

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” (UNESP)  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA ORGÂNICA

GABRIELA VIEIRA SILVA ZOLIN

**HISTATINA 5 E NOVAS ESTRATÉGIAS PARA O  
COMBATE À *Candida albicans***

Araraquara

2021

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” (UNESP)**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA ORGÂNICA**

Gabriela Vieira Silva Zolin

**Histatina 5 e Novas Estratégias para o Combate à *Candida albicans***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título Bacharel em Química.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Saulo Santesso Garrido

Araraquara

2021

## FICHA CATALOGRÁFICA

Z86h Zolin, Gabriela Vieira Silva

Histatina 5 e novas estratégias no combate à *Candida albicans* / Gabriela Vieira Silva Zolin. – Araraquara : [s.n.], 2021  
59 f. : il.

Trabalho de conclusão (bacharelado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Saulo Santesso Garrido

1. Candidíase. 2. *Candida albicans*. 3. Antimicóticos.  
4. Complexos metálicos. 5. Nanotecnologia. I. Título.

GABRIELA VIEIRA SILVA ZOLIN

**Histatina 5 e Novas Estratégias para o Combate à *Candida albicans***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título Bacharel em Química.

Araraquara, 02 de março de 2021

BANCA EXAMINADORA

*Cintia Duarte de Freitas Milagre*

---

Profª Dra. Cintia Duarte de Freitas Milagre  
Instituto de Química - UNESP, Araraquara

*Denise Bevilaqua*

---

Profª Dra. Denise Bevilaqua  
Instituto de Química - UNESP, Araraquara

*Saulo Santesso Garrido*

---

Profº Dr. Saulo Santesso Garrido  
Instituto de Química - UNESP, Araraquara

## DADOS CURRICULARES

### DADOS PESSOAIS

Nome: Gabriela Vieira Silva Zolin

Registro Acadêmico (RA): 161140424

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São Paulo, SP

Estado Civil: Solteira

Filiação: Regina da Silva Santos Zolin Vieira e Paulo Zolin Vieira

### PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Apresentação do trabalho intitulado "Complexos Metálicos de Histatina 5 como Alternativa para o Controle de Crescimento de *C. albicans*" na primeira fase do XXXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP.

Araraquara, 02/03/2021

*Este trabalho é dedicado à minha mãe,  
Regina.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu pai e minha irmã, por sempre me apoiarem e me ajudarem em diversas questões da minha vida, e em especial por me auxiliarem na produção desse trabalho, revisando meu texto, fazendo sugestões e correções pertinentes, e sempre me incentivando e acreditando em mim.

Ao professor Saulo, agradeço a oportunidade de fazer parte do laboratório de Síntese, Estrutura e Aplicação de Peptídeos e Proteínas, e agradeço imensamente a todo o auxílio e orientação durante a idealização e execução desse projeto, e por toda a confiança no meu trabalho.

Agradeço à Carolina, minha doutoranda suprema, por me ajudar a ver os possíveis caminhos, e por sempre me incentivar de maneira muito gentil a buscar mais e ir mais longe.

Agradeço a todos os meus amigos do laboratório de SEAPP: Naiara, Nathalia, Jonatas, Beatriz, Zaida, Jéssica e Greg, por todo o companheirismo, ensinamentos, momentos de descontração, ajuda nos perrengues e pausas para o café. Obrigada por fazerem com que eu me sinta pertencente a esse espaço.

A todos os meus amigos da graduação: Ana Carolina, Rebecca, Giovana, Gabriela, Matheus (Chiquinho), Roberto, Rafael, Letícia, João Pedro, José Henrique e Bianca, pelos inúmeros momentos de alegria, frustração e apoio ao longo dos últimos anos. Vocês me deram uma família e uma casa em Araraquara.

Ao Fauller, agradeço especialmente pela amizade e companheirismo em todos os momentos, por todo o incentivo e apoio, e por acreditar sempre em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava.

Às professoras dras. Denise Bevilaqua e Cintia Milagre, que são grandes exemplos de mulheres e cientistas, agradeço por aceitarem fazer parte da banca desse trabalho.

Por fim, agradeço ao Instituto de Química, que sempre buscando melhorias de estrutura e funcionamento, nos oferece um excelente curso de graduação.

## RESUMO

A candidíase oral é uma das infecções fúngicas mais comuns na cavidade oral, afetando principalmente pacientes que têm o sistema imunológico suprimido por doenças como HIV e câncer. A candidíase é causada por espécies do gênero *Candida*, especialmente *Candida albicans*, que se apresenta como um fungo polimórfico comensal que pode ser encontrado naturalmente na microbiota de boa parte da população mundial. Através da transição morfológica entre os estados de levedura e de hifas, *C. albicans* é capaz de desencadear uma infecção, que, embora mais comum em mucosas, pode se espalhar através do sangue tornando-se uma infecção sistêmica, que possui altas taxas de morbidade e mortalidade. Um agravante às infecções causadas por *C. albicans* é a resistência que vem desenvolvendo ao longo das últimas décadas aos medicamentos antifúngicos utilizados em seu combate. De fato, o problema da resistência antimicrobiana é considerado pela OMS como uma das 10 principais ameaças à saúde pública que a humanidade enfrenta atualmente. Assim, a busca por novos agentes antifúngicos capazes de superar as barreiras de resistência apresentadas pelo fungo é urgente e essencial. A histatina 5 é um peptídeo antimicrobiano composto por 24 resíduos de aminoácidos, pertencente à família das histatinas, que é encontrado naturalmente na saliva humana, e apresenta forte atividade antifúngica contra células de *C. albicans*, o que a torna um potencial agente para terapia antifúngica de grande interesse. A atividade antifúngica da histatina 5 pode ser prejudicada por interações com moléculas presentes na cavidade oral, e alguns mecanismos de resistência à sua ação já foram observados nas células de *C. albicans*. Assim, existem diversas propostas em estudo que visam aumentar a eficiência antifúngica da histatina 5. Este trabalho apresenta algumas propostas envolvendo a complexação do peptídeo com íons metálicos e o uso de nanopartículas carreadoras, como alternativa ao combate do importante causador de candidíase oral, *C. albicans*.

**Palavras-chave:** Agentes antifúngicos. Histatina 5. *Candida albicans*.

## ABSTRACT

Oral candidiasis is one of the most common fungal infections in the oral cavity, affecting mostly patients with immunologic system suppressed by diseases like HIV and cancer. Candidiasis is caused by species from *Candida* gender, especially *Candida albicans*, which are presented as a polymorphic commensal fungi that can be found naturally in the microbiota of human population. Through morphological transition between yeast and hyphal cells, *C. albicans* is capable of starting an infection that, although happens most commonly in mucosal tissues, can disseminate through blood becoming a systemic infection, which presents high morbidity and mortality rates. An aggravant of *C. albicans* infections is the resistance that has been developing in the last decades for antifungal medicine used in treatments to combat the infection. In fact, antimicrobial resistance is considered by WHO as one of ten biggest human health threats the world faces nowadays. Therefore, the search for new antifungal agents capable of overcoming the antifungal resistance barriers is urgent and essential. Histatin 5 is a 24 amino acid antimicrobial peptide of histatin family, that can be found naturally in human saliva, and presents a potent antifungal activity against *C. albicans* cells, being then a potential antifungal agent of great interest. Histatin 5 activity can be impaired for interaction with molecules present in the oral cavity, and some resistance mechanisms to its action has already been observed in *C. albicans* cells. Thus, there are many proposals in development aimed at increasing efficiency antifungal for histatin 5. This work presents some of these proposals, involving metal-peptide complexes and nanoparticles carriers as an alternative to fighting the important oral candidiasis pathogen, *C. albicans*.

**Keywords:** Antifungal agents. Histatin 5. *Candida albicans*.

## LISTA DE IMAGENS

Fig. 01 - Mecanismos de patogenicidade da <i>C. albicans</i>	22
Fig. 02 - Mecanismos de ação de agentes antifúngicos	28
Fig. 03 - Mecanismos de entrada e expulsão da histatina 5 na célula de <i>C. albicans</i>	37
Fig. 04 - Multifuncionalidade de lipossomas	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMP	Adenosina monofosfato
AMPs	<i>Antimicrobial peptides</i>
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCUN	<i>Amino-terminal copper and nickel binding unit</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CuO	Óxido de cobre
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
Hsp70	Proteínas de choque térmico de 70 kilodaltons
Hst5	Histatina 5
MNP	Nanopartícula magnética
NONP	Nanopartícula de óxido de nitrogênio
NP	Nanopartícula
OMS (WHO)	Organização Mundial da Saúde ( <i>World Health Organization</i> )
PNP	Nanopartícula polimérica
RNA	Ácido ribonucleico
SLN	Nanopartícula lipídica sólida
spp.	Espécies
ZnO	Óxido de zinco

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
célula.mL <sup>-1</sup>	Número de células por mililitro
A	Alfa
B	Beta
μM	Micromol
μm	Micrômetro
%	Porcentagem

## LISTA DE AMINOÁCIDOS

Ala	(A)	Alanina
Arg	(R)	Arginina
Asn	(N)	Asparagina
Asp	(D)	Ácido aspártico
Glu	(E)	Ácido glutâmico
Cis/Cys	(C)	Cisteína
Gli/Gly	(G)	Glicina
Gln	(Q)	Glutamina
His	(H)	Histidina
Ile	(I)	Isoleucina
Leu	(L)	Leucina
Lis/Lys	(K)	Lisina
Met	(M)	Metionina
Phe/Fen	(F)	Fenilalanina
Pro	(P)	Prolina
Ser	(S)	Serina
Tir/Tyr	(Y)	Tirosina
The/Thr	(T)	Treonina
Trp	(W)	Triptofano
Val	(V)	Valina

## LISTA DE ELEMENTOS

Bi	Bismuto
Ca	Cálcio
C	Carbono
Cl	Cloro
Cu	Cobre
Fe	Ferro
H	Hidrogênio
Mg	Magnésio
Ni	Níquel
N	Nitrogênio
O	Oxigênio
K	Potássio
Ag	Prata
Ti	Titânio
Zn	Zinco

## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
1. Introdução.....	15
2. Objetivos .....	19
3. <i>Candida albicans</i> : morfologia, virulência e resposta imune.....	20
4. Estratégias para o combate de <i>C. albicans</i> .....	27
4.1. Agentes antifúngicos no combate à <i>C. albicans</i> .....	27
4.2. Histatina 5: novas terapias antifúngicas. ....	31
4.3. Complexos metálicos como estratégia contra <i>C. albicans</i> . ....	39
4.4. Uso de nanotecnologia para novos tratamentos. ....	42
5. Conclusão .....	48
6. Referências .....	50

## 1. Introdução

A candidíase é a doença fúngica mais comum na população, podendo afetar pessoas saudáveis ou não (LEWIS et al., 2012). Com um aumento significativo da taxa de infecções e com a patogenicidade ainda não completamente elucidada das espécies do gênero *Candida*, causadoras da doença, além da crescente resistência aos antifúngicos tradicionais, tem-se uma grande necessidade de controle das infecções por novos mecanismos de diagnóstico, prevenção e tratamento (SANTOS et al., 2018).

Embora exista um bom número de dados para a Europa e América do Norte, existem poucos dados sobre infecções por espécies de *Candida* na América Latina, Ásia, Oriente Médio e África, de modo que não é possível estabelecer adequadamente taxas que representem a situação global. No Brasil, os dados geralmente são obtidos por hospitais individualmente ou em associação, de modo que as taxas estão sujeitas a variações. Em 2006, a vigilância da candidemia encontrou uma taxa de 2,5 casos de infecção por *Candida spp.* por 1000 admissões em 11 centros médicos, apresentando assim uma taxa de 0,37 casos por 1000 pacientes-dia (LAMOTH et al., 2018).

Dentre as espécies do gênero, a de maior prevalência, *Candida albicans*, representa a maior parte dos isolados de infecções fúngicas, sendo responsável por 40,9% dos casos no Brasil, de acordo com um estudo realizado na rede brasileira para investigar a incidência de candidemia (COLOMBO et al., 2006). Entretanto, infecções causadas por outras espécies têm crescido substancialmente. O estudo demonstrou que *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* representam, respectivamente, 20,9%, 20,5% e 4,9% das infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida* (SANTOS et al., 2018; SARDI et al., 2013). Outras espécies, como *C. krusei* e *C. dubliniensis* são menos recorrentes em caso de infecção.

Certos fungos do gênero *Candida* são membros comuns da microbiota humana, podendo ser encontrados na pele e nos tratos oral, gastrointestinal e geniturinário. São comensais em sistemas saudáveis, sendo encontrados na forma de leveduras. Situações de imunocomprometimento do organismo hospedeiro podem desencadear infecções. O gênero é formado por diversas espécies heterogêneas, sendo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* responsáveis por 90% das infecções invasivas (SARDI et al., 2013). A *C. albicans*, maior representante do gênero, pode crescer em diversos ambientes, com variações no pH e nas disponibilidades de nutrientes e de oxigênio, devido sua grande flexibilidade de adaptação (SANTOS et al., 2018). Trata-se de um fungo polimórfico, cuja virulência está associada à transição da forma de levedura para a forma hifal. A patogênese inclui diversos fatores, tais como a capacidade de aderir e invadir as células do hospedeiro, produção de enzimas hidrolíticas que danificam o tecido, tigmotropismo (crescimento direcional das hifas), evasão das defesas imunológicas do organismo e formação de biofilme em superfícies bióticas ou abióticas (DADAR et al., 2018; MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

A expansão da população de pacientes imunossuprimidos por doenças como câncer, HIV, diabetes melito, que fazem uso de dentaduras, cateteres intravenosos e nutrição parenteral total, além do aumento de procedimentos invasivos, transplantes, e do uso de antibióticos de amplo espectro, são aspectos que contribuem para o aumento do número de infecções. Associados aos fatores de virulência do fungo e à alta resistência que este apresenta à diversos antifúngicos, *C. albicans* é considerada um sério risco à saúde humana (AKPAN; MORGAN, 2002).

