contribuem para essas falhas. Por exemplo, os pacientes com o sistema imunológico comprometido têm maior probabilidade de não responder à terapia porque o medicamento antifúngico não tem a assistência de uma resposta imunológica robusta na luta contra a infecção.

Peptídeos antifúngicos (PAFs) são estudados como uma maneira de contornar a resistência adquirida por fungos. Tal fato tem tomado grande importância, visto que essa alternativa não afeta às células do hospedeiro, já que todos os organismos,

fungos e humanos, são eucariotos. Contudo, ensaios de efeitos antimicrobianos *in vivo* são demorados, onerosos e esbarram em várias barreiras éticas (GOFFI, 2013). Desta maneira, algumas ferramentas para análise e predição de Peptídeos Antimicrobianos (AMPs) *in silico* são estudadas na tentativa de auxiliar no desenvolvimento de novas terapias (TORRENT; VICTORIA NOGUES; BOIX, 2012).

Para estudos *in silico* é necessária uma grande quantidade de dados baseados em AMPs já descritos e depositados em bancos de estudos, além de métodos computacionais para analisar e definir quais AMPs são viáveis para uma possível avaliação experimental *in vivo*. Além disso, as ferramentas computacionais serão capazes de prever quais peptídeos apresentariam atividade antimicrobiana e também poderá estimar qual seria a atividade antimicrobiana, comparando e selecionando os peptídeos com maior eficácia contra patógenos (TORRENT; VICTORIA NOGUES; BOIX, 2012).

Os AMPs constituem os principais elementos do sistema imune inato dos fungos, estão amplamente presentes na natureza e representam um antigo mecanismo de defesa. São caracterizados por pequenas proteínas e peptídeos que funcionam como uma ampla gama de mecanismos de defesa de primeira linha contra patógenos, como bactérias, fungos e vírus.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Investigar a presença do gene homólogo PgAFP e induzir a produção do peptídeo antimicrobiano pelo *Penicillium crustosum* em meio de cultura estressante.

2.2 Objetivos Específicos

- Amplificar o gene para o PAF (Peptídeo Antifúngico) do fungo *P. crustosum* utilizando primers homólogos de PgAFP de *P. chrysogenum*;

- Verificar em gel de agarose as bandas equivalentes ao gene homólogo PgAFP obtidas através de PCR e isolar a banda específica do PcAFP;

- Sequenciar o fragmento isolado do gene PcAFP responsável pela produção do PAF;

- Verificar a indução do PAF no fungo *P. crustosum* cultivado em meio de cultura estressante.

- Realizar testes de atividade antimicrobiana com o extrato extracelular contendo o peptídeo em estudo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Estrutura celular dos fungos

Fungos são eucariotos, sua parede celular é composta de quitina, 1,3- β - e 1,6- β -glucanas, proteínas e outros polímeros de organização celular complexa. As células fúngicas têm um núcleo ligado à membrana no qual o DNA é envolvido pelas proteínas histonas. A composição da parede é altamente flexível e muda regularmente durante a separação das células. A parede celular está intimamente associada a enzimas hidrolíticas que são responsáveis pela manutenção da flexibilidade desta estrutura e podem desempenhar papel na divisão e ligação cruzada de polímeros (FARUCK; YUSOF; CHOWDHURY, 2016).

A membrana plasmática, como todas as membranas celulares, envolve o citoplasma da célula e controla o movimento de substâncias para dentro e para fora dela. Essas membranas contêm três lipídios principais: fosfolipídios, esfingolipídios e esteróis (FARUCK; YUSOF; CHOWDHURY, 2016).

Dois camadas de fosfolipídios formam a membrana celular. Cada molécula de fosfolipídio consiste de uma cabeça e um par de caudas. A cabeça é hidrofílica e as caudas são hidrofóbicas (FARUCK; YUSOF; CHOWDHURY, 2016).

A fosfatidilserina e o fosfatidilinositol são os lipídios aniônicos mais comuns nas membranas fúngicas. As células eucarióticas contêm esteróis. Nas células eucarióticas inferiores, como os fungos, há ergosterol, que é semelhante ao colesterol. Essa diferença no conteúdo de esterol é explorada nos mecanismos de drogas antifúngicas (FARUCK; YUSOF; CHOWDHURY, 2016).

O chamado crescimento apical, é uma forma extremamente polarizada de crescimento celular que leva a uma extensão tubular estreita da célula (TINDEMANS; KERN; MULDER, 2006). No caso dos fungos filamentosos, essa estrutura é denominada de hifa. Estas hifas são estruturas celulares cilíndricas com um raio entre 1 e 10 μm . A velocidade de crescimento varia amplamente de uma espécie de fungo para outra, mas a média é em torno de 1 $\mu\text{m}/\text{min}$. O comprimento de uma hifa individual pode atingir muitas vezes o seu diâmetro, dando-lhe uma aparência distinta.

O citoplasma das hifas fúngicas é separado da parte extracelular por um envelope de células constituído por duas camadas. O interior é a membrana plasmática. A camada externa é uma parede celular rígida feita de uma rede de polissacarídeos e proteínas que são interligadas por ligações de hidrogênio e

covalentes. O processo de crescimento requer que o novo material seja inserido na membrana plasmática e na parede celular. Este material é entregue através de exocitose de vesículas. À medida que essas vesículas fundem-se com a membrana plasmática, elas aumentam sua área superficial e, simultaneamente, depositam seu conteúdo na parede celular. De fato, o delicado equilíbrio entre a quantidade de materiais entregues à parede celular interna e externa é mantido pelo processo reverso de endocitose (TINDEMANS; KERN; MULDER, 2006).

A característica da estrutura celular dos fungos contribui para sua patogenicidade e também é importante do ponto de vista antifúngico, visto que existem poucas classes de drogas que são capazes de atingir a estrutura fúngica.

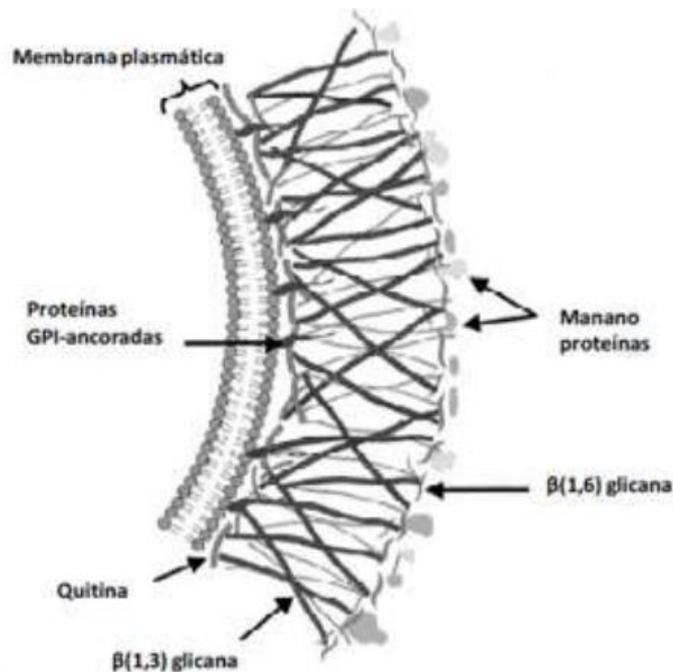


Figura 1 Estrutura da parede e membrana celular de fungo filamentoso.

Fonte: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/7346/5/Tese%20-%20Marcela%20Suriani%20Ribeiro%20-%20202017.pdf>

3.2 Infecção Fúngica

As doenças fúngicas invasivas (IFDs) causam morbidade e mortalidade significativas, afetando a saúde humana e animal e comprometendo a segurança alimentar (DJORDJEVIC; LEV, 2018). Fungos que causam doenças em mamíferos são identificados como causadores de micoses (FARUCK; YUSOF; CHOWDHURY, 2016). Anualmente, eles afetam 300 milhões de pessoas e causam 1,5 milhão de mortes, igualando ou excedendo a tuberculose e a malária, respectivamente (Fungal Infection Trust, 2017; CAMPOY; ADRIO, 2017; DJORDJEVIC; LEV, 2018).

Estimativas na literatura sustentam uma mortalidade de 30% a 40% para candidíase invasiva (*Candida spp.*), 20% a 30% para criptococose disseminada (*Cryptococcus spp.*) e uma porcentagem similar para aspergilose invasiva (RAUTENBACH; TROSKIE; VOSLOO, 2016) comumente adquiridas em pacientes hospitalizados (*Aspergillus spp.*) (CAMPOY; ADRIO, 2017; DJORDJEVIC; LEV, 2018), podendo causar, por exemplo, doença pulmonar obstrutiva crônica (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017). Os fungos também causam doenças sistêmicas. Durante a infecção sistêmica, o patógeno espalha-se por todo o corpo em vez de permanecer localizado (infecção local) (FARUCK; YUSOF; CHOWDHURY, 2016).

Atualmente, as doenças fúngicas ocorrem com maior frequência, apesar de serem bastante incomuns. O aumento é, provavelmente, devido ao crescente número de indivíduos imunocomprometidos. Para levar uma vida normal, alguém com um transplante de órgão deve tomar poderosos inibidores imunológicos, a fim de evitar a rejeição do novo órgão. No caso das pessoas com AIDS, que também são afetadas, o sistema imunológico já está comprometido como consequência da doença (FARUCK; YUSOF; CHOWDHURY, 2016).

Indivíduos imunocomprometidos são o principal grupo afetado por IFDs e incluem aqueles com HIV/AIDS ou neoplasias hematológicas, bem como receptores de transplantes de células-tronco e de órgãos sólidos (CAMPOY; ADRIO, 2017). Os fungos também produzem infecções superficiais (envolvendo a pele e as superfícies mucosas) que têm maior incidência que as infecções invasivas, diminuindo a qualidade de vida dos afetados.

As micoses superficiais são causadas, na maioria das vezes, por *Malassezia globosa* e *Malassezia furfur*. Micoses cutâneas e subcutâneas, que afetam estruturas queratinizadas, são causadas por gêneros dermatófitos como *Trichophyton*,

Epidermophyton e *Microsporum* (CAMPOY; ADRIO, 2017). Porém, até mesmo esses microrganismos causadores de infecções leves podem agravar-se e acabar causando infecções mais graves, ou pelo paciente estar debilitado, ou por serem resistentes à terapia usual.

Azóis, polienos e equinocandinas são as três principais classes de drogas usadas na terapia com IFDs. No entanto, essas drogas têm limitações. Por exemplo, o polieno anfotericina B é tóxico, apesar de seu *status* "padrão-ouro" para o tratamento de IFDs (FALCI; DA ROSA; PASQUALOTTO, 2015), e a resistência a azóis e equinocandinas está emergindo (Fungal Infection Trust, 2017). Novas terapias que são seletivas para alvos fúngicos, que preferencialmente possuem um mecanismo de ação diferente dos antifúngicos atualmente disponíveis, são, portanto, urgentemente, necessárias para superar as limitações dos medicamentos e assim reduzir a alta morbidade global, mortalidade e custo associado ao tratamento dessas infecções (DJORDJEVIC; LEV, 2018).

Produtos farmacêuticos como os antibacterianos são capazes de danificar com sucesso as células bacterianas sem prejudicar as células humanas (HEGEDÜS; MARX, 2013). Entretanto, como os fungos são eucariontes (RAUTENBACH; TROSKIE; VOSLOO, 2016), descobrir um tratamento que o mate sem prejudicar as células humanas é mais difícil (CAMPOY; ADRIO, 2017; HEGEDÜS; MARX, 2013). A maioria dos tratamentos químicos é tóxico, tanto para fungos quanto para humanos (CAMPOY; ADRIO, 2017; FARUCK; YUSOF; CHOWDHURY, 2016). Décadas de pesquisa farmacêutica trouxeram melhorias no tratamento de doenças fúngicas (FARUCK; YUSOF; CHOWDHURY, 2016).