A infecção causada por espécies de *Candida* é denominada candidíase ou candidose, e pode se apresentar de diferentes formas: candidíase oral, cutânea e vaginal e onicomicose, que são classificadas como superficiais, e candidíase invasiva (ou sistêmica), como candidemia (infecção na corrente sanguínea), que é infecção fúngica nosocomial mais relevante, associada a uma alta taxa de mortalidade (SANTOS et al., 2018; SARDI et al., 2013). A transmissão pode ocorrer de forma exógena, através de cateteres contaminados, soluções intravenosas e até mesmo pelas mãos de profissionais da saúde; ou de forma endógena, quando espécies constituintes da microbiota hospedeira tornam-se oportunistas em decorrência da debilidade do organismo, o que constitui o principal mecanismo de transmissão (SARDI et al., 2013).

Geralmente, a forma comensal não virulenta da *C. albicans* é passível de ser mantida por mecanismos de defesa do organismo, como saliva e neutrófilos. Barreiras anatômicas podem evitar a transmissão exógena. Mesmo assim, o crescimento excessivo do fungo quando há perturbação no equilíbrio ou na imunidade do organismo pode causar danos ao hospedeiro (VILA et al., 2017). Medicamentos antifúngicos são utilizados quando a resposta imunológica não é suficiente para combater a infecção. Nas últimas décadas, tem havido uma descoberta crescente, embora limitada, de agentes antifúngicos. As classes disponíveis incluem azóis, polienos, equinocandinas, análogos de nucleosídeos e alilaminas. Componentes celulares específicos dos fungos são alvos dessas classes de medicamentos (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

Tais medicamentos apresentam limitações, como baixo espectro de ação, apenas ação fungistática, alta toxicidade, efeitos colaterais e baixa biodisponibilidade. Além disso, a resistência do fungo às classes de medicamentos, principalmente aos azólicos, vem crescendo continuamente (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017). A resistência pode ser classificada como: primária, ou intrínseca, que já existe mesmo antes da exposição ao agente antifúngico; ou adquirida após o tratamento com o medicamento resultado de uma adaptação do fungo, que pode ser reversível ou não (NOËL, 2012). Assim, há uma grande necessidade de identificar novas substâncias e mecanismos de ação para o combate de infecções por espécies de *Candida*.

A resistência antimicrobiana, ao longo dos últimos anos, tornou-se uma das maiores ameaças à saúde humana em todo o mundo. O uso amplo, e muitas vezes inadequado, de medicamentos antimicrobianos acelerou o processo de adaptação genética que os fungos realizam para resistir ao estresse induzido (VANDERPUTTE;

FERRARI; COSTE, 2012). O aumento da resistência antimicrobiana dificulta o tratamento de doenças mais simples e interfere negativamente em casos mais graves. Os custos de tratamentos à micróbios super-resistentes são mais elevados, os tratamentos se tornam mais longos, e há um aumento nas taxas de morbidade e mortalidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Mesmo casos como infecções por *C. albicans*, que se apresentam principalmente na forma superficial, se tornam preocupantes, uma vez que há uma maior facilidade em evoluir para uma infecção sistêmica com a resistência aos tratamentos. O primeiro possível caso de incidência de *Candida auris*, espécie super-resistente do gênero, no Brasil, foi notificado pela Anvisa no final do ano de 2020 (ANVISA, 2020). Encontrada principalmente em hospitais, a *C. auris* é capaz de evitar quase todos os mecanismos de morte utilizados pelos tratamentos disponíveis, sendo associada principalmente às infecções sistêmicas, de modo que as taxas de mortalidade são bastante elevadas (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Uma vez que fungos são eucarióticos, o número limitado de alvos seletivos passíveis de serem explorados são uma barreira para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, que devem ser seguros e eficazes. Estratégias farmacológicas foram empregadas em formulações antifúngicas já existentes para minimizar a toxicidade e resistência, assim como combinações entre diferentes agentes e nanoestruturação de antifúngicos tradicionais. Terapias alternativas incluem moléculas ativas de produtos naturais, materiais poliméricos, agentes sintéticos e peptídeos (SANTOS et al., 2018; VILA et al., 2017).

Peptídeos isolados do corpo humano que possuem atividade antimicrobiana são chamados peptídeos antimicrobianos (AMPs - *antimicrobial peptides*). Em geral, se caracterizam como pequenos peptídeos básicos catiônicos derivados de proteínas que exibem atividade antimicrobiana. Esses incluem lactoferrinas, defensinas, catelicidinas e histatinas. São considerados elementos-chave no sistema imunológico, sendo capazes de matar ou bloquear o crescimento do patógeno (fungos, bactérias e vírus) pela intensificação da passagem de substâncias pela membrana fúngica (mecanismo de ação bastante relevante), o que favorece a permeabilização da membrana das células microbianas e a inativação de alvos citoplasmáticos. Também atuam como moduladores imunológicos, que promovem a migração de células imunes, como neutrófilos, para o local da infecção (DE SMET; CONTRERAS, 2005; SWIDERGALL; ERNST, 2014).

Membro da família das histatinas, a histatina 5 (Hst5) é um fragmento proteolítico da histatina 3, que compreende 24 aminoácidos, partindo da extremidade N-terminal. É produzida e secretada no organismo pelas glândulas sublinguais, parótidas e submandibulares sendo, portanto, encontrada naturalmente na saliva humana. A Hst5 é o peptídeo de maior ação antifúngica da família, podendo matar leveduras e hifas de *C. albicans* mesmo em baixas concentrações. Seu mecanismo de ação de morte de células fúngicas envolve várias etapas: ligação às proteínas celulares fúngicas Ssa1 e Ssa2, transporte através da membrana e do citoplasma pelos transportadores de poliamina Dur3 e Dur31, formação de espécies reativas de oxigênio pela interrupção da respiração

mitocondrial e efluxo de íons e ATP (PURI; EDGERTON, 2014). Porém, a atividade antifúngica da Hst5 é menor *in vivo* do que *in vitro*, isso porque pode sofrer a influência de agentes externos, como proteínas, metais, sais e proteases que podem ser encontrados na saliva (PURI et al., 2015). Ademais, o crescimento da *C. albicans* é regulada pelo equilíbrio entre os mecanismos de defesa do organismo hospedeiro e as respostas fúngicas, de modo que o fungo desenvolveu estratégias de evasão que incluem secreção de enzimas efectoras, bombas de efluxo de AMP e regulação de vias de sinalização, de modo a evitar a morte por Hst5 (SWIDERGALL; ERNST, 2014).

Há também o fato de que, embora peptídeos antimicrobianos como Hst5 apresentam-se como agentes antifúngicos promissores, podem ser extraídos apenas em pequenas quantidades, e o custo de produção sintética é consideravelmente elevado (SANTOS et al., 2018). A diminuição da atividade antifúngica por interferências do meio salivar, assim como a já existente resistência do fungo ao peptídeo, faz com que novas estratégias para o desenvolvimento de uma maior atividade antimicrobiana da Hst5 sejam necessárias. Dentre tais estratégias, se encontram a síntese de peptídeos menores, fragmentos da Hst5, que possuam atividade antimicrobiana equivalente, mas que sofram menor interferência do meio; complexos metálicos formados com o peptídeo, que aumentem a eficiência de morte de *C. albicans*, evitando mecanismos de resistência; bem como o uso de ferramentas nanotecnológicas que permitam superar as barreiras apresentadas.

## 2. Objetivos

Revisar os conceitos já conhecidos sobre a patogenicidade da *C. albicans*, incluindo morfologia e fatores de virulência do fungo, assim como a resposta imunológica correspondente. Verificar os tratamentos antifúngicos já existentes, sua ação e a resistência que sofrem. Apresentar as características e os mecanismos de ação antifúngica da histatina 5, cuja ação contra *C. albicans* já é conhecida. Por fim, apresentar novas propostas que vêm sendo desenvolvidas e que visam aumentar a eficiência da ação da histatina 5, tornando-a um possível tratamento contra as infecções fúngicas causadas pela *C. albicans*.

### 3. *Candida albicans*: morfologia, virulência e resposta imune

Até a primeira metade do século XX, infecções bacterianas eram uma das grandes causas de mortalidade no mundo. As infecções por fungos, embora frequentes, tinham menor impacto e, assim, não tinham a mesma relevância. Após o desenvolvimento de tratamentos com antibióticos e, portanto, um controle maior de infecções bacterianas, as infecções fúngicas ganharam destaque e, atualmente, estas representam uma das grandes ameaças à saúde global, cuja crescente incidência foi influenciada pelo aumento do número de casos de indivíduos imunodeficientes relacionados à AIDS, câncer, diabetes, transplante de órgãos e cirurgias invasivas, que tiveram um expressivo aumento após da década de 1960. (VANDERPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012; BONGOMIN et al., 2017)

Dois tipos de microrganismos podem estar presentes em uma infecção: os patógenos primários, que estabelecem uma infecção numa população saudável naturalmente; e os patógenos oportunistas, que se apresentam como comensais de uma população saudável, porém, quando certas condições são atendidas, se tornam patógenos ao organismo hospedeiro. Tais patógenos podem ser classificados em dois grupos distintos: fungos filamentosos, que representam a maioria dos patógenos primários; e leveduras, cuja maior parte são patógenos oportunistas. As leveduras oportunistas são particularmente presentes em infecções nas mucosas, sendo as do gênero *Candida* as mais frequentes, com uma incidência global estimada em cerca de 75.000.000 casos por ano. (VANDERPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012)

De acordo com a LIFE (*Leading International Fungal Education*), a candidíase oral, a doença fúngica mais comum na boca, ocorre em mais 3,5 milhões de pessoas em todo o mundo (LEADING INTERNATIONAL FUNGAL EDUCATION), afetando crianças de 0 a 18 meses (devido ao sistema imunológico pouco desenvolvido) (BERDICEVSKY et al., 1984), pessoas que fazem uso de dentaduras (ABU-ELTEEN; ABU-ALTEEN, 1998), pessoas com o sistema imunológico debilitado devido à doenças como leucemia, diabetes melito e HIV (que corresponde a cerca de 2,5 milhões de casos) (AKPAN; MORGAN, 2002), aqueles que fazem uso de antibióticos de amplo espectro, anticoncepcionais, corticoides, e aqueles que apresentam uma dieta carente de vitaminas (principalmente vitamina B) e rica em glicose (LYNCH, 1994). Tratamentos médicos como quimioterapia, hemodiálise e cateteres venosos centrais também contribuem para a evolução da enfermidade (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013). Os principais sintomas da doença são a presença de placas pastosas brancas ou amareladas na língua, palato e/ou mucosa jugal, surgimento de rachaduras na cavidade oral, sensação de inchaço na garganta e redução do apetite (LYNCH, 1994). Em pacientes imunodeprimidos, a infecção pode se espalhar pelo organismo através do sangue ou pelo trato gastrointestinal, levando a graves infecções nos órgãos, o que pode causar morbidade e mortalidade. A doença pode ser prevenida por uma dieta saudável, pela higiene bucal correta (dentes, cavidade bucal, língua) e pela limpeza e desinfecção correta de dentaduras, que não devem ser utilizadas por mais de 6 horas por dia (AKPAN; MORGAN, 2002).

A candidíase oral é causada pelos fungos do gênero *Candida*. Estes podem ser encontrados naturalmente na pele e nos tratos oral, gastrointestinal e geniturinário, de modo que a patologia ocorre quando há um crescimento excessivo ou infecção causada pelo fungo (AKPAN; MORGAN, 2002).

O gênero *Candida*, que apresenta cerca de 200 espécies, foi isolado pela primeira vez em 1844 de um paciente que apresentava caso de tuberculose. Como outros fungos, apresenta características não fotossintéticas, sendo organismos eucarióticos com paredes celulares externas à membrana plasmática, que contém grandes quantidades de esteróis. As características culturais macroscópicas e microscópicas entre espécies são bastante similares, sendo capazes de metabolizar glicose em condições aeróbias e anaeróbias. A temperatura influencia seu crescimento, sendo ideal em torno de 37°C (temperatura natural do hospedeiro). O crescimento filamentosos, a extensão apical do filamento e a formação de ramos laterais são vistos com hifas, e a divisão celular única está associada a leveduras (AKPAN, MORGAN, 2002). Diversas espécies do gênero *Candida* podem ser encontrados no sistema de 40 a 60% da população (EPSTEIN; TRUELOVE; IZUTZU, 1984), tais como: *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida viswanathii*, *Candida glabrata*. (LYNCH, 1994) e, mais recentemente relatado, *Candida auris*, deixando em alerta organizações de saúde devido sua super-resistência à agentes antifúngicos (ANVISA, 2020).

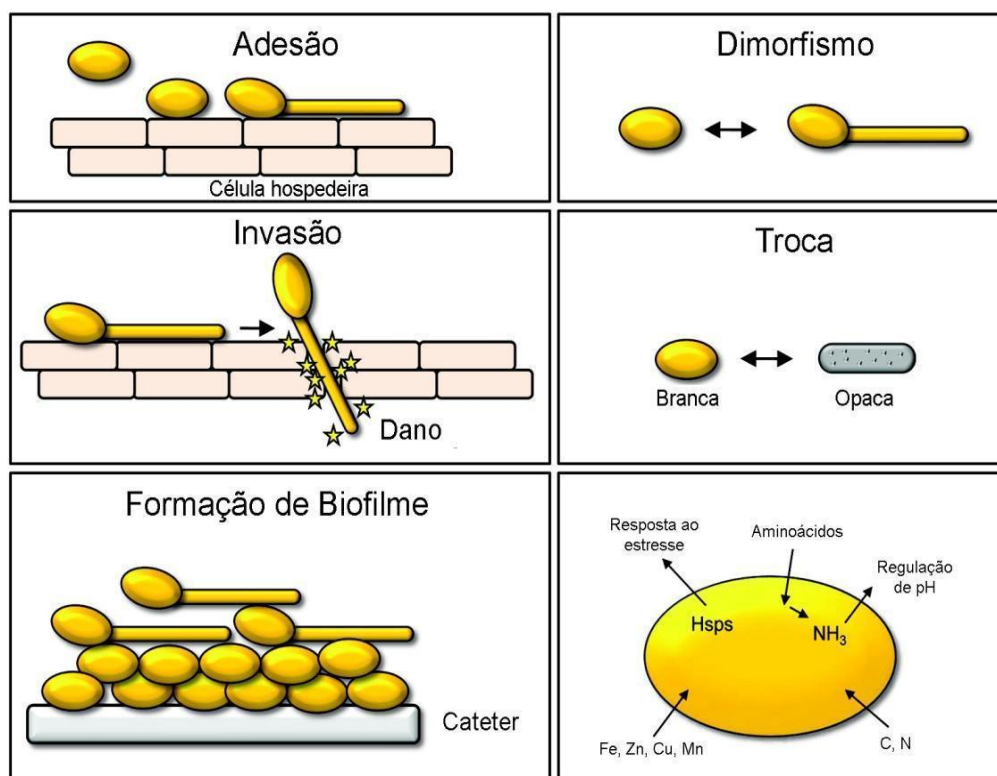
*C. albicans*, o principal patógeno do gênero *Candida*, é um membro da microflora humana, na forma de levedura polimórfica diploide nas superfícies mucosas. Geralmente é um fungo comensal inofensivo, que pode se transformar em um organismo oportunista (DADAR, 2018). Suas formas morfológicas mais importantes são as células de hifas e de leveduras, que condicionam sua virulência (WILSON; NAGLIK; HUBE, 2016), sendo que a transição de levedura para a hifa determina os estados comensais e patogênicos da *C. albicans* (DADAR, 2018). Os fatores de virulência, apresentados na figura 01, incluem: transição morfológica, expressão da superfície celular de adesinas e invasinas, formação de biofilme, tigmotropismo, comutação fenotípica e secreção de enzimas hidrolíticas (DADAR, 2018; MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

O fungo é mantido em sua forma comensal por uma interação tripartida que envolve o organismo, a microbiota e a imunidade do hospedeiro. Vias genéticas distintas são usadas para a transição entre estados patogênicos comensais e invasivos antes de infectar células epiteliais através de penetração ativa e endocitose (DADAR, 2018). Para sobreviver no organismo hospedeiro, a *C. albicans* desenvolveu mecanismos de adaptação, que incluem a aquisição de nutrientes e alterações no pH. No organismo humano, o pH varia de levemente alcalino a ácido, portanto, o fungo deve ser capaz de se adaptar às mudanças de pH. *C. albicans* privadas de nutrientes catabolizam aminoácidos pela fonte de carbono, e o nitrogênio é excretado na forma de amônia, que pode modular o pH extracelular, alcalinizando ativamente seu ambiente

circundante, e, desse modo, auto induzindo a formação de hifas (VYLKOVA, 2017). A adaptação metabólica está envolvida na vulnerabilidade de *C. albicans* aos medicamentos antifúngicos, o que influencia os principais agentes de virulência, resistência ao estresse e suscetibilidade de fungos às respostas imunes inatas (BROWN et al., 2014). A adaptação ao estresse também é promovida indiretamente pelo metabolismo humano, na geração de moléculas como glicerol, glutatona e trealose (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

O fungo oportunista é capaz de produzir espécies geneticamente modificadas para se adaptar às mudanças no ambiente e a novos nichos hospedeiros durante sua associação. Tais mutações podem acarretar na resistência a determinados medicamentos utilizados para combater a infecção, especialmente durante terapias de longo prazo. Devido a alta plasticidade genômica do fungo, que possibilita a amplificação ou perda de cromossomos parciais ou inteiros como resposta ao estresse, tais variantes genéticas são facilmente geradas (SELMECKI; FORCHE; BERMAN, 2010). A resistência ao estresse é necessária para a virulência pois aumenta a sobrevivência de células fúngicas, reduzindo a vulnerabilidade. Portanto, é provável que a capacidade das células de *C. albicans* de responder ao estresse do ambiente dependa do estado metabólico pré-adaptado das células, e dos nutrientes disponíveis nos microambientes do hospedeiro.

**Fig. 01 - Mecanismos de patogenicidade da *C. albicans*.** Adesão à superfície de células epiteliais mediada pela expressão de adesinas. Transição entre as formas morfológicas de célula de levedura para célula de hifa, denominado dimorfismo. O crescimento direcional das hifas é denominado tigmotropismo. A expressão de invasinas permite a entrada do fungo na célula hospedeira através de mecanismos de invasão. A formação de biofilmes, com células de levedura na parte inferior, e células hifais na parte superior, formado em superfícies abióticas e bióticas. Captação de aminoácidos, excreção de amônia, regulação do pH, absorção de diferentes metais para nutrição e adaptação ao estresse.



(Modificado de Mayer, F. L., 2013)

*C. albicans* cresce tanto como hifas verdadeiras de paredes paralelas, quanto como leveduras na forma de células alongadas e elipsóides, com constrição nos septos (pseudo-hifas). A transição entre as formas de crescimento é denominada dimorfismo, e foi proposto que ambas as formas são importantes para a patogenicidade (JACOBSEN et al., 2012). A morfologia da *C. albicans* é afetada por fatores do ambiente. Em pH alto (>7), o crescimento hifal é predominante, enquanto em pH baixo (<6), as células são induzidas a um crescimento na forma de levedura (MAYER; WILSON; HUBE, 2013). Mecanismos de comunicação microbiana podem influenciar na regulação da morfogênese pela detecção de quórum, que em *C. albicans* se dá principalmente pelas moléculas de farnesol, tirosol e dodecanol, indicando que em altas densidades celulares (>10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup>) o crescimento de leveduras é favorecido, enquanto baixas densidades (<10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup>) promovem a formação de hifas (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; VYLKOVA et al., 2011; ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012). Além disso, diferentes condições, como temperatura fisiológica, presença de soro ou N-acetilglucosamina e CO<sub>2</sub>, podem promover a formação de hifas (MAYER; WILSON; HUBE, 2013). Outras morfologias incluem células brancas e opacas (SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004). As formas de levedura e hifas possuem papéis distintos durante a infecção, acredita-se que a forma de leveduras esteja envolvida principalmente na disseminação (SAVILLE et al., 2003), enquanto a forma hifal atua predominantemente na invasão. As células hifais também estão envolvidas na aquisição de traços de metal. *C. albicans* utiliza diferentes estratégias de assimilação, durante a transição do comensalismo para a invasão, para obter nutrientes das células hospedeiras, promovendo seu crescimento (WILSON; NAGLIK; HUBE, 2016).

Foi demonstrado que *C. albicans* é capaz de aderir, invadir e danificar células epiteliais orais, sendo fatores críticos para a infecção. Podem ser utilizados dois mecanismos diferentes de invasão: a penetração ativa e a endocitose induzida. A penetração ativa inclui forças físicas produzidas por hifas e a secreção de enzimas líticas, como proteases aspárticas segregadas (Saps), que podem digerir componentes da superfície celular epitelial e, assim, proporcionar uma entrada nas células hospedeiras. No caso da endocitose induzida, de forma a mediar a ligação aos hospedeiros, o fungo expressa proteínas específicas na superfície celular (adesinas e invasinas), de forma a aderir e penetrar a célula hospedeira. A endocitose induzida é um processo passivo, e não requer atividades fúngicas viáveis. Esse segundo mecanismo estimula as células orais a produzir estruturas semelhantes a pseudópodes, que cercam o fungo e o atraem para dentro da célula. (NAGLIK; MOYES; WÄCHLER, 2011; DALLE et al., 2010). Após 18 horas de infecção, as células epiteliais apresentam prevalência de morte significativa, como apresentado por Villar e Zhao (VILLAR; ZHAO, 2010). A invasão estimula as vias de sinalização epitelial oral e causa morte precoce apoptótica, seguida de necrose secundária (MOFFA et al., 2015). Além disso, as proteínas de superfície também são críticas nas interações entre as células fúngicas e vários mecanismos constitutivos ou induzíveis de defesa do hospedeiro que são ativados durante a infecção (DADAR et al., 2018).

Dentre os importantes fatores de virulência, *C. albicans* tem a capacidade de formar biofilmes em superfícies bióticas (superfícies celulares das mucosas) ou abióticas (dentaduras, cateteres). Os biofilmes são formados em um processo que inclui a adesão e proliferação de células de levedura ao substrato, a formação de células hifais na parte superior do biofilme, o acúmulo de matriz extracelular, e a dispersão das células de levedura do complexo do biofilme. Biofilmes maduros são geralmente mais resistentes aos agentes antimicrobianos. Dentre os fatores responsáveis pela resistência, inclui-se a plasticidade metabólica, a arquitetura complexa e matriz do biofilme, e o aumento da expressão de bombas de efluxo de drogas. Foi demonstrado que a dispersão de células de levedura do biofilme contribui diretamente para a virulência (FANNING; MITCHELL, 2012; MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

O contato entre as células fúngicas e as células epiteliais do hospedeiro pode desencadear a formação de hifas e biofilmes nas células de *C. albicans*, de forma que a resposta às superfícies biótica (invasão) e abiótica (formação de biofilme) são relevantes para a patogenicidade. O contato com uma superfície promove o crescimento de hifas em células de levedura, e, em certos substratos, essas hifas terão o poder de invasão. Em superfícies com sulcos ou outras topologias específicas, pode ocorrer o crescimento direcional da hifa, conhecido como tigmotropismo. Este pode guiar as hifas invasoras em direção às lacunas, facilitando a entrada das células patógenas nos tecidos do hospedeiro. (KUMAMOTO, 2008; BRAND, et al., 2007). Há evidências de que o tigmotropismo de *C. albicans* é necessário para o dano total das células epiteliais. Após a adesão às superfícies das células hospedeiras, as hifas podem secretar hidrolases, de modo a facilitar a penetração ativa e aumentar a eficiência da aquisição extracelular de

nutrientes. Entre as classes de hidrolases segregadas expressas, observam-se proteases, necessárias para danificar o epitélio humano reconstituído e fosfolipases, contribuem para a patogenicidade pelo rompimento das membranas hospedeiras (WÄTCHLER et al., 2012; MAVOR; THEWES; HUBE, 2005; GÁCSEK et al., 2007).

Após a invasão, a *C. albicans* obtém acesso às camadas submucosas ou às células epiteliais, e o fim do processo se dá com a indução de danos nos tecidos. A etapa pode ocorrer pelos mecanismos de necrose e apoptose, combinados ou não. A apoptose envolve uma quebra bioquímica da célula em corpos apoptóticos ligados à membrana, sendo uma causa natural de morte celular. A necrose, por outro lado, é induzida por agentes externos, tanto associados quanto secretados por *C. albicans*, sendo causada diretamente por fatores hifais. É caracterizada por edema mitocondrial e aumento da permeabilidade da membrana plasmática. A necrose é quase sempre prejudicial, enquanto a apoptose pode proporcionar efeitos benéficos ao hospedeiro (JACOBSEN et al., 2012).

Mediadoras-chaves no reconhecimento de patógenos, as células epiteliais são iniciadoras da imunidade inata e adaptativa, sendo que a discriminação entre as células patogênicas e comensais é uma de suas ações essenciais em casos como a da *C. albicans*, que pode existir das duas formas, pois evita uma resposta inflamatória mais intensa que o necessário, o que poderia levar a danos no tecido hospedeiro, favorecendo a prevalência da infecção (JACOBSEN et al., 2012). O organismo se adaptou ao nível de perigo sinalizado pela Candidalisina, toxina citolítica do fungo gerada a partir da proteína original Ece1, codificada pelo gene ECE1. Quando secretada em quantidades suficientes, a Candidalisina é capaz de intercalar e permeabilizar membranas epiteliais, de forma a induzir a lise celular, porém, a resposta epitelial de perigo é ativada por níveis de Candidalisina menores aos necessários para induzir lise celular. A sinalização pela Candidalisina indica a presença de células hifais, uma vez que é secretada pela porção hifal, e assim, a resposta ao perigo é ativada. As células de levedura, por outro lado, são toleradas como benignas (WILSON; NAGLIK; HUBE, 2016).

A secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em resposta a *C. albicans*, sinalizada pela Candidalisina, induz o recrutamento, diferenciação e ativação de diversas células imunes, como neutrófilos, células dendríticas e células T, que são essenciais para mediar respostas inatas e adaptativas que resultarão em imunidade protetora. As células fagocíticas constituem a primeira linha de defesa durante a infecção, com macrófagos e neutrófilos fagocitando as células de leveduras e hifas. Os neutrófilos são as principais células efetoras no início da infecção sistêmica, pois também atuam na produção de espécies reativas de oxigênio e na liberação de mediadores, que incluem substâncias antimicrobianas. Também são capazes de matar diretamente as células fúngicas através de armadilhas extracelulares, como redes de fibras de cromatina revestidas com moléculas capazes de capturar e matar *C. albicans* (NAGLIK; MOYES; WÄTCHLER, 2011). Embora até dez células de levedura possam ser observadas por célula, em média, apenas duas são ingeridas por neutrófilo (TUIE; MULLICK; GROS, 2004). Neutrófilos são capazes de inibir o crescimento e a transição

de levedura para hifa, e matam o fungo de maneira eficiente. Os macrófagos, por outro lado, não inibem o crescimento ou formação de hifas das células fúngicas, de modo que as células de levedura fagocitadas podem sobreviver, e, através das hifas, perfurar o macrófago e permitir o escape da *C. albicans* (JACOBSEN et al., 2012). Após a fagocitose, a célula fúngica fica presa dentro do fagossomo, que tenta matar a célula fúngica com uma combinação de fatores, que incluem diminuição do pH do ambiente, ativação de protease e fluxos de potássio. Ao mesmo tempo, as células de *C. albicans* se protegem ativando respostas ao estresse oxidativo e formando hifas capazes de romper e matar o macrófago (BROWN et al., 2014).