Dos 1,5 milhões de tipos de fungos estimados no mundo, aproximadamente 400 espécies podem causar doenças em animais e, pouquíssimas, são responsáveis por doenças humanas. No entanto, algumas infecções fúngicas são causadas por fungos oportunistas. Os parasitas facultativos não são dependentes de organismos vivos e não evoluíram com quaisquer hospedeiros; portanto, eles são considerados mais perigosos que parasitas obrigatórios. Além disso, eles também são capazes de atacar seus hospedeiros agressivamente e a probabilidade de matá-lo é maior do que a dos parasitas obrigatórios (FARUCK; YUSOF; CHOWDHURY, 2016).

Todos os fungos são potencialmente prejudiciais, se o sistema imunológico estiver comprometido (RAUTENBACH; TROSKIE; VOSLOO, 2016). Felizmente, na maioria dos casos, a probabilidade de contrair uma infecção fúngica grave é

relativamente baixa em comparação com a probabilidade de doença bacteriana (FARUCK; YUSOF; CHOWDHURY, 2016).

A resistência antifúngica é um processo evolutivo baseado na seleção natural de organismos que aumentam sua capacidade de sobreviver e crescer na presença de drogas. A evolução da resistência contra agentes antimicrobianos é onipresente na natureza e os micróbios desenvolvem várias estratégias para combater a ação de drogas. Os mecanismos de resistência antifúngica foram relatados em nível molecular para a maioria dos agentes antifúngicos e fungos patogênicos. Para neutralizar os efeitos fungicidas ou fungistáticos de todas as classes de antifúngicos, os microrganismos desenvolvem três mecanismos principais de resistência. O primeiro baseia-se na diminuição da concentração efetiva do fármaco, o segundo em alterações no alvo do fármaco e o terceiro é devido a modificações do metabolismo para desviar os efeitos tóxicos exercidos por alguns agentes antifúngicos (CAMPOY; ADRIO, 2017).

O uso de drogas antifúngicas relacionadas à medicina na agricultura resultou em reservatórios ambientais para gerar alguns patógenos resistentes a drogas (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

3.3 Peptídeos Antifúngicos

A exploração de novos recursos microbianos é uma abordagem poderosa para a descoberta de novos metabólitos bioativos (RAUTENBACH; TROSKIE; VOSLOO, 2016). Microrganismos incomuns que prosperam em ambientes agressivos, como a profundidade do oceano, crateras, resíduos de minas ácidas, etc., provaram ser bons produtores de metabólitos incomuns (WU et al., 2012). Muitas proteínas e peptídeos com atividade antifúngica de plantas, bactérias, artrópodes, anfíbios ou os répteis foram purificados e caracterizados (DELGADO *et al.*, 2015; WU et al., 2012).

A crescente incidência de infecções causadas por vários fungos filamentosos gera novos desafios, tanto para a medicina quanto para a agricultura, tendo em vista o número crescente de hospedeiros imunocomprometidos e o surgimento de cepas fúngicas resistentes a antifúngicos. Logo, há uma demanda substancial por novos compostos com ampla atividade antifúngica. Algumas proteínas secretadas por alguns fungos filamentosos possuem estrutura semelhante a defensinas e tornam-se interessantes, porque elas têm potente atividade antimicrobiana em fungos filamentosos (DELGADO et al., 2015).

O surgimento de resistência em fungos a drogas de qualquer classe de medicamentos limita severamente a terapia, porque poucas opções de tratamento estão disponíveis. A resistência multidroga pode eliminar completamente as opções de tratamento, o que tem um efeito devastador no resultado do paciente.

Na maioria dos casos, a falha terapêutica ocorre quando um paciente não responde mais a um medicamento administrado em uma dose padrão. Fatores medicamentosos e microbianos contribuem para essas falhas. Por exemplo, pacientes com um sistema imunológico comprometido têm maior probabilidade de não responder à terapia porque o medicamento antifúngico não tem a assistência de uma resposta imunológica robusta na luta contra a infecção. Outros fatores externos, por exemplo, cateteres de demora, válvulas cardíacas artificiais e outros dispositivos implantados contribuem para infecções refratárias, pois essas superfícies são frequentemente colonizadas por biofilmes impermeáveis a medicamentos.

Embora a penetração do fármaco, nos locais de infecção, seja pouco compreendida, sabe-se que a entrega do mesmo no hospedeiro contribui para o sucesso e insucesso terapêutico (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

A exposição à droga na forma de profilaxia, terapia repetida ou a longo prazo está associada ao surgimento de resistência (RAUTENBACH; TROSKIE; VOSLOO, 2016). Da mesma forma, a exposição a fungicidas agrícolas com alvos moleculares idênticos aos dos antifúngicos sistêmicos semeou reservatórios ambientais de organismos resistentes. A resistência microbiológica a medicamentos pode ser primária (natural-intrínseca) ou secundária (adquirida).

A resistência primária a drogas é encontrada naturalmente em alguns fungos sem exposição prévia e frequentemente envolve o mesmo mecanismo que causa resistência adquirida, embora mecanismos desconhecidos também possam estar implicados. Os mecanismos moleculares que conferem resistência antifúngica são conhecidos em todas as principais classes de medicamentos, mas os fatores biológicos complexos que promovem esses mecanismos estão apenas começando a ser elucidados (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

Os AMPs estão amplamente distribuídos nos organismos vivos. Bactérias, fungos, plantas e animais são fontes de numerosos peptídeos catiônicos com comportamento antimicrobiano (JOERGER, 2003).

A partir da segunda metade da década de 1990, vários peptídeos com estruturas de defensinas foram isoladas e caracterizadas a partir de espécies de fungos filamentosos pertencentes aos *Ascomycetes* (GALGÓCZY et al., 2013).

Esses peptídeos diferem em tamanho molecular, potência e espectro de atividade (KOVÁCS et al., 2011; FARUCK; YUSOF; CHOWDHURY, 2016). Os AMPs de ascomicetos (RODRÍGUEZ-MARTÍN et al., 2010) são partículas bioativas com pesos moleculares na faixa de 1,3 kDa a 30 kDa (FARUCK; YUSOF; CHOWDHURY, 2016), apresentam caráter básico por possuírem alto conteúdo de arginina e resíduos de lisina (DELGADO et al., 2015). A presença de seis a oito resíduos de cisteína e várias pontes dissulfeto são suas principais características comuns (KOVÁCS et al., 2011).

Os AMPs constituem parte dos componentes críticos da imunidade inata em todos os organismos (FARUCK; YUSOF; CHOWDHURY, 2016; HEGEDÜS; MARX, 2013). Eles são codificados por genes, são expressos e, rapidamente, transcritos por indução (HEGEDÜS; MARX, 2013). Em organismos multicelulares, a imunidade inata apresenta a primeira linha de defesa, não necessitando de memória imunológica para combater imediatamente a invasão microbiana (FARUCK; YUSOF; CHOWDHURY, 2016). AMPs, incluindo defensinas, proteínas de ligação a mirosinase e proteínas de transferência de lipídios de baixo peso molecular foram extensivamente investigados em vários organismos (TU et al., 2016).

AMPs produzidos por fungos filamentosos são mais ativos do que aqueles produzidos a partir de bactérias e plantas e são potentes antifúngicos que afetam a biossíntese da parede celular (FARUCK; YUSOF; CHOWDHURY, 2016).

A Proteína antifúngica de *Penicillium spp.* (PAF) e a Proteína antifúngica de *Aspergillus spp.* (AFP) são as proteínas antifúngicas tipo defensinas derivadas de fungos mais intensamente estudadas. Elas são sintetizadas como pré-proteínas, que contêm uma sequência de sinal para a secreção extracelular. Verificou-se que a produção de AFP e PAF é principalmente ativada por fatores de transcrição. De fato, as regiões *upstream* 5' de seus genes carregam vários sítios específicos de ligação de fatores de transcrição que podem estar envolvidos na regulação em resposta a sinais e tensões ambientais. Embora o efeito antifúngico da AFP e da PAF gere sintomas semelhantes nos organismos suscetíveis, tais como inibição da germinação de esporos e crescimento de hifas, retardo do alongamento das hifas, perturbação da membrana, indução do estresse oxidativo intracelular e um fenótipo do tipo apoptose

(RAUTENBACH; TROSKIE; VOSLOO, 2016), foi revelado que eles têm diferentes modos de ação.

Algumas proteínas do grupo dos PAFs foram purificadas, como: AFP de *Aspergillus giganteus* (MOHAMED et al., 2016; VAN VLIET et al., 1994), PgAFP de *Penicillium chrysogenum* (RODRÍGUEZ-MARTÍN et al., 2010), AnAFP de *Aspergillus niger* (LACADENA et al., 1995), AcAFP de *Aspergillus clavatus* (SKOURI-GARGOURI; GARGOURI, 2008), NFAP de *Neosartorya fischeri* (KOVÁCS et al., 2011), NAFP de *Penicillium nalgiovense* (GEISEN, 2000) e FPAP de *Fusarium spp.* (RODRÍGUEZ-MARTÍN et al., 2010; TU et al., 2016). A caracterização genética disponível dos genes que codificam esses PAFs revelou quadros de leitura abertos interrompidos por dois *íntrons* com sítios de *splice* conservados. Eles codificam produtos de 92 ou 94 aminoácidos, que são precursores longos com um sinal peptídico e uma pró-sequência que são removidos para obter proteínas maduras (RODRÍGUEZ-MARTÍN et al., 2010).

O AFP perturba o crescimento polarizado das hifas ao interferir direta ou indiretamente com a biossíntese da parede celular, enquanto o PAF atua via transdução do sinal da proteína G e exerce morte celular programada através da liberação de espécies reativas de oxigênio e seus outros múltiplos efeitos prejudiciais. O AFP e o PAF são relativamente estáveis em várias condições ambientais e até o momento não apresentaram nenhum efeito tóxico nas células de plantas ou mamíferos. Todos esses recursos os indicam como adequados para aplicações práticas no futuro (KOVÁCS et al., 2011), porque mostram espectro de inibição bastante interessante nos fungos, sem efeitos prejudiciais nas células mamíferas (ACOSTA et al., 2009; MARX, 2004).

Embora haja um número de drogas antifúngicas em uso, há uma tendência crescente de cepas resistentes que levam à alta taxa de mortalidade (HOWARD et al., 2009; LIMPER et al., 2011), tornando assim o descobrimento de novos tratamentos antifúngicos de alto interesse. É amplamente aceito que um dos mecanismos mais importantes de resistência seja basicamente devido à desregulação dos genes efetores da resistência antifúngica. Esta é uma consequência de mutações de ponto nos reguladores transcricionais desses genes efetores ou nos genes que codificam alvos antifúngicos (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). A identificação de novos antifúngicos é essencialmente alcançada pela triagem de coleções de compostos químicos naturais ou sintéticos. Uma das maneiras mais práticas de

desenvolver novas classes de drogas antifúngicas depende das pequenas proteínas antifúngicas produzidas comumente por plantas e fungos (PALICZ et al., 2013).

3.4 Estrutura e ação dos Peptídeos antifúngicos (PAFs)

Os fungos filamentosos produzem um amplo espectro de proteínas defensivas, algumas das quais, incluindo a proteína antifúngica secretada por *Penicillium chrysogenum* (AFP), são projetadas para impedir o crescimento de outros fungos (PALICZ et al., 2013). As proteínas antifúngicas semelhantes às defensinas, que existem tipicamente em fungos filamentosos, podem ser distinguidas em dois grupos, de acordo com suas sequências conservadas de aminoácidos: proteína de bolha (GALGÓCZY et al., 2013) e proteína antifúngica (TU et al., 2016).

O AFP é uma proteína de baixo peso molecular (6,5 kDa), básica e rica em cisteína, cuja sequência de aminoácidos N-terminal tem uma homologia com outras proteínas antifúngicas produzidas por outros fungos (MARX et al., 1995). O AFP inibe o crescimento de vários fungos patogênicos, incluindo *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* (KAISERER et al., 2003) e algumas espécies *dermesthyte* (GALGÓCZY et al., 2008; PALICZ et al., 2013). As proteínas do grupo AFP contêm de seis a oito cisteínas que formam ligações dissulfeto intramoleculares e estabilizam uma conformação antiparalela de folha β flanqueada por um segmento helicoidal, também denominado motivo α / β estabilizado com cisteína ($CS\alpha / \beta$) (DELGADO et al., 2016), formando uma topologia de barril β (GALGÓCZY et al., 2013; TU et al., 2016).

Os AMPs antifúngicos de origem fúngica são estudados com maior frequência e mostram características estruturais similares às defensinas, mas não possuem a hélice α (LACADENA et al., 1995; BATTA et al., 2009; HEGEDÜS; MARX, 2013). Essa estrutura compacta das proteínas antifúngicas também contribui para sua termoestabilidade, resistência à variação de pH e degradação mediada por proteases (BATTA et al., 2009; HEGEDÜS; MARX, 2013).

Além disso, as proteínas antifúngicas têm uma carga líquida positiva e são propostas para interagir com componentes da membrana plasmática de carga negativa, como lipídios e proteínas. Essa interação resulta na permeabilidade da membrana iônica seletiva que forma os estados transitórios.

A interação da proteína antifúngica com lipídios específicos e/ou componentes proteicos da membrana plasmática leva a uma alteração da permeabilidade iônica

seletiva da membrana e à formação de poros transitórios e/ou resulta no transporte de proteína (ativa) para a célula hospedeira (HEGEDÜS; MARX, 2013; TU et al., 2016), causando uma perturbação intracelular (PALICZ et al., 2013), nestes antifúngicos interagem com alvos intracelulares (HEGEDÜS; MARX, 2013), aumentando o nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) (DELGADO et al., 2016; PALICZ et al., 2013; TU et al., 2016).

O metabolismo das células fúngicas é alterado, iniciando o aumento do efluxo de potássio (KAISERER et al., 2003; PALICZ et al., 2013) e influxo de cálcio (o cálcio intracelular é um mensageiro secundário que regula várias respostas e sinais de estresse em fungos, incluindo proteínas antifúngicas) (BINDER et al., 2011; DELGADO et al., 2017; HEGEDÜS; MARX, 2013; KAISERER et al., 2003), causando oxidação nas proteínas intracelulares, lipídios e ácidos nucleicos, levando não apenas à desintegração das membranas celulares, mas também da mitocôndria (LEITER et al., 2005; PALICZ et al., 2013).

Outro modo de inibição do antifúngico é limitar o crescimento, implicando na redução da síntese de quitina da parede celular fúngica (HAGEN et al., 2007). Portanto, a parede celular é perturbada e o crescimento fúngico é interrompido, o AFP entra nas células através de um mecanismo de transporte ativo (OBERPARLEITER et al., 2003) e age intracelularmente, provavelmente através da sinalização heterodimérica da proteína G (LEITER et al., 2005). Causa a hiperpolarização das membranas das células fúngicas, o que leva à desintegração das membranas e, conseqüentemente, a um fenômeno semelhante à apoptose aparece (DELGADO et al., 2016; PALICZ et al., 2013).

Estes efeitos tóxicos, quando atingem um limite crítico, também contribuem para a morte celular programada do fungo afetado (PALICZ et al., 2013). Estes resultados demonstram que as proteínas do grupo dos PAFs realizam ações antifúngicas através de vários mecanismos (TU et al., 2016). Por outro lado, o AFP não teve efeitos tóxicos em uma variedade de células mamíferas (PALICZ et al., 2013).

3.5 Busca de gene homólogo ao PgAFP em *Penicillium crustosum*

Atualmente o NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) conta com milhares de sequências gênicas depositadas no *Genbank*. Essas sequências são fontes importantes para a busca de novos genes em organismos com origem próxima, como é o caso do gênero *Penicillium*. Esse site abriga inúmeras sequências e, em algumas espécies, conta até com genomas totalmente sequenciados. Em nosso estudo, utilizou-se o genoma do fungo *P. chrysogenum* como referência para a busca do peptídeo homólogo em *P. crustosum* através de comparação e alinhamento entre as sequências encontradas. Dessa forma, o gene AFP em *P. crustosum* é estudado como uma nova possibilidade de agente com atividade antifúngica. Além disso, ainda não foi estudada a sua sequência gênica e nem o seu peptídeo codificado a partir do gene.

A reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é utilizada para conseguir isolar uma região específica em um genoma, para isso são necessários basicamente iniciadores de replicação (primers), uma enzima termoestável (Taq Polimerase), nucleotídeos (dNTPs) e o material genético. Essa reação ocorre através de vários ciclos térmicos (geralmente de 30-40) automatizados durante cada etapa de reação, por um período determinado. No final, o tubo de reação inclui cerca de 2^{30} moléculas do produto de PCR pretendido (SHAHI et al., 2018).

Diferentes técnicas manuais e automatizadas estão disponíveis para avaliar o produto de PCR amplificado. O habitual é reconhecer o tamanho do produto através da técnica de eletroforese em gel de agarose com brometo de etídio, a visualização dessa dá-se por luz ultravioleta. Os produtos de PCR aparecem, de acordo com seu tamanho, em banda única, comparando-os com um marcador de peso molecular (SHAHI et al., 2018).

Os cientistas utilizam o método de PCR para diagnosticar várias doenças, identificar microrganismos, clonar e sequenciar genes e realizar investigações quantitativas e genômicas de maneira muito rápida e sensível. A PCR possui ampla aplicação em diversas áreas, como aplicações médicas e pesquisa genética (CAI; CASWELL; PRESCOTT, 2014; HAMIDI-ASL et al., 2015).

As principais vantagens da técnica de PCR são a simplicidade de quantificação, alta sensibilidade, precisão, análise rápida, reprodutibilidade, controle de qualidade e contaminação mínima (SHAHI et al., 2018). A PCR também permite a detecção

precisa de cepas de diferentes microrganismos com diferentes fenótipos (SHAHI et al., 2018).

CAPÍTULO 1 – ARTIGO

Título do artigo: Caracterização estrutural e gênica de um novo peptídeo antifúngico obtido de *Penicillium crustosum*

Juliana Beal Menegotto^a, Lucas F. Ribeiro^b, Rita de Cássia Garcia Simão^a, Alexandre Maller^a, Marina Kimiko Kadowaki^a, José Luis da C. Silva^{a*}

a) Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel-Pr, Brasil

b) Universidade de São Paulo, USP, Brasil

Resumo

Para este estudo um novo peptídeo antifúngico PcAFP (MM 6,48 kDa; pl 8,83) foi obtido do sobrenadante do cultivo do fungo *Penicillium crustosum*. O gene codificante do peptídeo PcAFP foi confirmado a partir da comparação com seu homólogo descrito em *Penicillium chrysogenum* PgAFP. PcAFP. É um pequeno peptídeo rico em cisteínas consistindo em 58 resíduos de aminoácidos em sua forma madura. A proteína imatura AFP de *P. crustosum* apresentou 95,65% de identidade com a proteína antifúngica de *P. chrysogenum*, enquanto o peptídeo maduro apresentou 98,28% de identidade com PgAFP através de análises *in silico*. A modelagem molecular da estrutura terciária da forma madura revelou detalhes da estrutura conservada presente nos AFP, tal como o motivo barril β estabilizado por 3 pontes dissulfeto e o motivo conservado λ -core. Em adição, a análise do extrato em Tricina SDS-PAGE mostrou o provável peptídeo de 6,9 kDa, valor próximo da massa molecular predita de 6,48 kDa do peptídeo maduro. Ensaio de atividade antimicrobiana realizados por microdiluição, em caldo com o extrato bruto obtido do meio de cultivo, mostraram atividade contra *Candida albicans*. Esses resultados obtidos mostraram a conservação do gene PcAFP e alta identidade com a proteína antifúngica PgAFP descrita em *P. chrysogenum*. Essas características estruturais e bioquímicas tornam PcAFP um novo candidato para futuras investigações que poderão auxiliar no desenvolvimento de novos compostos antifúngicos.

Palavras-chave: gene AFP, *Penicillium crustosum*, Peptídeos Antifúngicos, PCR.

1. Introdução

Nos últimos anos, o surgimento de microrganismos resistentes a antifúngicos sintéticos tem causado preocupações e aumentado o número de casos por infecções de pacientes imunocomprometidos. É alarmante o surgimento de cepas bacterianas multirresistentes aos antibióticos de última geração. Em paralelo, os fungos

filamentosos resistentes estão nesta mesma situação (GALGÓCZY; KOVÁCS; VÁGVÖLGYI, 2010). A crescente incidência de infecções causadas por fungos filamentosos em pacientes imunocomprometidos tem gerado novos desafios em busca de moléculas bioativas que sejam eficientes no combate a fungos resistentes (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

Os fungos são produtores de uma gama de biomoléculas bioativas, dentre elas, destacam-se as proteínas semelhantes às defensinas que são secretadas por muitas espécies de fungos e apresentam potente atividade antimicrobiana (DELGADO et al., 2015).

Esses peptídeos diferem em tamanho molecular, potência e espectro de atividade (KOVÁCS et al., 2011; FARUCK; YUSOF; CHOWDHURY, 2016). Os Peptídeos Antimicrobianos (AMPs) de ascomicetos (RODRÍGUEZ-MARTÍN et al., 2010) são partículas bioativas com pesos moleculares na faixa de 1,3 kDa a 30 kDa (FARUCK; YUSOF; CHOWDHURY, 2016), apresentam caráter básico por possuírem alto conteúdo de arginina e resíduos de lisina (DELGADO et al., 2015). A presença de seis a oito resíduos de cisteína e várias pontes dissulfeto são suas principais características comuns (KOVÁCS et al., 2011). As proteínas antifúngicas semelhantes às defensinas que existem tipicamente em fungos filamentosos podem ser distinguidas em dois grupos, de acordo com suas sequências conservadas de aminoácidos: proteína de bolha (GALGÓCZY et al., 2013) e proteína antifúngica (TU et al., 2016).

As proteínas do grupo AFP contêm de seis a oito cisteínas que formam ligações dissulfeto intramoleculares e estabilizam uma conformação antiparalela de folha β flanqueada por um segmento helicoidal, também denominado motivo α/β estabilizado com cisteína ($CS\alpha/\beta$) (DELGADO et al., 2016), formando uma topologia de barril β (GALGÓCZY et al., 2013; TU et al., 2016). Estas proteínas são sintetizadas como pré-proteínas e após processamento proteolítico apresentam massa molecular de 5,8 a 6,6 KDa. Apesar de possuírem mecanismo de ação e aspectos estruturais similares, elas apresentam baixa similaridade na sequência de aminoácidos (KOVÁCS et al., 2011). Os AFPs inibem o crescimento de vários fungos patogênicos, incluindo *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* (KAISERER et al., 2003) e algumas espécies *dermasthyte* (GALGÓCZY et al., 2008; PALICZ et al., 2013).

O fungo *Penicillium chrysogenum* produz a proteína antifúngica PgAFP com potente atividade antifúngica (RODRÍGUEZ-MARTIN et al., 2010). O PgAFP é uma

proteína de baixo peso molecular (6,5 kDa), básica e rica em cisteína, cuja sequência de aminoácidos N-terminal tem uma homologia com outras proteínas antifúngicas produzidas por outros fungos (RODRÍGUEZ-MARTIN et al., 2010; MARX et al., 1995).

Penicillium crustosum foi descrito pela primeira vez em 1930 por Thom, sofrendo ao longo do tempo algumas variações taxonômicas e de nomenclatura, mas, hoje, tem base sólida na identificação como *P. crustosum* (SONJAK et al, 2005). Esta espécie produz uma gama de metabólitos secundários bem caracterizados, contudo, ainda não foi descrita qualquer proteína antifúngica em *P. crustosum*.