O recrutamento de células dendríticas para o local de infecção é conhecido como braço adaptativo da resposta anti-*C. albicans*. As células dendríticas são capazes de reconhecer as células fúngicas, e trafegam até o centro da infecção, onde o antígeno fúngico processado é apresentado às células T para iniciar a imunidade adaptativa (NAGLIK; MOYES; WÄTCHLER, 2011). Células dendríticas são capazes de fagocitar leveduras e hifas por mecanismos diferentes, sendo mais eficiente na morte de células de levedura. O envolvimento de linfócitos T na defesa do hospedeiro se dá principalmente pelo desenvolvimento de resistência à reinfecção, após a inoculação inicial (TUIITE; MULLICK; GROS, 2004). Macrófagos e células dendríticas, além da atuação direta para a morte da *C. albicans*, também são produtores de quimiocinas e citocinas que fazem parte da resposta imune (JACOBSEN et al., 2012).

Por ser o primeiro braço do sistema imunológico a detectar e reagir ao patógeno invasor, a imunidade inata é de suma importância como resposta à infecção sistêmica de *C. albicans*, pois assim, as células fúngicas são eliminadas rapidamente da corrente sanguínea. Os fagócitos estão entre as primeiras células no local da infecção, e as deficiências que afetam a capacidade dessas células de agir contra a *C. albicans* torna o organismo mais suscetível à infecção (TUIITE; MULLICK; GROS, 2004). Patógenos intracelulares desenvolveram diversas estratégias para induzir ou inibir a apoptose das células hospedeiras, e através de mecanismos capazes de neutralizar a defesa do hospedeiro, preservam a disseminação das células fúngicas e sua sobrevivência intracelular (IBATA-OMBETTA et al., 2003).

A resposta do hospedeiro à infecção pode ser verificada pela medição de três fenótipos: danos nos tecidos, carga de fungos e mortalidade, representantes de diferentes aspectos da interação hospedeiro-fungo. O dano nos tecidos representa a interação entre a *C. albicans* com as células imunes do hospedeiro, caracterizando a resposta inflamatória desencadeada e as principais células recrutadas. As medições de carga total de fungos refletem a eficiência da resposta imune do hospedeiro pelos órgãos afetados. A mortalidade indica a suscetibilidade geral do organismo hospedeiro à infecção (TUIITE; MULLICK; GROS, 2004). Através de observações clínicas, foi descoberto que respostas imunológicas mediadas por células defeituosas estão mais associadas a infecções mucocutâneas, enquanto a infecção sistêmica é mais recorrente quando se há uma deficiência no número ou na função dos neutrófilos (ASHMAN et al., 2004).

Estruturas da superfície da *C. albicans* ligam-se à receptores das células imunes, que desencadeiam respostas que inibem o crescimento do fungo, como espécies reativas de oxigênio e peptídeos antimicrobianos (ZIPFEL, 2009). Porém, pela secreção de enzimas hidrolíticas e proteínas bloqueadoras, a *C. albicans* é capaz de superar as defesas do hospedeiro (ZHU; FILLER, 2010).

## **4. Estratégias para o combate de *C. albicans***

### **4.1. Agentes antifúngicos no combate à *C. albicans*.**

Em casos em que o organismo sozinho não é capaz de combater o fungo patógeno, é necessário o uso de medicamentos antifúngicos. A terapia antifúngica tópica é utilizada como tratamento de primeira linha, principalmente em casos de candidíase não complicada, como a em mucosas ou superficial. Também aplicada no tratamento sistêmico, pois reduz a dose e duração do tratamento. A terapia antifúngica sistêmica, por outro lado, é utilizada quando há um alto risco de desenvolver infecções sistêmicas, ou em pacientes que sejam intolerantes ou refratários ao tratamento tópico (AKPAN; MORGAN, 2002; EPSTEIN; POLSKY, 1998). As infecções sistêmicas são tratadas com preparações orais ou intravenosas (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

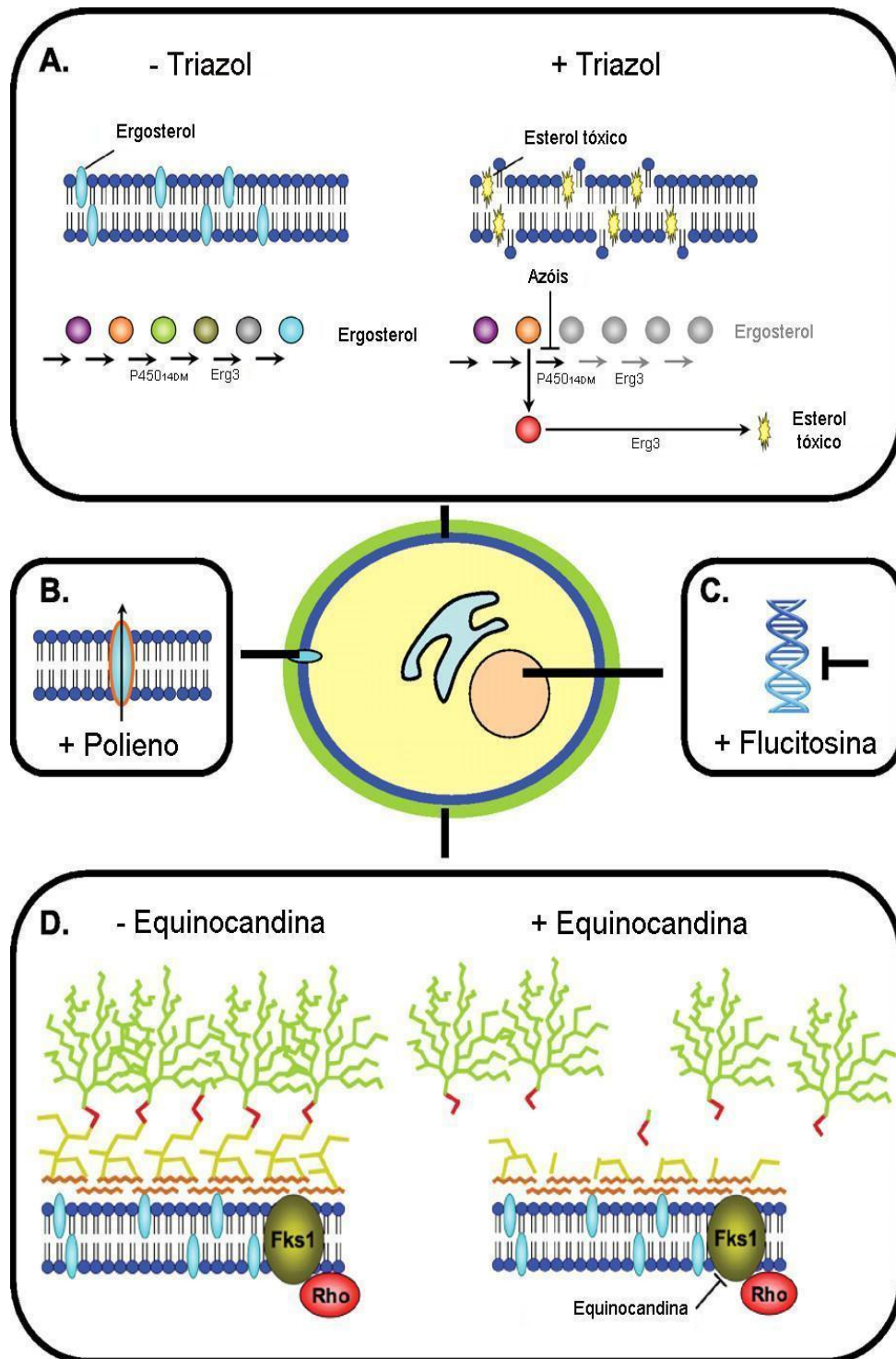
Algumas classes de medicamentos antifúngicos são utilizadas no combate às infecções por *C. albicans*, utilizando-se de diversos mecanismos, apresentados na figura 02. Essas classes de medicamentos incluem azóis, equinocandinas, polienos, flucitosinas, entre outros. A maior dessas famílias é a dos azóis, que são capazes de interferir na membrana celular inibindo as atividades de enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol (principal esteroide das membranas fúngicas, sendo análogo ao colesterol nas células animais). As diferenças estruturais entre o colesterol e o ergosterol são identificadas pelos antifúngicos direcionados à ligação ou biossíntese do ergosterol, de modo que as células hospedeiras não são atacadas. A família dos azóis inclui imidazóis e triazóis, sendo o fluconazol o triazol mais conhecido. Muitos azóis são eficazes e podem ser utilizados tanto para uso tópico quanto para tratamento de infecções invasivas (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

As equinocandinas são lipopeptídeos capazes de inibir, por meio do bloqueio não competitivo da sintase, a síntese da parede fúngica, levando a estruturas com a integridade prejudicada, e assim, a uma maior vulnerabilidade celular à lise osmótica. Os agentes dessa família, anidulafungina, caspofungina e micafungina, possuem ação fungicida que varia de acordo com a concentração das espécies de *Candida* no organismo (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; COWEN; STEINBACH, 2008).

Polienos são capazes de se ligar ao ergosterol, afetando o importante componente lipídico da membrana fúngica, o que resulta na formação de poros aquosos intercalados na membrana, que possibilitam o vazamento do conteúdo intracelular, e, portanto, na morte da célula. A nistatina e a anfotericina B são os principais exemplos

de polienos (COWEN; STEINBACH, 2008) e, devido aos problemas de absorção pelo trato gastrointestinal que apresentam, são usados principalmente por aplicação local na boca. A anfotericina B foi aprovada pela primeira vez em 1957 como terapia primária para o tratamento de diversas infecções fúngicas. Embora as formulações atuais sejam menos tóxicas do que as primeiras desenvolvidas, o uso de forma mais ampla é impedido pelo elevado custo na produção (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017). A nistatina é um dos principais agentes tópicos utilizados no tratamento da candidíase oral, sendo utilizada na forma de enxágue, pastilha ou suspensão bucal. Entre seus efeitos colaterais, estão diarreia, náusea e vômito. Além disso, contém um alto índice de sacarose, de modo que não é recomendada para pacientes com diabetes, que fazem uso de esteroides ou que estão em estado imunocomprometido (AKPAN; MORGAN, 2002). A flucitosina é análoga à pirimidina. É transportada para as células fúngicas, onde atua interferindo na síntese do DNA. Pode também ser incorporada ao RNA, interferindo na tradução celular e na síntese de proteínas. Alilaminas e tiocarbamatos são outros exemplos de agentes que também perturbam a membrana celular, pela biossíntese do ergosterol, e a griseofulvina atua inibindo a mitose fúngica (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

**Fig. 02 - Mecanismos de ação de agentes antifúngicos.** (A) Os triazóis inibem o lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase, impedindo a produção de ergosterol, causando acúmulo de um intermediário tóxico e resultando em estresse na membrana celular. (B) Os polienos se ligam ao ergosterol na membrana celular dos fungos, formando poros aquosos na membrana, que permitem o vazamento de componentes celulares e a lise celular osmótica. (C) A flucitosina inibe a timidilato sintase e interfere na síntese de DNA; O 5-fluorouracil também interfere na síntese de RNA. (D) As equinocandinas inibem o regulador positivo da atividade da glucana sintase, resultando em estresse e perda da integridade da parede celular. + presente; - ausente.



(Modificado de Cowen, L. E., 2008)

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de medicamentos menos tóxicos possibilitou um tratamento mais seguro para pacientes, o que tornou o uso de antifúngicos mais amplo (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017). Essa expansão levou a um desenvolvimento de resistência antifúngica (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013), fator preocupante, pois limita as possibilidades de terapia, uma vez que poucas classes de medicamento estão disponíveis para o tratamento (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-

IZQUIERDO, 2017). A resistência microbiológica pode ser primária (ou intrínseca) quando o fungo a apresenta naturalmente, sem exposição prévia ao medicamento; ou secundária (ou adquirida), desenvolvida após a exposição ao agente antifúngico, que se dá geralmente por alterações genéticas que possibilitam a sobrevivência do fungo (NOËL, 2012).

Mecanismos de resistência a medicamentos antimicrobianos incluem barreiras de permeabilidade associada aos biofilmes e concentrações celulares reduzidas de agentes antifúngicos, mediadas por transportadores de efluxo de drogas, e podem ser classificados em duas grandes categorias. A primeira contempla as possíveis maneiras para contornar os efeitos do agente microbiano na célula, como alterações no alvo da droga e aumento da produção de transportadores de múltiplas drogas que removem o agente da célula. A segunda categoria abrange os mecanismos que permitem à célula lidar com o estresse induzido pelos agentes antifúngicos, o que inclui as alterações metabólicas que minimizam a toxicidade do fármaco, que podem ser desde adaptações fisiológicas até alterações genéticas (COWEN; STEINBACH, 2008; CANNON et al., 2007).

Apenas algumas classes de medicamentos antifúngicos estão disponíveis e, portanto, o surgimento de resistência à drogas de classes específicas ou resistências generalizadas, dificultam o tratamento do paciente. Os mecanismos que causam resistência ocorrem naturalmente em cepas menos suscetíveis, e são adquiridos em espécies mais suscetíveis. (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017). Redução do acúmulo intracelular da droga, diminuição da afinidade e da processabilidade alvo do fármaco e diminuição do seu efeito, são mecanismos importantes de resistência da *C. albicans* contra os principais agentes antifúngicos utilizados (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

Supra regulação de transporte de drogas, superexpressão ou alteração do alvo da droga e alterações celulares estão entre os mecanismos de resistência de espécies de *Candida* a azóis. Tais mecanismos podem ocorrer sozinhos ou simultaneamente, e podem produzir efeitos aditivos ou acarretar uma resistência cruzada. No caso das equinocandinas, a resistência envolve a aquisição genética de mutações nos genes que codificam as subunidades catalíticas da glucano sintase. As equinocandinas não são substratos dos transportadores de múltiplas drogas, assim, mecanismos que causam resistência aos azóis não apresentam resistência cruzada com essa classe de antifúngicos (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017)

Fluconazol, nistatina e anfotericina B são os medicamentos mais comuns no tratamento de infecções por *C. albicans*, portanto, os mecanismos que levam à resistência desses medicamentos são bem conhecidos.

No caso do fluconazol, bombas de efluxo capazes de diminuir sua concentração intracelular são reguladas positivamente. Além disso, podem ser observadas diversas mutações pontuais, que estão associadas ao aumento da concentração inibitória mínima de fluconazol, no alvo dos antifúngicos azólicos, a lanosterol 14-desmetilase. A

contração do efeito do medicamento pode ter a contribuição de dois mecanismos. O primeiro envolve uma regulação positiva do gene ERG11, levando a um aumento intracelular da proteína alvo. O segundo, menos comum, é caracterizado por alterações em etapas da biossíntese do ergosterol através da inativação total da dessaturase. Assim, as cepas de leveduras produzem membranas celulares que não contêm ergosterol, mas outros esteróis (NIIMI; FIRTH; CANNON, 2010; NOËL, 2012).

A resistência à anfotericina B se dá em diversas espécies menos suscetíveis durante a terapia, e envolve a redução do conteúdo de ergosterol na membrana celular. Tratamento com azóis, que reduzem as concentrações de esterol celular, podem contribuir com o aumento da resistência à anfotericina B (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

A nistatina, assim como os polienos no geral, tem baixa solubilidade e toxicidade aquosa. A resistência, assim como no caso da anfotericina B, é adquirida devido a uma diminuição, ou até falta de conteúdo de ergosterol nas membranas celulares, consequência da mutação dos genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de ergosterol (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

#### **4.2. Histatina 5: novas terapias antifúngicas.**

Novas terapias alternativas, assim como novos princípios ativos, vêm sendo alvo de diversas pesquisas nos últimos anos, na busca de potenciais tratamentos com antifúngicos que não apresentem resistência como os medicamentos usados contra a *C. albicans*. Estes podem ser obtidos de diferentes fontes, como produtos naturais, agentes sintéticos ou materiais poliméricos. Organismos marinhos, fungos endofíticos, saponinas, alcaloides, peptídeos e proteínas também vêm sendo investigados (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013). Os peptídeos são de grande interesse, uma vez que podem ser encontrados naturalmente no organismo humano, e alguns já possuem função como agentes antimicrobianos.

Peptídeos antimicrobianos (AMPs), estratégias evolutivamente antigas, estão normalmente entre as primeiras linhas de defesa do organismo hospedeiro, uma vez que são capazes de inibir rapidamente um amplo espectro de micróbios infecciosos. Podem ser isolados de células procariontes e eucariontes nos reinos animal, vegetal, bacteriano e fúngico, sendo papel fundamental na evolução bem-sucedida de organismos multicelulares complexos. De modo geral, são caracterizados como moléculas anfipáticas e catiônicas, com uma variação considerável no comprimento da cadeia, que pode ser composta por até 50 resíduos de aminoácidos, e podem ser categorizados de acordo com sua estrutura secundária (ZASLOFF, 2002). Nos organismos das formas mais simples de vida, os AMPs são o principal meio de combate à patógenos, enquanto em organismos mais avançados, tais peptídeos têm papel auxiliar no sistema imunológico. Em seres humanos, peptídeos catiônicos são produzidos e secretados por diversos tecidos, incluindo glândulas salivares, olhos, fígado, células epiteliais e

neutrófilos. Os peptídeos antimicrobianos de amplo espectro agem principalmente na quebra da membrana celular do micróbio, com certa seletividade que diminui a propensão à lise de membranas celulares de mamíferos (MATEJUK et al., 2010).

Os AMPs podem assumir as estruturas  $\alpha$ -helicoidais, de folha  $\beta$ , e estendidos (ZASLOFF, 2002). Os AMPs  $\alpha$ -helicoidais são a classe mais bem estabelecida nas relações estrutura-atividade. Possuem estrutura randômica em solventes aquosos, e formam hélices anfipáticas em ambientes similares às membranas. A maioria é capaz de romper membranas microbianas, cujos mecanismos propostos incluem a formação de poros toroidais e de aglomerados na forma de tapete. Os AMPs de folha- $\beta$  formam estruturas rígidas que são estabilizadas por pontes de dissulfeto. Estes exercem sua atividade antimicrobiana sendo inseridos ou inclinados na bicamada lipídica para formar poros toroidais para o rompimento da membrana. Os AMPs estendidos são compostos principalmente por aminoácidos como prolina, arginina, histidina e triptofano, cuja ação, em muitos casos, se dá no interior da célula fúngica, pela interação com proteínas. (SEO et al., 2012)

Evidências sugerem que a atividade antifúngica dos AMPs é bastante ampla. No sistema imunológico de mamíferos, os peptídeos podem atuar em mecanismos de ativação das células T, ação fagocitária e ativação de células dendríticas, sendo inclusive capazes de modificar os níveis de citocinas e quimiocinas, reduzindo, assim, o crescimento de fungos. Também podem influenciar inflamações, proliferações, cicatrizações de feridas e preservação do equilíbrio entre proteases e inibidores de protease. (DE SMET; CONTRERAS, 2005) A carga positiva dos peptídeos é essencial para a ligação com elementos da membrana da célula fúngica, cujas moléculas negativas da superfície celular atraem os AMPs, com subsequente formação de uma estrutura semelhante a um poro que atravessa a membrana, alterando a permeabilidade e levando à lise celular (HELMERHORST et al., 2001). As potências e espectros de atividades dos peptídeos contra diferentes classes de micróbios variam e dependem da composição da membrana do patógeno e da estrutura do peptídeo. Assim, a interação entre peptídeos antifúngicos, sua modulação do sistema imunológico e o status imunológico do hospedeiro determinará a eficiência do AMP (MATEJUK et al., 2010).

A maior parte dos peptídeos possui uma sequência indefinida de aminoácidos e, portanto, não apresentam sequências únicas de resíduos de aminoácidos presentes em todos os AMPs que poderiam servir como local de reconhecimento para a célula fúngica, que poderia ativar mecanismos de destruição seletiva para o antimicrobiano. Além disso, mais de um peptídeo, de diferentes classes estruturais, são utilizados pelos organismos multicelulares no ataque a micróbios. Sendo assim, a destruição de apenas um peptídeo pode não ser suficiente para evitar um ataque letal (ZASLOFF, 2002).

Os peptídeos antimicrobianos também podem ser diferenciados em: peptídeos com propriedades antifúngicas primárias, peptídeos antifúngicos com amplo espectro de atividade antimicrobiana e peptídeos antimicrobianos que são fragmentos proteolíticos de proteínas. Peptídeos com propriedades antifúngicas primárias são de ocorrência

natural, com atividade antimicrobiana direcionada. A vantagem potencial destes AMPs é que, devido a especificidade para combater certos patógenos, podem possuir eficiência maior do que peptídeos de amplo espectro. A maioria dos peptídeos antifúngicos possuem alvos específicos intracelulares, na parede ou membrana celular. Entre tais peptídeos se encontram os inibidores da síntese de 1,3- $\beta$ -glucano, equinocandinas, pneumocandinas, inibidores da quitina na parede celular e peptídeos ricos em histidina. A maior parte dos peptídeos antimicrobianos, porém, afeta diversos organismos, incluindo fungos, bactérias e vírus, sendo caracterizados como de amplo espectro de atividade antimicrobiana. Não há mecanismo de ação específico entre esses peptídeos, que podem atuar na inibição da síntese de proteínas específicas da membrana ou proteínas de estresse, na interrupção da síntese, interação ou quebra do DNA de fita simples e na produção de peróxido de hidrogênio (DE SMET; CONTRERAS, 2005). É interessante para os diversos tipos de organismos, de uma perspectiva evolutiva, a formação de peptídeos funcionalmente onipotentes que pudessem combater uma grande variedade de patógenos infecciosos. Existem também os peptídeos antimicrobianos que são fragmentos proteolíticos de proteínas. Estes podem possuir atividade de amplo espectro ou serem mais direcionados e, frequentemente, apresentam maior atividade antifúngica do que as proteínas originais. Podem apresentar estrutura  $\alpha$ -helicoidal ou de folha  $\beta$ , de acordo com a localização de sua proteína de origem. São exemplos desses peptídeos a lactoferrina e análogos do domínio III da proteína BPI (MATEJUK et al., 2010).

Ao contrário dos medicamentos convencionais, os peptídeos antimicrobianos têm uma baixa probabilidade de aquisição de resistência por cepas microbianas, provavelmente devido ao modo de ação diferenciado que apresentam (ZASLOFF, 2002). Devido às propriedades catiônicas dos AMPs, que implicam na interação com as cargas negativas das estruturas microbianas, a ação dos peptídeos é diretamente nas membranas, acarretando um acúmulo na superfície, o que possibilita rearranjos na estrutura, translocação do peptídeo através da membrana e interações com alvos intracelulares, que permitem que os AMPs contornem os mecanismos de resistência (TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012; HUANG; HUANG; CHE, 2010). As principais vantagens dos AMPs são o amplo espectro e rápido início de atividade antimicrobiana, porém algumas dificuldades são encontradas no desenvolvimento de medicamentos, devido a instabilidades decorrentes de características do ambiente e presença de interferentes. Além disso, o alto custo de produção e a potencial toxicidade dos AMPs para aplicações orais também são fatores limitantes.

Ricas em histidinas, as histatinas são AMPs com atividades antifúngicas primárias, cuja atividade contra *C. albicans* já é conhecida. Sendo assim, é um possível tratamento tópico, que pode atuar sozinho ou sinergicamente com outros tratamentos já conhecidos. Há uma abertura para a descoberta de novas formas de tratamento utilizando tais peptídeos.

As histatinas são uma família de pequenos peptídeos básicos catiônicos, que possuem uma grande presença de aminoácidos básicos como arginina, lisina e,

principalmente, histidina. Com ponto isoelétrico de 6.5, a histidina modula consideravelmente a cationicidade dos peptídeos em baixos valores de pH, e suas cadeias laterais são conhecidas quelantes de metais, permitindo a associação dos peptídeos com íons metálicos (HELMERHORST et al., 2001). As histatinas compreendem um grupo de membros estruturalmente relacionados, que podem ser encontrados na saliva em concentrações na faixa de 50-425  $\mu$ M (DE SMET; CONTRERAS, 2005), adotando uma conformação aleatória em solventes aquosos, e de  $\alpha$ -hélices em solventes não aquosos, embora a anfipatia da hélice, quando quantificada pelo momento hidrofóbico, seja bastante baixa em comparação com outros AMPs (RAJ; EDGERTON; LEVINE, 1990). São produzidas e secretadas pelas glândulas sublinguais, parótidas e submandibulares. As histatinas secretadas podem sofrer modificações proteolíticas antes de chegar à boca, e ainda são capazes de interagir com outras moléculas salivares, tornando-se parte do revestimento salivar de tecidos duros e moles. (CALDERONE; CLANCY, 2011) Tais peptídeos foram descritos pela primeira vez na década de 1970 como aumentadores da atividade glicolítica de microrganismos. Por volta de 1984, foram descritas suas atividades bactericidas e fungicidas (DE SMET; CONTRERAS, 2005).

As histatinas 1, 3 e 5 são os membros mais relevantes da família. Todas de estrutura linear, possuem 38, 32 e 24 resíduos de aminoácidos, respectivamente, sendo sete deles histidinas em todos os casos. As histatinas 1 e 3 são codificadas pelos genes relacionados HIS1 e HIS2, respectivamente, enquanto a histatina 5 é um fragmento da histatina 3 (DE SMET; CONTRERAS, 2005). A histatina 1 é a proteína de menor eficácia fungicida entre os membros da família, e é capaz de se ligar às superfícies dos dentes para formar uma camada protetora (CALDERONE; CLANCY, 2011). A histatina 3 tem atividade antifúngica intermediária, e a histatina 5 é o membro da família de peptídeos com maior ação antimicrobiana (DE SMET; CONTRERAS, 2005). As histatinas também podem ter outras atividades na cavidade oral, que vão desde participação na formação da película do esmalte do dente até a neutralização de lipopolissacarídeos. (ROTHSTEIN et al., 2001)

A histatina 5 (Hst5), cuja sequência primária de aminoácidos é DSHAKRRHHGYKRKFHEKHHSHRGY, caracteriza-se pela relutância em adotar estruturas helicoidais, apresentando hélices apenas levemente anfipáticas, o que evita que a Hst5 fique presa dentro da membrana, e facilita sua entrada no citoplasma da célula do patógeno (HELMERHORST et al., 2001). Sendo a de maior ação antifúngica entre as histatinas, atua contra fungos patógenos como *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* (DE SMET; CONTRERAS, 2005). A atividade antimicrobiana da Hst5 se concentra na região dos resíduos de aminoácidos situados nas posições de 11 a 24 a partir da extremidade C-terminal, denominada domínio funcional (KAVANAGH; DOWD, 2004), que representa o mínimo necessário para a morte de células fúngicas. No entanto, já foi demonstrado que a atividade antifúngica é diretamente proporcional ao número de resíduos de aminoácidos. Além disso, os aminoácidos Lys13, Arg12 e Glu16 foram identificados, através de análises

mutacionais, como resíduos importantes para a ação do peptídeo (PURI; EDGERTON, 2014). Embora o mecanismo de ação da Hst5 em *C. albicans* não tenha sido completamente elucidado, sabe-se que inclui captação do peptídeo na célula, efluxo de ATP para fora da célula e produção de espécies reativas de oxigênio (DE SMET; CONTRERAS, 2005).

Dados apresentados por Moffa et al. sugerem que o revestimento com Hst5 nas superfícies orais, na forma de película salivar, é capaz de reduzir a colonização por *C. albicans* em superfícies de células epiteliais. A película salivar é um filme biológico composto por proteínas salivares, carboidratos e lipídeos, que atua como uma interface entre a primeira camada de micróbios e a superfície oral. Também é capaz de proteger camadas de células basais de sofrer apoptose (MOFFA et al., 2015).