Em nosso trabalho foi utilizado o genoma de *Penicillium chrysogenum* e a sequência do gene PgAFP GQ911150.1, espécie, que em estudos prévios, tem demonstrado atividade antimicrobiana, como referência para buscar através de técnicas de biologia molecular uma proteína homóloga no fungo isolado de região de mata atlântica *Penicillium crustosum* FP11.

2. Material e Métodos

2.1 Cepas microbiológicas

A cepa de *Penicillium crustosum* FP11 foi isolada do Solo do Refúgio Biológico de Bela Vista e previamente identificada, número de acesso do NCBI KM065878 (DE SOUZA SILVA et al., 2016). As cepas bacterianas e leveduriformes utilizadas nos testes de atividade antimicrobiana foram cedidas pelo setor de microbiologia do Laboratório Central do Hospital Universitário do Oeste do Paraná.

2.2 Condições de crescimento do fungo *Penicillium crustosum*

O fungo filamentoso *P. crustosum* foi cultivado no meio AFPIM, que contém componentes capazes de estressar o microrganismo a produzir peptídeos (meio de indução de proteínas antifúngicas; 1,5% de amido, 1% de extrato de carne, 2% de peptona, 0,5% de cloreto de sódio e 1% de etanol) (KOVÁCS et al., 2011; GALGÓCZY et al., 2013), submetido a uma rotação em *shaker* de 180 rpm à 28°C durante 7 dias, de acordo com Marx (2004) e Kovács et al. (2011). Para condições de controle, utilizou-se um meio AFPIM sem o fungo.

Em contrapartida, como um comparativo, foi utilizado o meio EMB (Caldo extrato de malte; 2% de extrato de malte, 2% de glicose e 0,1% de peptona) (ACOSTA

et al., 2009; RODRÍGUEZ-MARTÍN et al., 2010) sob as mesmas condições citadas acima.

2.3 Extração de DNA do micélio do fungo *P. crustosum*

Para a extração do DNA genômico do micélio, o meio de cultura preparado foi o EMB, de acordo com Acosta et al., 2009. O fungo foi inoculado e mantido em agitação por 180 rpm, a 28°C, durante 18 horas. O protocolo de extração utilizado seguiu a metodologia de Bueno (2018) com modificações. A cultura foi centrifugada a 5000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, e o *pellet* foi coletado em um microtubo DNase e RNase livre, de 1,5 mL até o volume de 0,5 mL. Adicionou-se 600 µL da solução de extração (EDTA 0,05M; SDS 1%) e misturou-se delicadamente.

Posteriormente, foram adicionadas pérolas de vidro até a metade do microtubo e agitada em vórtex por 15 minutos. Em seguida, foi incubado durante 20 minutos em banho seco a 66°C sob agitação de 800 rpm. Centrifugou-se a 13000 rpm, por 10 minutos, a 25°C. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo. Então, adicionou-se 50 µL de RNase 20mg/mL e misturou-se delicadamente. Incubou-se durante 60 minutos, a 37°C, sob agitação de 500 rpm.

Em seguida, foram adicionados 300 µL de fenol e misturados delicadamente por inversão. Novamente, submeteu-se à centrifugação de 13000 rpm, durante 10 minutos, a 25°C. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e em seguida 400 µL de clorofórmio (álcool isoamílico, 24:1) foram adicionados e centrifugados a 13000 rpm durante 5 minutos, a 25°C. Mais uma vez, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo e essa última etapa foi repetida. Em outro microtubo, foi coletado o sobrenadante e adicionados 63 µL de acetato de potássio 5M (pH 4,8). A mistura foi incubada, em banho seco, a 2°C, por 35 minutos. De novo, centrifugado a 13500 rpm, por 5 minutos, a 4°C.

Finalmente, o sobrenadante resultante dessa etapa foi utilizado com adição de 1 mL de etanol 100%, gelado e misturado delicadamente. Mais uma vez, foi submetido à centrifugação, a 13500 rpm, durante 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 500 µL de etanol 70% gelado foi adicionado ao precipitado e a última etapa de centrifugação/adição de etanol gelado 70% centrifugação foi repetida. Outra vez, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi totalmente seco a 35°C. Para finalizar, foi ressuspendido em 50 µL de água MilliQ. O DNA foi quantificado em

espectrofotômetro a 260 nm (GRIFFITHS et al., 2000) e uma alíquota foi aplicada em gel de agarose 1%.

2.4 Desenho e Síntese dos primers para Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram utilizados primers desenhados a partir do genoma do *P. chrysogenum*, no qual já foi descrita a presença do peptídeo antifúngico PgAFP (RODRÍGUEZ-MARTÍN et al., 2010). Foram testados inicialmente os primers PgAFP Fwd 5'-ATGCAGATCACCAGCATTGCC-3' e PgAFP Rev 5'-TCAAACCTGGGGTCTGGCAGTC-3'.

Posteriormente, os primers PR2 5'-CGCCAGTTACGAGACACACT-3', PR4 5'-CCGAACGAGTGTGGTGATAA-3' e PF3 5'-CCGTGGGGCAGATCAGTAG-3' foram desenhados a partir da região *up* e *downstream* do gene PgAFP do *P. chrysogenum*, a fim de obter produtos de PCR para completar toda a região do gene PcAFP no *P. crustosum*.

Foram utilizados os programas *online* da plataforma *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *Integrated DNA Technologies* (IDT) e *Joint Genome Institute* (JGI Portal).

2.5 Reação de PCR e Purificação dos Produtos de PCR

2.5.1 Reações de PCR com DNA genômico de *P. crustosum*

Para a realização da PCR, foram utilizados os seguintes reagentes e condições: 2,5 µL de Tampão de amostra, 1 µL de cada primer 10pmol, 1 µL de dNTPs, 1 µL de DNA 100ng/µL, 1 µL MgCl₂ 50mM, 0,5 µL de Taq Polimerase e 17 µL de Água DEPC 0,1%, totalizando 25 µL de amostra para a reação. O termociclador foi programado para 95°C durante 2 minutos. Em seguida, foram repetidos 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, por último 72°C para a extensão final e 4°C para o *Hold*. Os primers utilizados para as reações de PCR foram: PgAFP Fwd/Ver, para amplificação do gene PcAFP completo, e os primers PR2, PR3 e PR4 foram otimizados, para amplificação de produtos para cobrir regiões a montante e jusante do gene PcAFP.

Os resultados foram visualizados em gel de agarose a 1%, aplicando 5 µL de cada amostra, corrido com tampão TAE 1X a 100V e as bandas foram visualizadas em transiluminador UVP DigiDoc - BioImaging Systems®.

2.5.2 Purificação e sequenciamento dos produtos de PCR

Reações das PCR com os mesmos parâmetros do item 2.5.1 foram realizadas, a fim de conseguir um maior volume de amostra para aplicação no gel e purificação dos produtos de PCR.

Aplicou-se 50 µL de amostra amplificada por PCR em gel de agarose 2%, correu em tampão TAE 1X a 100V, as bandas foram visualizadas em luz UV e o recorte do gel também foi feito sob emissão de luz UV. Após recortado, seguiu-se o protocolo do kit de purificação *PureLink – Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen®)*.

Reações de PCR foram feitas com os primers PR2, PR4 e PF3 e purificadas. Esses produtos foram encaminhados para realização do sequenciamento. Os produtos de PCR purificados foram encaminhados para a empresa HELIXXA® e ACTGene®, de acordo com as recomendações exigidas.

2.6. Análise da Sequência de DNA genômico e modelagem do peptídeo PcAFP

As sequências obtidas foram submetidas à análise de alinhamento com o auxílio do programa de bioinformática *Clustal Omega*. Neste, foram comparadas com o genoma e o gene PgAFP do *P. chrysogenum* para montagem da sequência completa do gene PcAFP.

A proteína foi predita, a partir da sequência de aminoácidos do gene PcAFP, obtida com a ferramenta Translate do ExPasy (Bioinformatics Resource Portal) e a estrutura terciária foi modelada com o software PyMol. A massa molecular e o pI da proteína madura foram preditos com a ferramenta para calcular o pI/mw do ExPasy (Bioinformatics Resource Portal). O peptídeo sinal foi pesquisado com SignalP versão 5.0.

2.7. Produção do peptídeo PcAFP a partir do meio de cultivo

Primeiramente foi separado o sobrenadante do micélio fúngico, crescido em caldo AFPIIM (KOVÁCS et al., 2011) e em caldo EMB (ACOSTA et al., 2009; RODRÍGUEZ-MARTÍN et al., 2010), sob as condições adequadas de temperatura e

agitação (GALGÓCZY et al., 2013). A separação do filtrado extracelular foi feita através de filtração com bomba a vácuo.

Em seguida, o extrato bruto extracelular foi liofilizado no equipamento Terroni® LT-1000/8, a fim de concentrar e reduzir o máximo possível do volume. Posteriormente, foi precipitado com 60% de sulfato de amônio por 18 horas, centrifugado a 10000 x g, durante 30 minutos, a 4°C. O precipitado foi acondicionado a -20°C e o sobrenadante foi dialisado (Dialysis tubing, benzoylated Avg. flat width 32 mm, 1.27in., Sigma-Aldrich® - corte molecular de 2 kDa) por mais 18 horas. A amostra dialisada foi liofilizada e ressuspensa em 500 µL de água deionizada. Na sequência, foi passada em coluna com filtro de corte molecular de 10 kDa (Sartorius®, Vivaspin®).

Essas etapas foram realizadas com a finalidade de retirar todos os interferentes e facilitar o isolamento da molécula estudada. Para evitar a possível perda do peptídeo em alguma dessas etapas, todas as frações precipitadas e filtradas foram guardadas em freezer -20°C.

Como comparativo para este teste, foi realizado o cultivo do fungo em meio EMB sob as mesmas condições de crescimento no meio estressante e as mesmas condições de tratamento. Para controle dos peptídeos produzidos pelo fungo foi realizado um teste sob as condições citadas acima, porém sem inóculo do fungo. Posteriormente, uma alíquota de cada amostra foi aplicada em gel de poliacrilamida Tricina SDS-PAGE a 16%.

2.8 Dosagem de proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida Tricina SDS- PAGE

A dosagem proteica das amostras foi realizada através da metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina soro bovina (BSA) como padrão. Foi realizada eletroforese de proteínas com gel de separação 16% de Poliacrilamida Tricina SDS-PAGE, de acordo com Schägger (2006). As amostras foram preparadas na proporção de 3:1, com o tampão de amostra, acrescidas de 1 µL de beta-mercaptoetanol, fervidas durante 5 minutos e aplicadas no gel. A corrida ocorreu nos primeiros 20 minutos, a 90V para entrada da amostra no gel de empilhamento 4%. Na sequência, a 120V no gel de separação até atingir 1cm do final do gel de separação.

A coloração foi realizada com Coomassie Blue, durante 1 hora sob agitação. A solução descorante utilizada foi aquosa composta de 30% de álcool etílico e 7% de

ácido acético, sendo trocada a cada 30 minutos até que o gel fosse descorado e as bandas visualizadas.

2.9 Teste de atividade antimicrobiana

Para realização dos testes de sensibilidade antimicrobiana, foram utilizadas bactérias e levedura cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário do Oeste do Paraná. Entre elas estão *Staphylococcus aureus* (SA), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Escherichia coli* (EC), *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (MRSA), *Escherichia coli* β -lactamase de Espectro Estendido (ESBL), *Klebsiella pneumoniae* Resistente a Carbapenêmicos (KPC) e a levedura *Candida albicans* (Cand).

O extrato utilizado para realização dos testes, foi o obtido através do inóculo do fungo no caldo AFPIM. Foi esterilizado através de filtração com filtro de seringa 0,22 μ m. O inóculo bacteriano foi padronizado seguindo a escala 0,5 de McFarland.

2.9.1 Microdiluição em caldo

A metodologia utilizada para esse experimento foi a padronizada pelo CLSI (2003).

Foi utilizada uma placa de microdiluição estéril, contendo 96 poços, arranjados em colunas de 1 a 12 e linhas de A a H. Cada microrganismo corresponde a uma linha e cada diluição corresponde a uma coluna, conforme Quadro 1.

Quadro 1. Mapa demonstrativo de cada microrganismo com suas respectivas diluições.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SA	A	CP	EST	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
PA	B	CP	MHB	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
EC	C	CP		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
KP	D	CP		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
MRSA	E	CP		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
ESBL	F	CP		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
KPC	G	CP		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
Cand	H	CP		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024

CP = Controle Positivo; EST = Controle de Esterilidade do extrato; *Staphylococcus aureus* (SA); *Pseudomonas aeruginosa* (PA); *Escherichia coli* (EC); *Klebsiella pneumoniae* (KP); *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA); *Escherichia coli* β -lactamase de Espectro Estendido (ESBL); *Klebsiella pneumoniae* Resistente a Carbapenêmicos (KPC); *Candida albicans* (Cand).

Na coluna, 1 foram adicionados 100 μ L de Caldo Müller-Hinton (MHB) em cada poço. Posteriormente, 5 μ L do inóculo padronizado foram adicionados ao meio, seguindo a respectiva ordem: colunas A, B, C, D, E, F, G e H com as bactérias SA, PA, EC, KP, MRSA, ESBL, KPC e Cand, como um controle positivo de crescimento. Para garantir o controle de esterilidade do extrato e do meio, foram depositados 100 μ L de cada nos poços A2 e B2, respectivamente.

Diluições do extrato na razão 2 foram feitas. Foram pipetados 100 μ L de MHB em todos os poços a partir da terceira coluna em diante. Então, 100 μ L do extrato foram adicionados em todas as linhas da coluna 3 e homogeneizados com a micropipeta, resultando em uma diluição 1/2, 100 μ L. Desta diluição foram retirados e repassados para a coluna seguinte (diluição 1/4). Assim sucessivamente até chegar à última coluna. Desse modo, 100 μ L deste último poço foram desprezados, dando-nos uma diluição final de 1/1024. Com a placa pronta, foram pipetados 5 μ L no inóculo de cada bactéria, em cada poço, nas suas respectivas linhas, da mesma forma que foram pipetados para obter o controle positivo de crescimento.

Após todas as pipetagens, com a placa pronta, esta foi lida em 600 nm e os valores foram anotados para comparação.

A placa foi coberta e envolvida por papel filme e incubada a 37°C, durante 18 horas. Imediatamente após a incubação, a placa foi submetida à leitura a 600 nm, novamente.

3 RESULTADOS

3.1 Extração de DNA do *P. crustosum* e isolamento do gene PcAFP

Após a extração do DNA fúngico nas condições de crescimento ideais, o DNA genômico foi visualizado em gel de agarose 1% para a comprovação da qualidade e pureza. Na Figura 1-A, pode-se observar a amplificação do produto de PCR referente ao gene PcAFP caracterizado pela banda de 405 pb inferior mais proeminente no gel e a amplificação dos fragmentos com os primers desenhados na região a montante e jusante do gene PgAFP para cobrir todo o gene PcAFP (Figura 1-B).

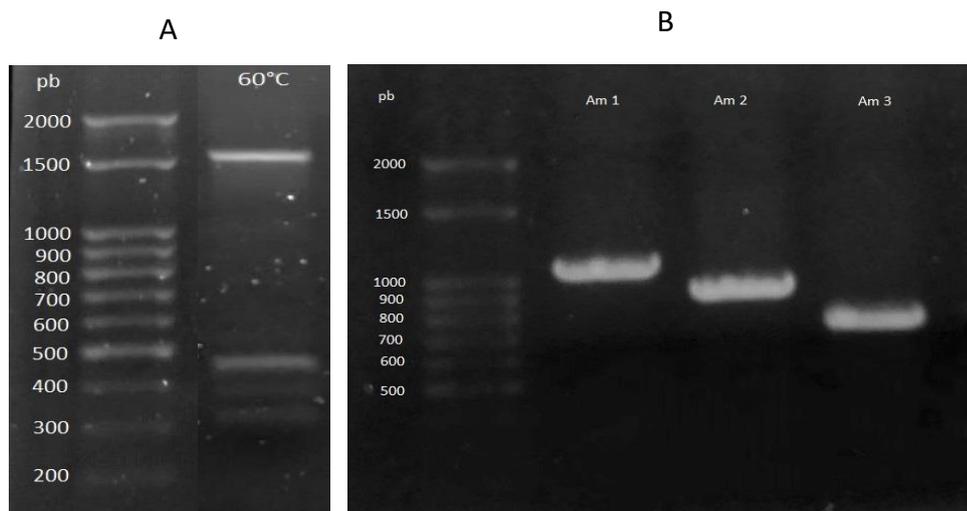


Figura 1 **A**- Fragmento do gene PcAFP de 405 pb amplificado indicado com os primers Forward/Reverse do gene PgAFP e **B**- amostras amplificadas por PCR com os primers PR2/PF3 Am1, Am2 (PR4/PF3) e Am3 (Prev/PF3). A amostra Am2 de 900 pb foi sequenciada para completar as regiões 5' e 3' do gene PcAFP. Padrão λ /HindIII em A; padrão Ludwig Ladder 100 pb em B e C.

3.2 Análise da sequência do gene PcAFP e comparação à família AFPs

O alinhamento com o gene PgAFP de *P. chrysogenum* (GQ911150.1) foi realizado para mostrar a homologia da proteína antifúngica em nível gênico (figura 2). A sequência genômica de 405 pb de *P. crustosum*, foi utilizada para uma busca no Blastn para comprovação da homologia com o gene de *P. chrysogenum*. A análise revelou identidade de 96,30% ao gene PgAFP de *P. chrysogenum* com e-value 0.0,

demonstrando alta identidade com esse gene. Os AFPs são conservados estruturalmente, mas apresentam variabilidade na sequência primária de aminoácidos de 31,6-91,4% (KOVÁCS et al., 2011). Esse resultado mostra que os genes PgAFP e PcAFP são quase idênticos em nível gênico. A sequência obtida do gene de *P. crustosum* foi depositada no NCBI com o número de acesso MN171487.

```

Pchrysogenum    ATGCAGATCACCAGCATTGCCATTGTCTTCTTCGCCGCAATGGGTGCGGTTGCTAACCCC 60
Pcrustosum      ATGCATATTACTAGCATTGCCATTGTCTTCTTCGCCGCAATGGGCGCGGTTGCTAGCCCC 60
***** ** * *****

Pchrysogenum    ATCGCGAGGGAGTCGGACGATCTTGATGCCCGAGACGTACAGCTTAGTAAATTCGGAGGA 120
Pcrustosum      ATCGCGACCGAGTCGGACGATCTTGATGCCCGAGACGTACAGCTTAGTAAATTCGGAGGA 120
***** *****

Pchrysogenum    GTAAGTTCTTCTTACAAGACGTCTATATAGAAA-TAGCACTAACCTTTCTGAACCACTTT 179
Pcrustosum      GTAAGTTCTTCTTATAAGATGTCTATATAGAAAATAGCAGAAACCTTTCTGAACCGCTTT 180
***** ** * *****

Pchrysogenum    ACAGGAATGCAGCTTGAAACACAACACGTGCACATACCTAAAGGGTGGAAAGAACCATGT 239
Pcrustosum      ACAGGAATGCAGCTTGAAACACAACACGTGCACATACCTAAAGGGTGGAAAGAACCATGT 240
***** *****

Pchrysogenum    AGTCAATTGCGGTTTCGGCCGCCAACAAGAAGGTAGGTTCCGATTTCGATTCTGGGGCCAATT 299
Pcrustosum      AGTCAATTGCGGTTTCGGCCGCCAACAAGAAGGTAGATTCCGATTTCGATTCTGGGGCCAATT 300
***** *****

Pchrysogenum    GATTTGTTCTTATCATTTAATCTTCATCTACAGTGCAAGTCTGATCGCCACCACTGTGAA 359
Pcrustosum      GATTTGTTCTTATCATTTAATCTTCATCTACAGTGCAAGTCTGATCGCCACCACTGTGAA 360
***** *****

Pchrysogenum    TACGATGAGCACCACAAGAGGGTTGACTGCCAGACCCCAAGTTTGA 404
Pcrustosum      TACGATGAGAACCACAAGAGGGTTGACTGCCAGACCCCAAGTTTGA 405
***** *****

```

Figura 2 Alinhamento da sequência completa do gene *afp* de *P. crustosum* e da sequência GQ911150.1 *Penicillium chrysogenum* cepa RP42C proteína antifúngica com o software Clustal W.

Na figura 3, pode ser observado que o gene PcAFP é interrompido por *íntrons* com sítios de *splicing* conservados que, após o mecanismo de *splicing*, gera um mRNA de 279 que codificará a proteína com 92 aminoácidos quase idêntica ao gene PgAFP (RODRÍGUEZ-MARTÍN et al., 2010). Essa sequência foi traduzida com a ferramenta do *expasy translate tool* (<https://web.expasy.org/translate/>) a partir do quadro de leitura aberta para o gene PcAFP. Essas proteínas, em geral, são pré-proteínas que contêm um peptídeo de sinal para secreção e um pro-peptídeo que é removido após a secreção (KOVÁCS et al., 2011).

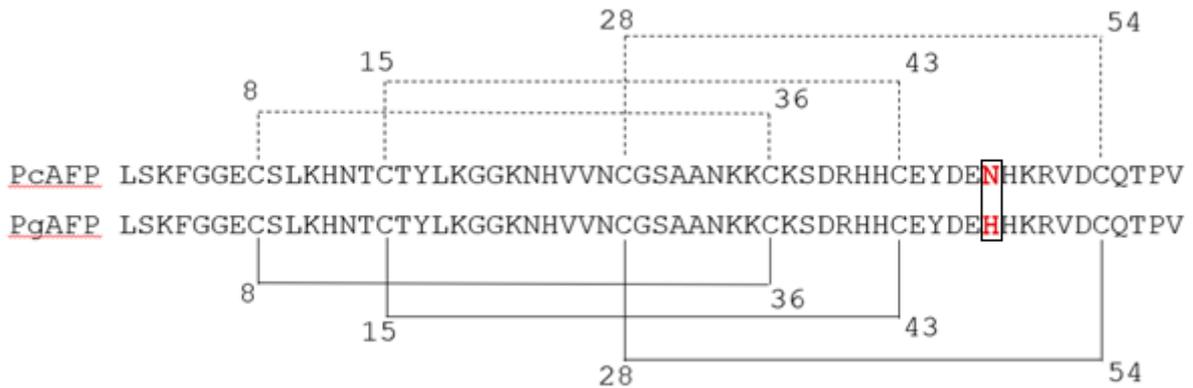


Figura 5 Proteína madura do PgAFP de *P. chrysogenum* e PcAFP de *P. crustosum* mostrando as pontes dissulfeto formadas entre os resíduos de cisteína e o único resíduo de aminoácido diferente destacado em letra vermelha.

A comparação filogenética também mostrou que a proteína PcAFP pertence ao grupo dos AFP do gênero *Penicillium*, sendo muito semelhante e agrupada com a proteína PgAFP de *P. chrysogenum* como pode ser observado na figura 6.