Os alvos da Hst5 são intracelulares, de modo que a ação inicial é a penetração da parede celular de forma a acessar o interior da célula, onde exerce sua atividade (BAEV et al., 2002). A parede celular da *C. albicans* tem uma estrutura espessa, composta por multicamadas de glucano, quitina e nanoproteínas, que protegem a célula do estresse osmótico, mantêm a integridade estrutural e restringem a passagem de proteínas (BAEV et al., 2002b). A proteína de choque térmico Ssa2, presente na parede celular do fungo, foi identificada como local inicial de ligação à Hst5 para sua captação e entrada na célula fúngica. As proteínas de levedura Ssa, pertencentes à família das proteínas de choque térmico 70 (Hsp70), auxiliam na translocação através de membranas, e possuem pelo menos um local de ligação funcional para a Hst5, de acordo com o que foi observado em análises mutacionais. Polissacarídeos também podem desempenhar papel na captura e ligação inicial de histatinas extracelulares. (CALDERONE; CLANCY, 2011)

A passagem de Hst5 através da parede celular é mediada por proteínas transportadoras, com gasto de energia pela utilização de ATP. O peptídeo é transportado para a célula através de transportadores de poliamina fúngica, Dur3 e Dur31. A similaridade entre as cargas das moléculas catiônicas de poliamina e Hst5 é a razão provável para que compartilhem um mesmo transportador (KUMAR et al., 2011). Além da translocação citosólica dependente de energia, outros mecanismos permitem a entrada de Hst5 nas células.

A captação da histatina pode envolver três vias: captação mediada pelo transportador, transferência direta através da membrana e endocitose mediada pelo receptor. A captação real pode ocorrer com uma combinação de um ou mais dos processos, dependendo da concentração de Hst5. (MOCHON; LIU, 2008) As histatinas absorvidas pela endocitose entram no citosol através do rompimento de endossomos e são liberadas pela via retrógrada. Entrada de energia metabólica e força motriz de prótons dependentes da temperatura são requisitos conhecidos para a captação de histatina, portanto, a internalização ativa da Hst5 por transportador através da membrana é consistente.

A ligação da histatina à parede celular e sua translocação intracelular são eventos independentes, embora subsequentes. A translocação intracelular da histatina pode ser inibida por baixas temperaturas ou por inibidores do metabolismo energético (CALDERONE; CLANCY, 2011). A captação de Hst5 depende de energia e pode ter efeitos diretos na membrana, porém a ação de inserção na membrana não é o mecanismo envolvido na morte mediada por Hst5, nem a perda de ATP resultante do processo (KOSHLUKOVA et al., 1999; PURI; EDGERTON, 2014).

Um dos primeiros efeitos observados após a entrada do peptídeo nas células de *C. albicans* é a rápida indução ao efluxo de ATP celular, além de ADP, AMP, NAD<sup>+</sup> e íons citosólicos de potássio e magnésio. A liberação de K<sup>+</sup> é um dos principais mecanismos de interferência no metabolismo celular, causando a perda de volume e, conseqüentemente, a perda de viabilidade da célula. A proteína Trk1 foi identificada como o transportador de íons responsável pela perda de potássio, sendo essencial para a atividade tóxica da Hst5 (BAEV et al., 2004). O estresse osmótico resultante da desregulação do volume interno e do desequilíbrio iônico resultante do efluxo de íons, é um dos mecanismos cruciais da atividade fungicida da Hst5 nas células de *C. albicans* (PURI; EDGERTON, 2014; CALDERONE; CLANCY, 2011).

A ação da Hst5 em *C. albicans* requer a realização da fosforilação oxidativa por células respiratórias e mitocôndrias acopladas. O desacoplamento ou bloqueio da respiração celular protege contra a morte induzida por Hst5, devido ao desacoplamento da fosforilação na cadeia respiratória. A disfunção mitocondrial é um mecanismo importante na atividade da Hst5. A interrupção da função mitocondrial pode afetar o potencial transmembranar, inibindo a captação de Hst5 e, assim, suportando a atividade antifúngica, evitando a morte celular (HELMERHORST, et al., 1999). O mecanismo da morte celular nas mitocôndrias resulta da geração de espécies reativas de oxigênio como consequência da interrupção da respiração mitocondrial pela Hst5 (CALDERONE; CLANCY, 2011). Na presença de um sequestrador de espécies reativas de oxigênio, a L-cisteína, a produção das espécies e a morte celular foram impedidas, indicando a geração de tais compostos como um mecanismo para a morte celular de *C. albicans* mediada por Hst5 (HELMERHORST; TROXLER; OPPENHEIM, 2001).

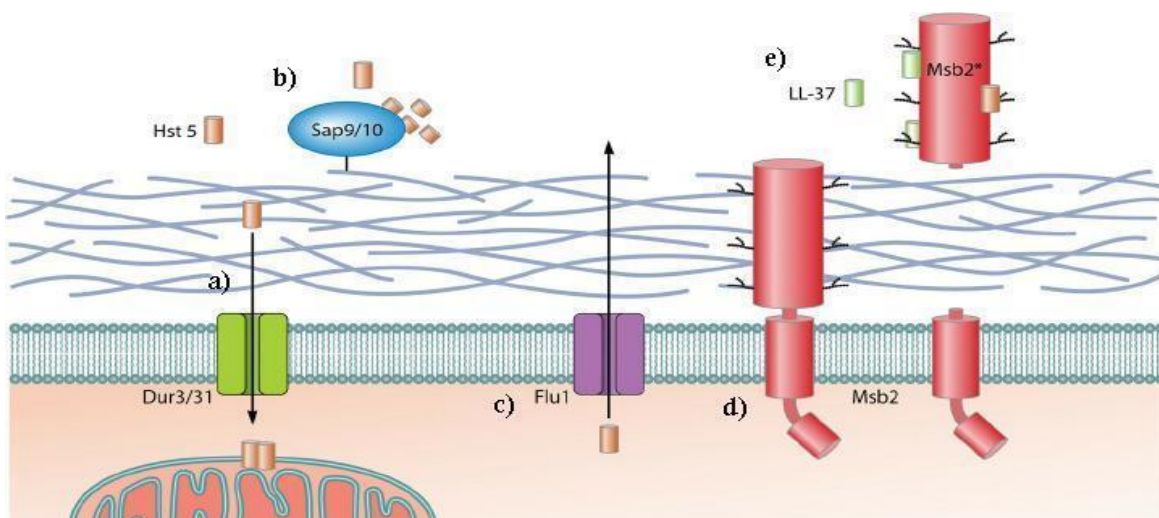
Muito embora o uso de peptídeos antifúngicos de ocorrência natural como tratamento tenha baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência, já foi descoberto que células de *C. albicans* podem se tornar resistentes à Hst5 após exposição sucessiva (CALDERONE; CLANCY, 2011). Além disso, a Hst5 apresenta atividade limitada *in vivo*, em parte devido à inativação por componentes salivares (PURI et al., 2015).

Embora tenha atividade antifúngica bastante eficiente quando testada *in vitro*, a Hst5 pode ter sua ação comprometida na cavidade oral por possíveis interações com metais, sais, proteases e outras proteínas encontradas na saliva. Tais proteínas podem prover do organismo hospedeiro ou dos microrganismos, patógenos e comensais (PURI et al., 2015). Após sua secreção, a Hst5 sofre degradação proteolítica por enzimas

nativas encontradas na saliva, de modo que sua atividade funcional pode ser reduzida, mas compensada pela contínua reposição de nova secreção de peptídeo. Tal degradação proteolítica por enzimas representa um dos maiores desafios no uso da histatina como agente terapêutico (TATI et al., 2014). Estudos sobre a degradação de produtos secretórios salivares indicaram dois níveis diferentes para o acontecimento da proteólise: primeiro, o processamento proteolítico pós-tradução está compreendido na biossíntese de proteínas salivares dentro das glândulas. Nesse caso, as enzimas responsáveis ainda não foram identificadas. No segundo caso, a proteólise, desencadeada por enzimas e bactérias provenientes do hospedeiro, ocorre no ambiente oral, sendo o processo bastante pronunciado e extremamente rápido. Com a quebra do peptídeo, se é esperado que propriedades biológicas ligadas a ele também desapareçam, porém, dados apresentados por Helmerhorst et al. revelam que a fase inicial de proteólise da Hst5 não abole suas propriedades antifúngicas, uma vez que a mistura da degradação inicial pode ser tão ativa quando o peptídeo intacto em ensaios antifúngicos, demonstrando que a proteólise mediada por fluido oral pode ser uma propriedade biológica intrínseca da saliva (HELMERHORST; ALAGL; SIQUEIRA; OPPENHEIM, 2006).

Outra barreira importante no uso de Hst5 como tratamento tópico está relacionada à limitada atividade que o peptídeo exibe quando presente na saliva total, mesmo em altas concentrações. Dois processos que podem ajudar a explicar esse fator são o mascaramento da atividade funcional, provavelmente devido à ligação da Hst5 com sais e metais salivares, e o turnover dinâmico das proteínas salivares, que equilibra secreção com degradação (PURI et al., 2015b).

**Fig. 03 - Mecanismos de entrada e expulsão da histatina 5 na célula de *C. albicans*.** a) entrada na célula através dos transportadores de poliamina Dur 3 e Dur 31. b) quebra proteolítica da cadeia da Hst5 por proteases aspárticas secretadas pelo fungo. c) Efluxo de Hst5 mediada pela bomba de efluxo de poliaminas, Flu1. d) Inativação e eliminação de Hst5 pela proteína Msb2. e) LL-37 é indicado como o ligante aos carboidratos da parede celular da *C. albicans*.



(Modificada de Swidergall, M., 2014)

*C. albicans* apresenta diversos mecanismos para evitar a morte por Hst5, assim como apresentado na figura 03, e é capaz de tolerar a presença do peptídeo em baixos níveis. Embora a atividade antifúngica e a presença nativa do peptídeo o tornem interessante como agente antimicrobiano, sua suscetibilidade à proteólise pelas proteases aspárticas secretadas pelo fungo dificultam seu uso (HAMPF et al., 2017). Estudos demonstraram uma preferência das Saps por aminoácidos básicos ou hidrofóbicos no local da clivagem. Foi demonstrada a redução da atividade da Hst5 pela Sap6, que é secretada pelo fungo durante o crescimento de hifas. O resultado foi comprovado por Puri et al, pela inativação da enzima pelo calor, onde não houve inativação da atividade do peptídeo (PURI et al., 2015). Bochenska et al. demonstraram que a clivagem ocorre primeiro entre os resíduos K17 e H18 da Hst5 pela maioria das Saps (BOCHENSKA et al., 2016). A proteção da *C. albicans* também pode se dar pela ligação da proteína Msb2 com a Hst5. A Msb2 é uma proteína sensora na membrana plasmática de fungos, semelhante à mucina, de alto peso molecular. Estudos indicam que a ligação com a Hst5 afeta negativamente a atividade do peptídeo. Além do importante aspecto de bloqueio da resposta imune pela desativação de AMPs, a proteína Msb2 também atua estabilizando a parede celular e promovendo o crescimento de filamentos da *C. albicans*, com sinalização através da via Cek1 MAP quinase (SZAFRANSKI-SCHNEIDER et al., 2012; PURI et al., 2015).

Uma vez que a Hst5 é capaz de adentrar as células de *C. albicans* pelos transportadores de poliaminas devido suas similaridades, é provável que o peptídeo também esteja sujeito à excreção por tais transportadores (LI et al., 2013). O transportador Flu1 foi identificado como o responsável por bombear o peptídeo para fora das células fúngicas, e é regulado pelos fatores de transcrição Mrr1, Mrr2, War1, Zcf35, que podem acarretar uma superexpressão da bomba de efluxo. Porém, apesar de aumentarem os níveis de expressão de Flu1, apenas Mrr1 ativado artificialmente foi capaz de conferir resistência a Hst5. Foi descoberto que mutações de ganho de função no fator Mrr1 são uma causa frequente de resistência à fluconazol, especialmente em tratamentos de longo prazo (HAMPF et al., 2017).

Para superar os obstáculos encontrados no uso de Hst5 como tratamento tópico oral contra *C. albicans*, novos mecanismos têm sido propostos, desde a introdução de aminoácidos incomuns e modificação das sequências nas regiões terminais para preservação dos peptídeos de degradações proteolíticas; diminuição do tamanho do peptídeo, para baratear o custo de produção; até o uso de sistema de liberação de fármacos eficientes, como encapsulamento em lipossomas, para melhor estabilidade e redução da toxicidade (SEO et al., 2012).

O fragmento de Hst5 de 12 resíduos denominado P-113 é um dos mais promissores nos estudos de fragmentos menores e eficientes. Apresenta atividade antimicrobiana semelhante ao peptídeo original, além de ter atividade em cepas resistentes a fluconazol. Testes de modificações de resíduos de aminoácidos na estrutura do P-113 foram executados por Rothstein et al., com o objetivo de melhorar a estabilidade e a atividade do resíduo, tornando-o um potencial peptídeo para uso

terapêutico, sem os obstáculos encontrados na molécula-mãe (ROTHSTEIN et al., 2001; SEO et al., 2012). Utilizando a modificação de resíduos, Ikonomova et al., mostraram que as substituições dos resíduos K11R-K17R na estrutura da Hst5 auxiliam na estabilidade do peptídeo (IKONOMOVA et al., 2020). Combinações de diferentes peptídeos também são uma proposta para aumentar a atividade antifúngica. Han et al. propuseram a hibridização de fragmentos da Hst5 com halocina, peptídeo que exerce sua atividade atacando a membrana celular da *Candida* (HAN et al., 2016).