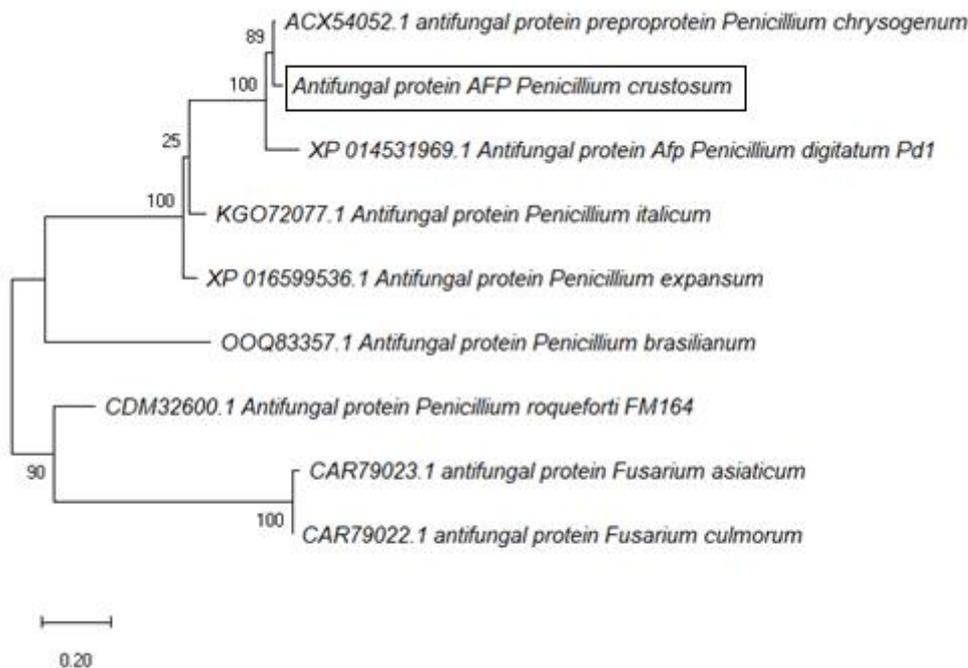


Figura 6 Análise filogenética obtida pelo método da Máxima Verossimilhança. A porcentagem de árvores nas quais os taxa foram agrupados foi obtida automaticamente aplicando algoritmos Neighbor-Join e BioNJ e a matriz de distâncias usando um modelo JTT. A escala representa 0.20 substituições por posição dos aminoácidos. Esta análise envolveu 10 sequências de aminoácidos das proteínas do grupo AFP obtidas do *GenBank*. As sequências das proteínas antifúngicas do gênero *Fusarium* foram utilizados como grupo externo. Houve um total de 95 posições no conjunto de dados. A Análise evolutiva foi conduzida em MEGA X.

3.3 Estrutura terciária predita da proteína PcAFP de *P. crustosum*

As experiências de previsão *in silico* do gene revelaram que o peptídeo PcAFP tem propriedades semelhantes às características dos peptídeos antifúngicos tipo β -defensinas como o grupo PAF. Tais como a presença de pontes dissulfeto, um alto ponto isoelétrico (pI) e a conformação barril β (GALGÓCZY et al., 2013).

A figura 7 mostra a estrutura terciária da proteína PcAFP de *P. crustosum* com a estrutura conservada das pontes dissulfeto e das 5 folhas β características e que determinam a estrutura tipo β barril, como já relatado (DELGADO et al., 2016; GALGÓCZY; KOVÁCS; VÁGVÖLGYI, 2010; KOVÁCS et al., 2011; RODRÍGUEZ-MARTÍN et al., 2010; VÁRADI; TÓTH; BATTÁ, 2018). Nestas, os AFPs apresentam esta estrutura terciária. Na figura 7-A, a estrutura da pré-proteína é exposta e, após secreção, sofre processamento para sua forma madura, mostrada na imagem 7-B. Na imagem 7-C, é destacado o motivo λ -core conservado nos AFPs dos Eurotiomycetes, ao qual é atribuída a atividade contra a levedura patogênica humana *Candida albicans* (SONDEREGGER et al., 2018).

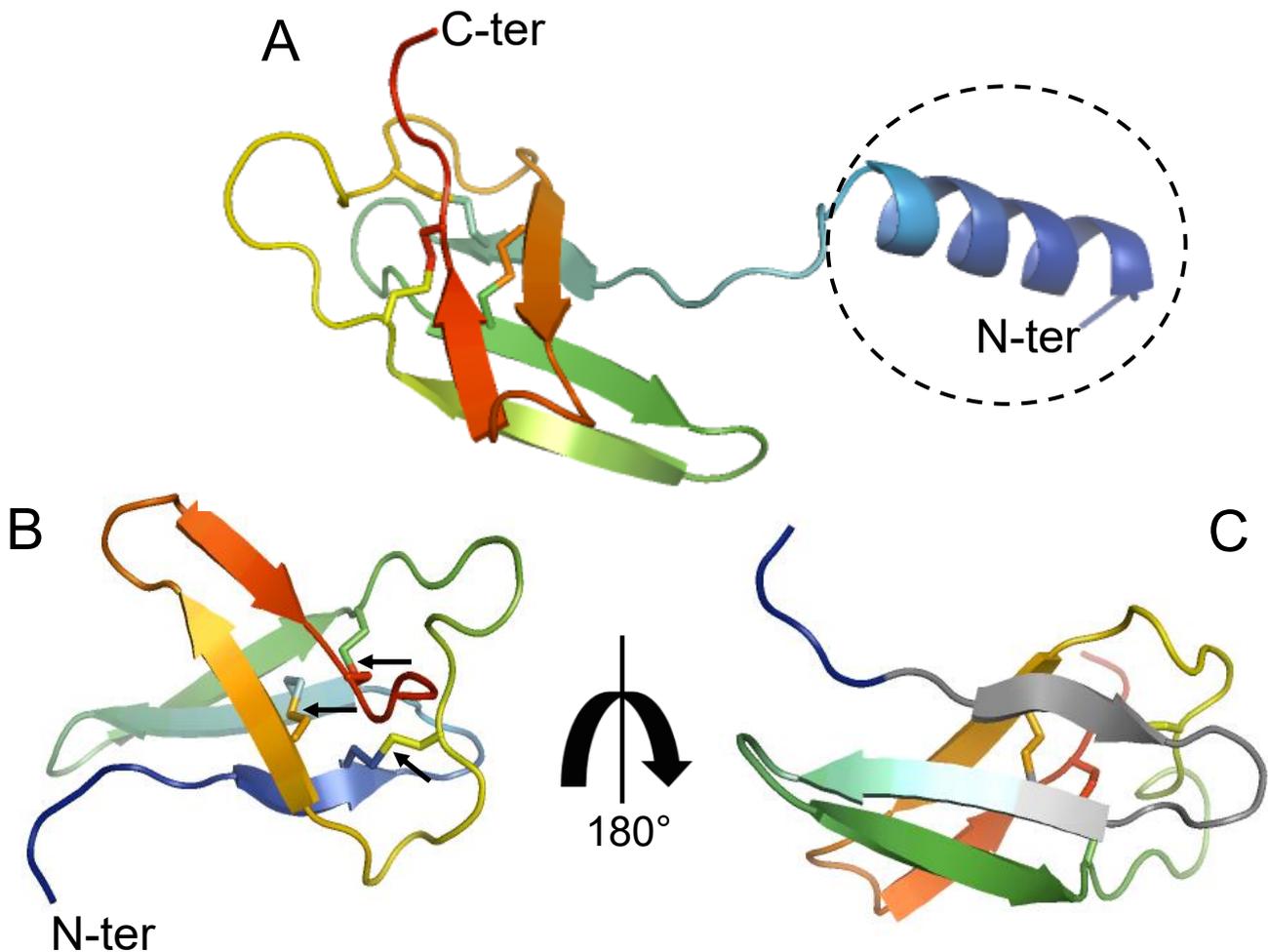


Figura 7 Estrutura 3D do PcAFP gerada por modelagem molecular, usando o software PyMol. (A) Representação da fita do modelo do PAF. O N-terminal (N-ter) é mostrado em azul, e o C-terminal (C-ter) é mostrado em vermelho. (B) Representação da fita do modelo do PAF. O N-ter é mostrado em azul, e o C-ter é mostrado em vermelho. Existem três pontes dissulfeto indicadas pelas setas. (C) Orientação destacando o motivo γ -core (cinza).

3.4 Características bioquímicas do peptídeo PcAFP

Com o extrato bruto obtido a partir da incubação com o fungo *P. crustosum* no meio AFPIM, durante 7 dias, foi realizada a liofilização, seguida de precipitação com 60% de Sulfato de Amônio (SuAm). Após essa etapa, o sobrenadante foi dialisado e liofilizado novamente. Então a amostra foi congelada e aplicada no gel de poli-acrilamida-tricina SDS-PAGE 16%, descrito como amostra 3 na Figura 8.

Em contrapartida, um segundo teste incubando o fungo em meio EMB, foi aplicado no gel, indicado como amostra 4. Para um controle negativo, utilizamos apenas o meio de cultura AFPIM, sem inóculo do fungo, visto que é um meio rico em

proteínas, para garantir que o peptídeo existente não seja adicionado como substrato no preparo do meio, ao invés de ser produzido pelo microrganismo.

Foi visualizada uma banda proeminente abaixo de 10 kDa na amostra de incubação em meio AFPIM, indicado pela seta na figura 8, o que torna sugestivo a presença do peptídeo na amostra, na qual não foi observada banda semelhante quando utilizado o meio EMB.

A migração relativa foi realizada com os valores das distâncias de cada banda dos dois padrões e o peso molecular estimado do peptídeo PcAFP resultou em aproximadamente 6,9 kDa como mostrado na figura 8, obtida de um outro gel com a amostra. Com a ferramenta ExPASy, foi obtido um pI e Massa Molecular teórica da proteína madura de 8,83 e 6,48 kDa, respectivamente.

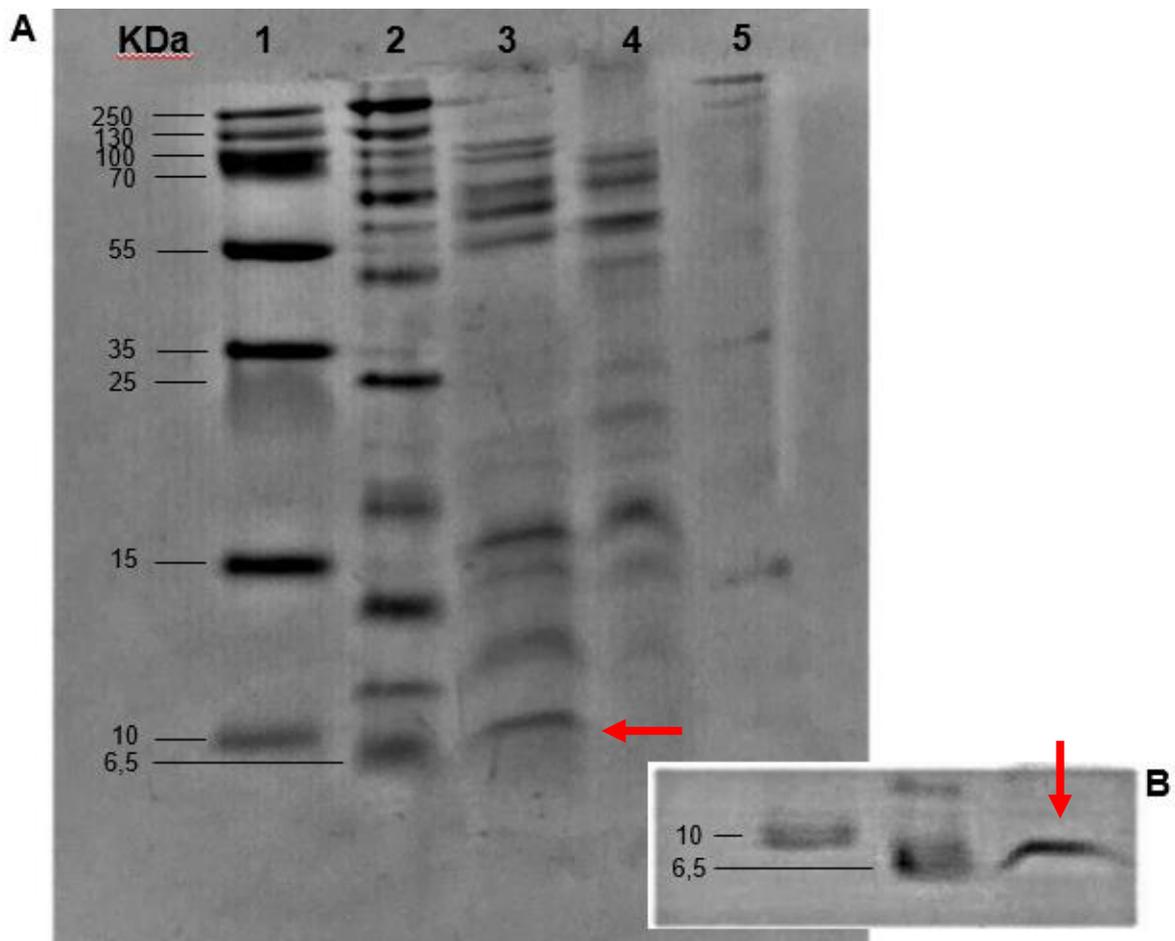


Figura 8. Gel de poliacrilamida tricina SDS-PAGE 16% corado com Coomassie Blue (A). Foi utilizado marcador de peso molecular DeStreak – GE Healthcare®. 1) Marcador de peso molecular Thermo Scientific® PageRuler®. 2) Marcador de peso molecular Amersham Biosciences®. 3) Amostra AFPIM. 4) Amostra EMB e 5) Amostra AFPIM sem inóculo de fungo. (B) Foto de outro gel mostrando de maneira mais nítida o tamanho da banda equivalente ao PcAFP.