### 4.3. Complexos metálicos como estratégia contra *C. albicans*.

Diversos metais de transição, tais como Ni, Zn, Cu, Co e Fe, assim como metais alcalinos e alcalinos terrosos, como Ca e Mg, estão presentes na saliva humana em diferentes concentrações, que podem variar de acordo com o indivíduo. Aminoácidos presentes na composição da Hst5, tais como ácido aspártico, ácido glutâmico, histidina, tirosina e serina, são conhecidos pela capacidade de interação com metais. Assim, 13 dos 24 resíduos de aminoácido da Hst5 são potenciais ligantes para coordenação metálica (PURI et al., 2015b). As propriedades da ligação Hst5-metal vêm sendo estudadas ao longo de décadas, através de investigações *in vitro* (CONKLIN et al., 2017). Tais estudos demonstram a importância da coordenação com metais, como Zn (II) e Ni (II), para a estrutura secundária da região C-terminal da Hst5, pela estabilização da conformação em hélice. A coordenação com um íon metálico pode levar a diferenças relevantes na interação do peptídeo com macromoléculas (MELINO et al., 2006; MELINO et al., 1999). A ligação a um metal por proteínas da saliva também pode resultar em atuações fisiológicas relacionadas à proteção do esmalte, contra o aumento de concentração de metal e ao crescimento bacteriano, sendo inclusive capaz de sequestrar íons necessários para a sobrevivência microbiana, além da formação de espécies reativas de oxigênio, comumente associada a metais redox-ativos (GUSMAN et al., 2001; BREWER; LAJOIE, 2000; CONKLIN et al., 2017).

Dois importantes motivos de ligação foram revelados pela caracterização funcional e estrutural do domínio N-terminal da Hst5: o motivo amino-terminal DXH e o conhecido como ATCUN (*amino-terminal copper and nickel binding unit*), uma característica estrutural que pode estar presente em diferentes proteínas e peptídeos. O motivo se liga a Cu (II) e Ni (II) especificamente, mas pode liberar os metais facilmente com os ligantes apropriados, tendo um papel como local de transporte em albuminas (HARDFORD; SARKAR., 1997). O motivo de ligação HEXXH, característico de várias metaloproteases, aparece uma vez na cadeia da Hst5, e faz ligação com Zn (II). As constantes de dissociação da ligação de Hst5 com Cu (II) e Zn (II) são bastante baixas, podendo atingir valores nanomolares, o que indica que tais metais são capazes de se ligar aos motivos da Hst5 na saliva em condições fisiológicas (MELINO et al., 2014; GUSMAN et al., 2001).

O motivo ATCUN pode estar relacionado com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio após a internalização celular da Hst5, que pode triplicar os

níveis totais intracelulares. Estudos de espectroscopia de massas mostram que a formação do complexo Cu (II)-peptídeo pelo motivo ATCUN é um pré-requisito necessário para a atividade oxidativa da Hst5 (MELINO et al., 2014). Já foi demonstrada a existência de cobre em células eucarióticas, principalmente na forma ligada, e sua importância para a sobrevivência celular (RAE et al., 1999). A entrada da Hst5 nas células fúngicas pode levar a uma competição pelo íon metálico necessário. Apenas um local de ligação de alta afinidade para o Cu (II) foi encontrado na Hst5, na proporção 1:1, com uma constante de ligação entre o cobre e Hst 5 que também demonstra a alta especificidade que o peptídeo possui pelo metal (GUSMAN et al., 2001). Ensaios de susceptibilidade, realizados por Conklin et al., demonstraram tal modelo. Os testes para avaliar a influência dos íons Cu (II) na atividade antifúngica da Hst 5 apresentaram uma diminuição do valor da EC50, de 5,15 µM (da Hst5 sozinha) para 1,36 µM (CONKLIN et al., 2017).

Dados sugerem que a Hst5 tem três sítios de ligação com íons zinco, dois deles de maior afinidade, e um de menor afinidade. Já foi descoberto que íons de Ca (II) são um interferente nas ligações do peptídeo com alguns metais, como o Zn (II), de modo que, quando está presente, apenas um dos sítios de maior afinidade pelos íons zinco é detectado e, portanto, apenas este apresenta alta seletividade (GUSMAN et al., 2001). Experimentos realizados por Sonia Melino et al., com Hst5 em ambiente hidrofóbico, demonstraram a indução da dimerização do peptídeo por íons zinco, o que suporta sua atividade fusogênica. Assim, acredita-se que a ação antimicrobiana da Hst5 pode ser influenciada por interações moleculares específicas, como agregação de membranas por interação de carga, estabilização estrutural do domínio funcional induzida pelos íons Zn (II) e desestabilização da bicamada lipídica (MELINO et al., 1999). O complexo Hst5-Zn (II) ainda influencia na atividade antibacteriana do peptídeo, sendo capaz de induzir a fusão de pequenas vesículas unilamelares carregadas negativamente e a hidrólise de ácidos nucleicos (MELINO et al., 2014). Por outro lado, a ligação do Zn (II) ao peptídeo ofereceu pouca proteção contra a degradação proteolítica, sendo esta similar à Hst5 que sofreu digestão trípica (PURI et al., 2015b).

O ferro é um dos íons metálicos mais abundantes na saliva, com concentração que varia de acordo com a alimentação. No corpo humano, está em sua maioria ligado a outros compostos, o que auxilia na fome nutricional de patógenos invasores. Acredita-se, com base nos dados apresentados por Puri et al., que o sequestro do ferro pela Hst5 tem como objetivo justamente reduzir a disponibilidade de nutrientes para o patógeno, independente das habilidades candidadas do metal, uma vez que, na realidade, a ligação com o ferro afeta negativamente a atividade antifúngica da Hst5 contra *C. albicans*. Essa influência negativa pode ser resultado de dois fatores: da mudança na estrutura secundária do peptídeo após a ligação com o íon metálico, que afeta a ligação à parede celular do fungo; e da estabilidade da Hst5 que resulta da ligação, diminuindo a degradação proteolítica, que embora seja em certo nível favorável, também impede a quebra em fragmentos menores e mais ativos do que o peptídeo original (PURI et al., 2015b). Ensaios de suscetibilidade já demonstraram a perda completa da atividade

antifúngica da Hst5 na presença de Fe (III) (CONKLIN et al., 2017). Estudos de dicroísmo circular mostram que a Hst5 pode se ligar a até 10 equivalentes de ferro, e o aumento da concentração de ferro na estrutura é inversamente proporcional à atividade antimicrobiana do peptídeo. O resultado dos estudos de Puri também demonstraram mudanças nos genes de absorção de ferro das células de *C. albicans* tratadas com Hst5, mostrando que a ligação do peptídeo com o ferro pode também contribuir para um mecanismo de morte por interferência no metabolismo celular do ferro. Também é possível que a Hst5 possa se ligar ao ferro intracelular, redistribuindo as reservas da célula e levando ao mau funcionamento da percepção celular do nível de metal. A disfunção mitocondrial no mecanismo de morte da histatina 5 pode ser explicada pela localização do ferro redistribuído ao redor da mitocôndria, organela extremamente sensível ao metal (PURI et al., 2015b).

Devido à afinidade com íons Ni (II) no motivo ATCUN, é esperado que o metal esteja interagindo com a Hst5 na boca humana (KUROWSKA et al., 2011). A ligação com o metal pode ter um impacto na conformação do peptídeo, aumentando a estabilidade da hélice, que se estende por até 12 resíduos além do sítio de coordenação, o que pode induzir uma significativa diferença na interação do peptídeo com outras macromoléculas, além de facilitar a ligação ao DNA ao localizar todas as cadeias laterais positivas de um lado da molécula (MELINO et al., 2006). A alergia ao níquel é bastante recorrente, podendo afetar uma a cada seis pessoas, cujo único tratamento conhecido é evitar o contato, recomendação quase impossível devido à grande presença do metal em objetos comuns de uso diário. Estudos sugerem que a exposição oral ao Ni (II) resultante do uso de aparelhos dentários protege da alergia se ocorrer antes da exposição dérmica, entretanto, a administração oral de níquel provoca sintomas dérmicos de alergia em indivíduos suscetíveis (KUROWSKA et al., 2011). Porém, ainda não há certeza sobre a influência dos íons Ni (II) na atividade antimicrobiana da Hst5.

Por outro lado, já foi constatado que o cálcio é um grande inibidor da atividade antifúngica da Hst5 contra *C. albicans* em concentrações fisiológicas, e talvez seja o principal íon responsável pelo efeito de mascaramento da saliva. A inibição da ligação de Hst5 com *C. albicans* parece ser um dos principais efeitos da presença de Ca (II) extracelular. Estudos realizados por Dong et al. mostraram que não apenas houve uma redução de até 90% na morte de células fúngicas na presença de íons Ca (II), mas também o efluxo de ATP para fora das células, um dos mecanismos de ação da Hst5, foi evitado. Estudos semelhantes foram realizados para os ânions salivares  $\text{Cl}^-$  e  $\text{CO}_3^-$  e para íons Mg (II). Para os primeiros, não houve redução da ligação entre o peptídeo e a célula fúngica, mas houve diminuição no efluxo de ATP. Na presença de magnésio, houve uma inibição de até 40% da morte por Hst5, e uma redução no efluxo de ATP de aproximadamente 40%. Os efeitos inibitórios resultantes da presença dos cátions metálicos foram mais pronunciados do que os dos ânions, sendo a interferência do cálcio bastante superior à interferência do magnésio, que ainda apresenta um efeito inibitório mínimo dentro das faixas de concentração fisiológicas. O efeito adicional de

dissociação da Hst5 na presença de Ca (II) sugere que, ao invés de se ligar ao peptídeo, o íon interrompe a ligação deste com as células de *C. albicans* (DONG; VYLKOVA; EDGERTON, 2003).

As características e a atuação dos complexos metalopeptídicos possuem uma ampla diversidade, cuja variação é decorrente do metal associado à Hst5. Muitos demonstram diversas melhorias em relação ao peptídeo original, o que os tornam potenciais agentes para terapia antifúngica de grande interesse para estudo e desenvolvimento. Existem também diversas outras associações que podem ser feitas entre a Hst5 e metais que também podem trazer resultados interessantes que ajudem a superar a problemática da resistência antimicrobiana.

#### **4.4. Uso de nanotecnologia para novos tratamentos.**

Embora drogas proteicas e peptídicas desempenhem papel de grande importância em tratamentos de diversas doenças, com grandes benefícios alcançados, uma maior aplicação é dificultada devido às instabilidades químicas e físicas que apresentam em diferentes condições. A maioria dos fármacos proteicos e peptídicos são macromoléculas hidrofílicas, suscetíveis à degradação em ambiente gastrointestinal, e que encontram dificuldades em penetrar na barreira fisiológica das camadas mucosas epiteliais e do intestino delgado. Além disso, os compostos de coordenação, que têm sido de grande interesse nos últimos anos por apresentarem atividade contra uma variedade de bactérias, fungos, e até mesmo câncer, possuem uso clínico restrito por sua baixa solubilidade em água, dificuldade em atravessar membranas lipídicas das células e baixas disponibilidades e eficácia. (CAO et al., 2019; SATO et al., 2015).

O uso da tecnologia das nanopartículas é uma das mais promissoras estratégias para superar as diversas barreiras apresentadas no uso de medicamentos antimicrobianos. As nanopartículas são capazes de se sobreporem a mecanismos de resistência, como formação de biofilmes, diminuição da captação e aumento do efluxo de drogas pela célula microbiana (PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013). Devido ao seu pequeno tamanho, as nanopartículas podem ser fagocitadas pelo organismo que contém a infecção e, uma vez dentro da célula hospedeira, podem liberar drogas que irão combater os micróbios patogênicos. A aquisição de resistência por parte dos micróbios é bastante improvável, já que as nanopartículas se utilizam de diversos mecanismos de ação, além de ser possível reunir diversos agentes antimicrobianos dentro de uma mesma nanopartícula, de modo que diversas mutações genéticas seriam necessárias na mesma célula simultaneamente. As nanopartículas também agem liberando altas concentrações de agentes antimicrobianos dentro das células infectadas, porém mantendo a dose total administrada baixa, a fim de evitar possíveis efeitos colaterais ou interações com outros compostos do organismo. A dose aplicada diretamente no local da infecção em alta concentração possibilita a morte dos micróbios antes que desenvolvam resistência ao medicamento (BLECHER; NASIR; FRIEDMAN, 2011).

As nanopartículas (NPs) são definidas como estruturas supramoleculares ultra dispersas com tamanhos que variam entre 10 e 1000  $\mu\text{m}$ , que podem atuar como um reservatório para sistemas particulados e como sistema de liberação de drogas, que podem ser encapsuladas, dissolvidas, ligadas ou aprisionadas a uma matriz de NP, que são capazes de controlar a distribuição direcionada e melhorar a estabilidade dos medicamentos (VOLTAN et al., 2016; CALIXTO et al., 2014). A entrega do fármaco no alvo correto é um problema encontrado em muitos medicamentos, devido à limitações como eficácia restrita e falta de seletividade. O uso de um sistema de controle de liberação de medicamentos é uma potencial solução para as restrições, podendo superar problemas de equilíbrio entre altas concentrações do fármaco e os efeitos tóxicos. O potencial terapêutico é dependente do tamanho hidrodinâmico, forma, quantidade, química da superfície, via de administração, tempo de permanência em circulação e reação com o sistema imunológico. Lipossomas, polímeros naturais e sintéticos, NPs inorgânicos e metálicos, dendrímeros, sílica, materiais de carbono e NPs magnéticas podem ser utilizados como carreadores de drogas (VOLTAN et al., 2016; BLECHER; NASIR; FRIEDMAN, 2011; HUH; KWON, 2011).