3.5 Teste de atividade antimicrobiana

3.5.1 Microdiluição em caldo

O teste de microdiluição em caldo foi realizado, de acordo com o item 2.9.1. A diferença dos valores das absorvâncias obtidas antes e depois do período de incubação estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2. Valores das diferenças de absorvâncias obtidas no tempo zero e depois da incubação do cultivo em placa a 37 °C por 16 horas.

				1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SA	A	CP 0,269	EST 0,0	0,000	0,000	0,008	0,029	0,453	0,564	0,602	0,663	0,700	0,777
PA	B	CP 0,730	MH 0,0	0,860	0,861	0,884	0,885	0,924	0,994	1,063	1,426	1,503	1,769
EC	C	CP 0,566		0,593	0,697	0,735	0,807	0,810	0,847	0,935	0,968	0,969	0,991
KP	D	CP 0,518		0,901	0,940	0,947	0,971	0,990	1,015	1,016	1,177	1,224	1,227
MRSA	E	CP 0,192		0,372	0,408	0,503	0,528	0,635	0,827	0,925	0,947	1,006	1,027
ESBL	F	CP 0,303		0,625	0,650	0,732	0,756	0,811	0,858	0,872	0,882	0,994	1,099
KPC	G	CP 0,474		0,536	0,612	0,678	0,760	0,782	0,799	0,810	0,935	0,951	0,965
Cand	H	CP 0,073		0,031	0,069	0,071	0,075	0,100	0,129	0,205	0,531	0,583	0,629

De acordo com esses resultados, observou-se que houve inibição de crescimento para *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Para saber qual foi a Máxima Diluição Inibitória (MID), tomou-se como base o valor da diferença de absorvância obtida no inóculo do microrganismo com o meio de cultura (controle positivo) antes e depois da incubação. Assim, a diluição que obteve a diferença do valor de absorvância maior do que a diferença do controle positivo, foi a primeira que houve crescimento bacteriano, sugerindo que a diluição anterior seja a MID. Desta forma, a MID para SA foi 1/16 e para *Cand* foi 1/8.

Mesmo não havendo inibição efetiva dos outros microrganismos testados como esperado, observou-se um crescimento de forma gradativa, de acordo com a diluição do extrato bruto a ser testado. Esse achado sugere que há pouca quantidade do

peptídeo antimicrobiano no extrato bruto para realizar esse tipo de teste, certamente deveria estar purificado para afirmarmos sua atividade antimicrobiana.

4 DISCUSSÃO

O gene PcAFP do peptídeo investigado foi isolado do fungo *Penicillium crustosum* FP 11 KM065878. Para a amplificação inicial do gene PcAFP, foram sintetizados os primers extraídos do estudo de Rodríguez-Martín et al. (2010) e desenhados primers de região *up* e *downstream*, o qual resultou em uma sequência genômica de 405 pb. Com esta sequência, foi realizado alinhamento na plataforma Clustal Omega com o gene de PgAFP de *P. chrysogenum*, o qual apresentou 95,65% de homologia. Logo, foram comparadas as sequências para que fosse possível identificar as regiões de íntrons e éxons e obter a sequência codificante do peptídeo.

O segmento codificante obtido resultou em 279 pb e apresentou tamanho similar com outras proteínas antifúngicas produzidas por fungos (MARX, 2004; SKOURI-GARGOURI; GARGOURI, 2008). A análise deste segmento revelou toda a estrutura primária do PcAFP, pois foi traduzida em sequência de aminoácidos. Através da ferramenta PyMol, obteve-se o modelo predito desta proteína.

O tamanho pequeno destes íntrons comparado aos de mamíferos é uma característica típica de genes de fungos (GURR et al. 1987). O quadro de leitura aberto PcAFP codifica uma proteína imatura de 92 aminoácidos. Os primeiros 18 aminoácidos correspondem a uma sequência sinal prevista (RODRÍGUEZ-MARTÍN et al., 2010). Da mesma forma, os 16 aminoácidos dos resíduos 19-34 constituem uma pré-proteína que seria removida antes ou durante a liberação do PcAFP maduro (MARX et al., 1995). Pró-sequências desempenham um papel importante, impedindo a atividade da proteína antes da secreção. Como foi proposto para o PAF (MARX et al., 2008), a proteína madura deveria adotar sua conformação ativa após a pré-sequência ser clivada. Proteínas antifúngicas produzidas como pré-proteínas de ascomicetos incluem PAF, AFP e AcAFP (MARX et al., 1995; NAKAYA et al., 1990; SKOURI-GARGOURI; GARGOURI, 2008).

O PcAFP maduro deduzido possui 58 resíduos de aminoácidos. A massa molecular do PcAFP em gel de poliacrilamida foi de 6,9 kDa maior que a predita na ferramenta ExPasy de 6,48 kDa. Provavelmente, essa diferença dá-se pelo fato de o peptídeo ter migrado de forma anômala em SDS-PAGE, pois muitas características

das proteínas podem causar uma migração atípica. Isso pode ocorrer em SDS-PAGE por outras causas que não envolvem modificações pós-traducionais. Proteínas com pontos isoelétricos extremos podem apresentar um peso molecular aparentemente mais alto (cerca de 25% maior) devido a repulsões eletrostáticas que disponibilizam menos SDS para ligar-se e uma conseqüente diminuição em sua velocidade de migração (MONSTADT; HOLLDORF, 1990).

Essa característica catiônica, comum a proteínas antifúngicas de fungos (MARX, 2004), tem sido diretamente relacionada a uma forte atividade antimicrobiana (JIANG et al., 2008). Dado que a massa e o ponto isoelétrico são muito próximos aos das outras pequenas proteínas antifúngicas conhecidas a partir de fungos (MARX, 2004; SKOURI-GARGOURI; GARGOURI, 2008). O PcAFP parece pertencer a esse grupo de proteínas antifúngicas de ascomicetos.

A alta porcentagem de aminoácidos básicos na sequência deduzida (27,6%) é consistente com o pI de 8,8 estimado pela ferramenta ExPasy. Mesmo que essa ferramenta de predição possa não ser precisa para proteínas altamente básicas e pequenas (GASTEIGER, E. et al., 2005), o valor de pI revela uma carga positiva líquida sob condições fisiológicas, que é uma característica comum entre as proteínas antifúngicas dos fungos.

O modelo do PcAFP obtido mostrou uma estrutura com cinco cadeias β antiparalelas formando um β -barril compacto. A estrutura de PcAFP é estabilizada por pontes dissulfeto internas formadas por resíduos de cisteína (CAMPOS-OLIVAS et al., 1995; LACADENA et al., 1995). De fato, o PcAFP contém seis cisteínas conservadas no grupo de proteínas antifúngicas dos fungos. Portanto, sugere-se um padrão de pontes dissulfeto entre os pares de cisteínas 8–36, 15–43, 28–54.

No modelo tridimensional do peptídeo PcAFP, também foi possível detectar a presença do motivo λ -core presente nas proteínas AFP, este motivo confere atividade contra *Candida albicans* (SONDEREGGER et al., 2018). No ensaio de microdiluição em caldo, foi observada atividade contra *Candida albicans* na diluição $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{8}$, apesar de ter uma atividade considerável na diluição $\frac{1}{2}$. Essa atividade reforça a caracterização funcional do PcAFP como um peptídeo antifúngico com potencial aplicação em estudos futuros para desenvolvimento de novos compostos antifúngicos.

5 CONCLUSÃO

A expressão do peptídeo PcAFP pelo *P. crustosum* foi confirmada por meio de técnicas bioquímicas e com o auxílio das ferramentas Clustal W, PyMol e Blastn foi possível a identificação do gene PcAFP no genoma de *P. crustosum* e de suas características estruturais.

Peptídeos da família dos PAFs como o descrito neste trabalho, foram anteriormente descritos na literatura, produzidos por outros microrganismos e demonstraram ter atividade contra vários microrganismos.

Para o *P. crustosum* a purificação e caracterização bioquímica desse peptídeo servirá para um melhor entendimento da secreção, bem como o conhecimento de seu mecanismo de ação, considerando ser objeto de estudo para possível utilização no combate à resistência fúngica e bacteriana.

6 CONCLUSÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO

Por meio da abordagem utilizada, foi obtido resultado positivo para identificação de proteína de baixo peso molecular, caracterizada como suposto peptídeo antifúngico, entretanto, os resultados ainda necessitam de comprovação e estudos mais aprofundados.

Apesar de todas as dificuldades encontradas, salientamos que o desafio através de meio de cultura em condições de estresse, induziu a expressão do peptídeo PcAFP.

Este estudo é pioneiro na investigação da produção de peptídeo antimicrobiano por *P. crustosum*, lançando os primeiros resultados nesta importante área de pesquisa, que, no futuro, poderá gerar PAFs candidatos a novos antifúngicos e/ou antibióticos.

O PcAFP de *P. crustosum* é uma nova proteína antifúngica que apresenta características comuns ao grupo de proteínas antifúngicas pequenas, básicas e com cisteínas, formando as pontes dissulfeto e dando origem a conformação da proteína dos fungos. A região estrutural do gene PcAFP codifica como um precursor com um peptídeo de sinal e uma pré-proteína que não estão presentes na proteína madura. A caracterização do gene PcAFP permitirá o desenvolvimento de novas estratégias para promover a aplicação industrial do PcAFP em diferentes campos potenciais.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos revelam representantes importantes do gênero *Ascomycetes* em relação à produção de peptídeos antimicrobianos, grande parte possui genoma completamente decifrado. Em contrapartida, o representante *Penicillium crustosum*, ainda é carente de estudos genômicos e proteômicos.

Este trabalho abordou a detecção de peptídeo antifúngico, submetendo o fungo em estudo a um meio de cultura estressante, com o intuito de desafiá-lo a produzir o peptídeo em questão. Houve aparecimento de peptídeo em gel de policacrilamida, bem como foi detectado seu gene através de processos moleculares. Para confirmação da molécula, análises adicionais serão necessárias, para melhor comparar com os dados disponíveis na literatura e, assim, discutir mais profundamente os resultados.

8 REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO

ACOSTA, R. et al. Selection of antifungal protein-producing molds from dry-cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 1, p. 39–46, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição, 2003.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Módulo 5: Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos, MC Boas Práticas, 2008.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/objetivos.htm>. Acesso em: 09 mai. 2019.

BATTA, G. et al. Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF - A highly-stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*. **FEBS Journal**, v. 276, n. 10, p. 2875–2890, 2009.

BINDER, U. et al. The *Aspergillus giganteus* antifungal protein AFPNN5353 activates the cell wall integrity pathway and perturbs calcium homeostasis. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 209, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BUENO, I. K. **Caracterização das linhagens mutates do fungo *Trichoderma reesei* RUT-C30.** 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel.

CAI, H. Y.; CASWELL, J. L.; PRESCOTT, J. F. Nonculture Molecular Techniques for Diagnosis of Bacterial Disease in Animals: A Diagnostic Laboratory Perspective. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 341–350, 2014.

CAMPOS-OLIVAS, R. et al. Solution Structure of the Antifungal Protein from *Aspergillus giganteus*: Evidence for Cysteine Pairing Isomerism. **Biochemistry** p. 3009–3021, 1995.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86–96, 2017.

DELGADO, J. et al. Growth inhibition and stability of PgAFP from *Penicillium chrysogenum* against fungi common on dry-ripened meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 205, p. 23–29, 2015.

DELGADO, J. et al. Use of molds and their antifungal proteins for biocontrol of toxigenic molds on dry-ripened cheese and meats. **Current Opinion in Food Science**, v. 11, p. 40–45, 2016.

DELGADO, J. et al. Quantitative proteomics reveals new insights into calcium-mediated resistance mechanisms in *Aspergillus flavus* against the antifungal protein PgAFP in cheese. **Food Microbiology**, v. 66, p. 1–10, 2017.

DJORDJEVIC, J. T.; LEV, S. Fungal Secretion: The Next-Gen Target of Antifungal Agents? **Cell Chemical Biology**, v. 25, n. 3, p. 233–235, 2018.

FALCI, D. R.; DA ROSA, F. B.; PASQUALOTTO, A. C. Hematological toxicities associated with amphotericin B formulations. **Leukemia and Lymphoma**, v. 56, n. 10, p. 2889–2894, 2015.

FARUCK, M. O.; YUSOF, F.; CHOWDHURY, S. An overview of antifungal peptides derived from insect. **Peptides**, v. 80, p. 80–88, 2016.

GALGÓCZY, L. et al. Antifungal peptides homologous to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) are widespread among *Fusaria*. **Peptides**, v. 39, n. 1, p. 131–137, 2013.

GALGÓCZY, L. et al. In vitro activity of *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) and its combination with fluconazole against different dermatophytes. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 463–470, 2008.

GEISEN, R. P. *nalgioense* carries a gene which is homologous to the *paf* gene of *P. chrysogenum* which codes for an antifungal peptide. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 1–2, p. 95–101, 2000.

GOFFI, J. Y. [The Ethics of Animal Experimentation]. **J Int Bioethique**, v. 24, n. 1, p. 39–54, 88–9, Jan/Mar 2013.

GRIFFITHS, R. I. et al. Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5488–5491, 2000.

HAGEN, S. et al. The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 7, p. 2128–2134, 2007.

HAMIDI-ASL, E. et al. A bimetallic nanocomposite electrode for direct and rapid biosensing of p53 DNA plasmid. **Journal of Chemical Sciences**, v. 127, n. 9, p. 1607–1617, 2015.

HEGEDÜS, N.; MARX, F. Antifungal proteins: More than antimicrobials? **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 132–145, 2013.

HOWARD, S. J. et al. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 7, p. 1068–1076, 2009.

JOERGER, R. D. Alternatives to antibiotics: Bacteriocins, antimicrobial peptides and

bacteriophages. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 640–647, 2003.

KAISERER, L. et al. Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. **Archives of Microbiology**, v. 180, n. 3, p. 204–210, 2003.

KOVÁCS, L. et al. Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). **Peptides**, v. 32, n. 8, p. 1724–1731, 2011.

LACADENA, J. et al. Characterization of the Antifungal Protein Secreted by the Mould *Aspergillus giganteus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 324, n. 2, p. 273–281, 1995.

LEITER, É. et al. Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2445–2453, 2005.

LIMPER, A. H. et al. An official American Thoracic Society statement: Treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 183, n. 1, p. 96–128, 2011.

MARIA-NETO, S. et al. Understanding bacterial resistance to antimicrobial peptides: From the surface to deep inside. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1848, n. 11, p. 3078–3088, 2015.

MARX, F. et al. Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum paf* gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. **Gene**, v. 167, p. 167–71, 1995.

MARX, F. Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: A comparative study regarding, expression, structure, function and potential application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 2, p. 133–142, 2004.

MOHAMED, A. A. et al. Molecular characterization of a c-type lysozyme from the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 61, p. 60–69, 2016.

OBERPARLEITER, C. et al. Active Internalization of the *Penicillium chrysogenum* Antifungal Protein PAF in Sensitive Aspergilli. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3598–3601, 2003.

PALICZ, Z. et al. In vivo application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 269, n. 1, p. 8–16, 2013.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e383–e392, 2017.

RAUTENBACH, M.; TROSKIE, A. M.; VOSLOO, J. A. Antifungal peptides: To be or not to be membrane active. **Biochimie**, v. 130, p. 132–145, 2016.

RODRÍGUEZ-MARTÍN, A. et al. Characterization of the novel antifungal protein

PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. **Peptides**, v. 31, n. 4, p. 541–547, 2010.

SCHÄGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 16–22, 2006.

SHAHI, S. et al. Polymerase chain reaction (PCR)-based methods: Promising molecular tools in dentistry. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, n. 2017, p. 983–992, 2018.

SILVA, N. F. D. S. et al. Improvement in the bleaching of kraft pulp with xylanase from *Penicillium crustosum* FP 11 isolated from the Atlantic forest. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 34, n. 3, p. 119–127, 2016.

SKOURI-GARGOURI, H.; GARGOURI, A. First isolation of a novel thermostable antifungal peptide secreted by *Aspergillus clavatus*. **Peptides**, v. 29, n. 11, p. 1871–1877, 2008.

SONDEREGGER, C. et al. The evolutionary conserved γ -core motif influences the anti-Candida activity of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUL, p. 1–16, 2018.

The Fungal Infection Trust: How common are fungal diseases?; **Proceedings of the Fungal Research**; London, UK. 18 June 2011; 2017. Disponível em: <<https://www.fungalinfectiontrust.org/How%20Common%20are%20Fungal%20Diseases5.pdf>>. Acesso em: 11 nov. 2018.

TINDEMANS, S. H.; KERN, N.; MULDER, B. M. The diffusive vesicle supply center model for tip growth in fungal hyphae. **Journal of Theoretical Biology**, v. 238, n. 4, p. 937–948, 2006.

TORRENT, M.; VICTORIA NOGUES, M.; BOIX, E. Discovering New In Silico Tools for Antimicrobial Peptide Prediction. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 9, p. 1148–1157, 2012.

TU, C. Y. et al. Characterization and expression of the antifungal protein from *Monascus pilosus* and its distribution among various *Monascus* species. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 122, n. 1, p. 27–33, 2016.

VAN VLIET, A. H. et al. Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the gene encoding the immunodominant 32-kilodalton protein of *Cowdria ruminantium*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 4, p. 1451–1456, 1994.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

WU, G. et al. Penilactones A and B, two novel polyketides from Antarctic deep-sea derived fungus *Penicillium crustosum* PRB-2. **Tetrahedron**, v. 68, n. 47, p. 9745–9749, 2012.

9 REFERÊNCIAS DO ARTIGO

ACOSTA, R. et al. Selection of antifungal protein-producing molds from dry-cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 1, p. 39–46, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição**, 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2019.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BUENO, I. K. **Caracterização das linhagens mutates do fungo *Trichoderma reesei* RUT-C30**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel.

CAMPOS-OLIVAS, R. et al. Solution Structure of the Antifungal Protein from *Aspergillus giganteus*: Evidence for Cysteine Pairing Isomerism. **Biochemistry** p. 3009–3021, 1995.

DELGADO, J. et al. Growth inhibition and stability of PgAFP from *Penicillium chrysogenum* against fungi common on dry-ripened meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 205, p. 23–29, 2015.

DELGADO, J. et al. Use of molds and their antifungal proteins for biocontrol of toxigenic molds on dry-ripened cheese and meats. **Current Opinion in Food Science**, v. 11, p. 40–45, 2016.

FARUCK, M. O.; YUSOF, F.; CHOWDHURY, S. An overview of antifungal peptides derived from insect. **Peptides**, v. 80, p. 80–88, 2016.

GALGÓCZY, L. et al. Antifungal peptides homologous to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) are widespread among *Fusaria*. **Peptides**, v. 39, n. 1, p. 131–137, 2013.

GALGÓCZY, L. et al. In vitro activity of *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) and its combination with fluconazole against different dermatophytes. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 463–470, 2008.

GALGÓCZY, L.; KOVÁCS, L.; VÁGVÖLGYI, C. Defensin-like antifungal proteins secreted by filamentous fungi. **Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology** p. 550–559, 2010.

GASTEIGER, E. ET AL. Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server. **Cell Biology International**, v. 23, n. 5, p. 385, 2005.

GRIFFITHS, R. I. et al. Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural

Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5488–5491, 2000.

GURR, S. J.; UNCLES, S. E.; KINGHORN, J. R. The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. **Gene structure in eukaryotic microbes**, p. 93–193, 1987.

JIANG, Z. et al. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides. **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 90, n. 3, p. 369–383, 2008.

KAISERER, L. et al. Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. **Archives of Microbiology**, v. 180, n. 3, p. 204–210, 2003.

KOVÁCS, L. et al. Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). **Peptides**, v. 32, n. 8, p. 1724–1731, 2011.

LACADENA, J. et al. Characterization of the Antifungal Protein Secreted by the Mould *Aspergillus giganteus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 324, n. 2, p. 273–281, 1995.

MARX, F. et al. Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum* *paf* gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. **Gene**, v. 167, p. 167–71, 1995.

MARX, F. Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: A comparative study regarding, expression, structure, function and potential application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 2, p. 133–142, 2004.

MARX, F. et al. The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 3, p. 445–454, 2008.

MONSTADT, G. M.; HOLLIDORF, A. W. Arginine deiminase from *Halobacterium salinarium*. **Biochemical Journal**, v. 273, p. 739–45, 1990.

NAKAYA, K. et al. Amino acid sequence and disulfide bridges of an antifungal protein isolated from *Aspergillus giganteus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 193, n. 1, p. 31–38, 1990.

PALICZ, Z. et al. In vivo application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 269, n. 1, p. 8–16, 2013.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e383–e392, 2017.

RODRÍGUEZ-MARTÍN, A. et al. Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. **Peptides**, v. 31, n. 4, p.

541–547, 2010.

SCHÄGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 16–22, 2006.

SILVA, N. F. D. S. et al. Improvement in the bleaching of kraft pulp with xylanase from *Penicillium crustosum* FP 11 isolated from the Atlantic forest. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 34, n. 3, p. 119–127, 2016.

SKOURI-GARGOURI, H.; GARGOURI, A. First isolation of a novel thermostable antifungal peptide secreted by *Aspergillus clavatus*. **Peptides**, v. 29, n. 11, p. 1871–1877, 2008.

SONDEREGGER, C. et al. The evolutionary conserved γ -core motif influences the anti-Candida activity of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUL, p. 1–16, 2018.

SONJAK, S.; FRISVAD, J. C.; GUNDE-CIMERMAN, N. Comparison of secondary metabolite production by *Penicillium crustosum* strains, isolated from Arctic and other various ecological niches. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, n. 1, p. 51–60, 2005.

The Fungal Infection Trust: How common are fungal diseases?; **Proceedings of the Fungal Research Trust**; London, UK. 18 June 2011; 2017. Disponível em: <<http://www.fungalinfectiontrust.org/wp-content/uploads/2015/12/How-Common-are-Fungal-Diseases-v12.2.pdf>>. Acesso em: 11 nov. 2018.

TU, C. Y. et al. Characterization and expression of the antifungal protein from *Monascus pilosus* and its distribution among various *Monascus* species. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 122, n. 1, p. 27–33, 2016.

VÁRADI, G.; TÓTH, G.; BATTÁ, G. Structure and Synthesis of Antifungal Disulfide β -Strand Proteins from Filamentous Fungi. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 5, 2018.