As nanopartículas poliméricas (PNPs) são sistemas portadores coloidais poliméricos nos quais a droga pode ser dissolvida, revestida, encapsulada ou dispersa. As PNPs podem se apresentar como nanocápsulas, que são compostas por um núcleo oleoso, envolto num invólucro polimérico, e o agente antimicrobiano pode estar tanto adsorvido no invólucro como dissolvido no núcleo, bem como nanoesferas, que são compostas por uma matriz polimérica, onde o agente antimicrobiano está preso ou adsorvido (SATO et al., 2015). São estáveis no ambiente gastrointestinal, e podem proteger o fármaco de possíveis degradações por enzimas e bombas de efluxo. A flexibilidade que permite a liberação controlada do fármaco em seu interior se deve às características físico-químicas, resultado da presença de polímeros na estrutura da PNP. Possuem significativas vantagens por possuírem grande vida útil em temperatura ambiente, além de baixos custos de produção. Outra vantagem importante é a possibilidade de se adicionar anticorpos, peptídeos e outras pequenas moléculas à superfície do polímero, permitindo a modulação de propriedades da superfície, o que resulta em interações específicas entre os tecidos e os receptores ou componentes celulares. As desvantagens associadas às PNPs são decorrentes de resíduos de solventes orgânicos utilizados no processo de produção, citotoxicidade e difícil aplicação industrial (VOLTAN et al., 2016).

As nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) foram apresentadas no início da década de 1990 como uma nova classe de carreadores de drogas coloidais, desenvolvidas para superar as desvantagens apresentadas pelos PNPs. As SLNs oferecem estabilidade física para medicamentos, evitando a degradação de drogas instáveis, além de apresentarem liberação controlada e excelente tolerabilidade, o que permite que sejam utilizadas por diferentes vias de administração (oral, dérmica, parenteral, etc). Também são uma alternativa às nanopartículas de lipídeos líquidos, usadas anteriormente, que tornam o controle de liberação mais eficiente, uma vez que a

mobilidade do fármaco é menor dentro de um lipídeo sólido. No entanto, algumas limitações estão presentes devido à preparação das nanopartículas pelo método de homogeneização de alta pressão, que pode causar efeitos como degradação e baixa capacidade de carga do agente antimicrobiano (VOLTAN et al., 2016; CALIXTO et al., 2014).

As nanopartículas magnéticas (MNPs) vêm atraindo grande interesse, e apresentam diversas vantagens. São passíveis de manipulação através de um campo magnético externo, que as direciona para a área da infecção, onde distribuem o medicamento. Podem ser formadas por metais como níquel, manganês e cobalto, na forma pura, de óxido ou de ligas. Porém, apenas as nanopartículas de óxido de ferro já foram aprovadas pela agência de controle estadunidense *Food and Drug Administration* (FDA), pela biocompatibilidade que apresenta com o organismo, uma vez que compostos como magnetita ocorrem naturalmente em diversos órgãos do organismo humano. As MNPs de óxido de ferro apresentam vantagens que incluem a facilidade de produção e a estabilidade química em diversas condições fisiológicas, e vêm sendo utilizadas com uma grande diversidade de medicamentos naturais e sintéticos que atuam contra fungos, leveduras e bactérias. Além disso, apresentam um interessante potencial na inibição da formação de biofilmes nas espécies *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (LIAKOS; GRUMEZESCU; HOLBAN, 2014).

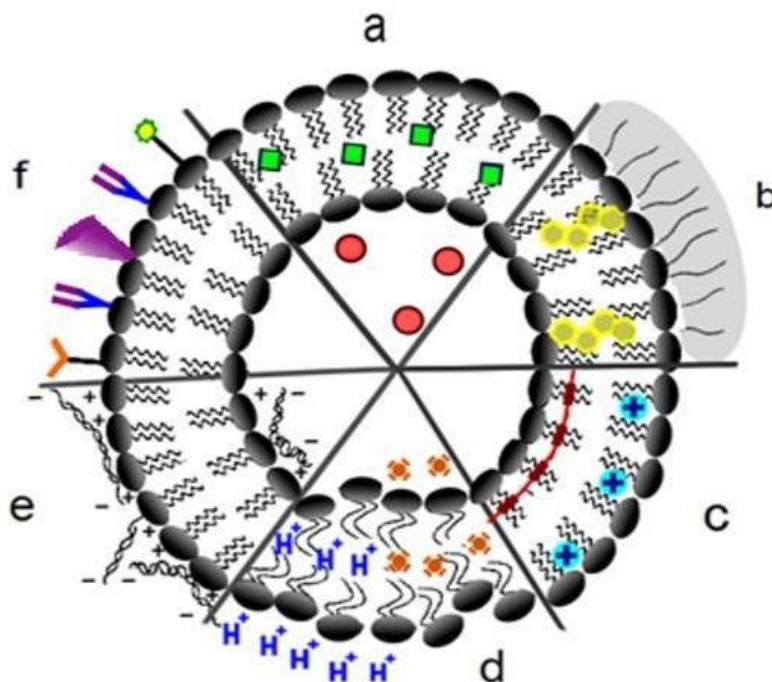
Outros tipos de nanopartículas se mostram capazes de superar os mecanismos de resistência apresentados pelos micróbios aos agentes antimicrobianos, como nanopartículas de óxido nítrico e que contêm metal, dendrímeros e lipossomas. Os dendrímeros são polímeros com alta razão entre área superficial e volume devido a presença de ramificações ao redor de uma unidade central. Possuem uma alta concentração de compostos carregados positivamente em sua superfície, o que permite a ligação às células microbianas (cuja superfície é carregada negativamente), de modo que há um aumento da permeabilidade da membrana plasmática, o que facilita o efluxo do conteúdo intracelular.

Os lipossomas, por outro lado, se apresentam como partículas uni ou multilamelares, compostas por camadas de lipídeos semelhantes a membranas, rodeadas por compartimentos aquosos (PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013; CALIXTO et al., 2014). São capazes de transportar drogas hidrofílicas em seu compartimento aquoso, aumentando a penetração através de membranas lipofílicas, bem como drogas lipofílicas, que são inseridas na bicamada lipídica, e aumentam a solubilidade em ambientes aquosos. Existem diversos tipos de lipossomas, com aplicações que vão desde tratamentos de quimioterapia até técnicas de diagnóstico. As principais classes que atuam como sistemas de liberação de agentes antimicrobianos são: niossomas, que, pela bicamada estável de surfactantes não iônicos, promovem a estabilidade das drogas encapsuladas e do produto final; exossomos, que atuam principalmente com anti-inflamatórios e antifúngicos para pele e tecidos profundos; e lipossomas polimerizados, cuja polimerização da bicamada lipídica protege contra a degradação das drogas encapsuladas (MADNI et al., 2014). O uso de diferentes formulações de lipossomas

vem se mostrando uma excelente alternativa contra a degradação proteolítica para a Hst5, como apresentado por Zambom et al., possibilitando que o peptídeo fique mais estável em seu local de ação, e mantenha a atividade antifúngica por mais tempo (ZAMBOM et al., 2019).

As principais vantagens no uso de lipossomas, cuja multifuncionalidade pode ser vista na figura 04, são a maior proteção contra a degradação por enzimas, biodegradação e biocompatibilidade. Lipossomas convencionais apresentam dificuldade de armazenamento de longo prazo, além de rápida absorção, de forma que apresentam menor meia-vida em circulação. Além disso, existem dificuldades acerca da expansão industrial de métodos sofisticados de preparação. Novas gerações de lipossomas já estão em desenvolvimento, e são caracterizados por alta estabilidade mecânica, capacidade de induzir ou inibir o sistema imunológico, desvio mais longo, alta eficiência de carregamento, facilidade de interação com a membrana celular e especificidade de alvo aumentada, sendo o controle de liberação do medicamento o maior marco no desenvolvimento (VOLTAN et al., 2016; MADNI et al., 2014).

**Fig. 04 - Multifuncionalidade de lipossomas.** (a) Agente hidrofílico (vermelho) encapsulado em núcleo aquoso, e agente lipofílico (verde) aprisionado dentro da bicamada, (b) Fixação do polímero hidrofílico na superfície da bicamada e colesterol (amarelo) como estabilizante da bicamada lipídica, (c) A incorporação de cátions (azul) e a polimerização (vermelho) auxilia no fortalecimento e estabilização da bicamada lipídica do lipossoma, (d) pH ácido (azul) ou aumentos de temperatura por agentes magnéticos (laranja) contribuem para a desestabilização da bicamada lipídica, (e) ligação entre moléculas da superfície do lipossoma (carregado positivamente) à moléculas de DNA (carregadas negativamente), (f) ligações à superfície do lipossoma por agentes imunogênicos ou de direcionamento.



(Modificada de Madni, A., 2014)

As nanopartículas liberadoras de óxido nítrico (NONPs) exercem sua ação antimicrobiana pelos óxidos de nitrogênio reativos, que incluem peroxinitrito e dióxido de nitrogênio. Em concentrações acima de 1 mM, a atividade antimicrobiana pode se dar pela reação com resíduos de aminoácidos de proteínas microbianas, danos ao DNA, como quebra de fita e desaminação de bases nitrogenadas, e aumento da geração de peróxido de hidrogênio (PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013; SCHAIRER et al., 2012). As nanopartículas que contêm metal, por outro lado, possuem diversos mecanismos de ação, o que dificulta a aquisição de resistência. Tais nanopartículas podem ser associadas à prata (Ag), cobre (Cu), zinco (Zn), magnésio (Mg), titânio (Ti) e bismuto (Bi) (PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013; BLECHER; NASIR; FRIEDMAN, 2011; HUH; KWON, 2011).

As nanopartículas contendo prata (Ag NPs) têm ação devido aos íons  $Ag^+$ , formados pela dissolução da prata em solução aquosa, cujos efeitos nos micróbios incluem a inibição dos citocromos da cadeia transportadora de elétrons, a ligação ao DNA e ao RNA, danificando-os, além de inibir a replicação do DNA. Essa atividade antimicrobiana dos íons  $Ag^+$  é aumentada fortemente pela entrega em nanopartículas (PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013; KNETSCH; KOOLE, 2011; RAJ; YADAV; GADE, 2009). As nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs), além da formação de espécies reativas de oxigênio, têm a capacidade de se ligar fortemente às membranas celulares dos micróbios, e podem afetar tanto os lipídeos quanto as proteínas da membrana, aumentando a permeabilidade e o efluxo do conteúdo intracelular (HUH, KWON, 2011; JIN et al., 2009).

Nanopartículas contendo óxido de cobre (CuO NPs) se utilizam da formação de espécies reativas de oxigênio, que inibem a replicação do DNA, e da interação com grupos amina e carboxila da superfície celular microbiana. Possuem uma atividade mais fraca quando comparadas à outras nanopartículas contendo metais, porém, possuem uma atividade mais ampla contra fungos e bactérias (BLECHER; NASIR; FRIEDMAN, 2011; CIOFFI et al., 2005). As nanopartículas contendo titânio (Ti NPs), através da fotocatalise, geram espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, que danificam a membrana celular do micróbio, comprometendo a permeabilidade e interferindo na fosforilação oxidativa (PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013; KIM et al., 2003).

As nanopartículas que contêm magnésio (Mg NPs), além da indução a formação de espécies reativas de oxigênio, são capazes de atravessar a membrana plasmática e causar uma queda de pH citoplasmático, o que interfere no potencial da membrana. Também podem inibir o crescimento de biofilme em espécies como *E. coli* e *S. aureus* (BLECHER; NASIR; FRIEDMAN, 2011; LELLOUCHE et al., 2009). As nanopartículas contendo bismuto (Bi NPs) possuem ação quando associadas ao tratamento com raios-X, sendo eficazes contra micróbios resistentes a agentes antimicrobianos. O tratamento com raios-X pode atingir e erradicar infecções localizadas profundamente na derme, e a associação à nanopartículas de bismuto, que emite elétrons pelo efeito fotoelétrico, formando radicais livres que danificam o DNA

microbiano, permite diminuir a dose de radiação necessária, diminuindo a toxicidade às células hospedeiras (PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013; LUO et al., 2013). Tais nanopartículas contendo metais já apresentaram alguma atividade antifúngica contra a *C. albicans*, inclusive na inibição do crescimento de biofilmes.

De modo geral, existem quatro vias através da membrana gastrointestinal para as nanopartículas carreadoras de drogas: transporte transmembrana, transporte mediado por receptor, transporte mediado por vetor e transporte de células M. No primeiro caso, as nanopartículas adentram à célula utilizando o modo endocítico, atravessam a membrana basal da célula e são liberadas na circulação corporal. A superfície de células M (células de transporte transmembranar importantes no trato gastrointestinal) é capaz de absorver partículas e transportar antígenos da cavidade intestinal para o tecido linfóide, induzindo uma resposta imune da mucosa. Os transportes por receptor e por vetor ligam-se à correspondentes através de receptores na membrana ou transportadores intramembrana, respectivamente, e a ação é completada por fagocitose ou citocinas. A endocitose é mediada pelo tipo de receptor (CAO et al., 2019).

Atividades em outros sistemas de liberação de drogas, como hidrogéis, ciclodextrinas, nanopartículas em sílica e nanotubos de carbono também vêm sendo estudadas, apresentando resultados promissores, assim como outros métodos para promover o melhoramento da atividade e distribuição de agentes antifúngicos, de modo a superar o problema global de resistência antimicrobiana (CAO et al., 2019).

## 5. Conclusão

Cerca de 700 mil pessoas morrem por ano em decorrência de infecções por micróbios resistentes (ROCHA, 2020). O aumento da resistência à antifúngicos é considerado pela OMS como uma das 10 principais ameaças à saúde pública global que a humanidade enfrenta, uma vez que seu espalhamento torna cada vez mais intratáveis doenças comuns, resultando em doenças prolongadas, maiores estadias em hospitais, e aumentam os riscos de incapacidade e morte. Embora a resistência ocorra naturalmente devido às adaptações genéticas dos micróbios ao estresse induzido, o processo vem sendo acelerado drasticamente pelo uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, muitas vezes sem acompanhamento médico. As infecções causadas por *Candida albicans* se enquadram nesse panorama preocupante, pois embora estejam mais presentes na forma de infecções superficiais, como a candidíase oral, são capazes de evoluir para infecções sistêmicas, que apresentam taxas de morbidade e mortalidade que podem chegar a 40%. Agentes antimicrobianos eficazes são essenciais como medidas preventivas e curativas, garantindo inclusive um menor risco em procedimentos complexos como cirurgias e quimioterapias.

O Plano de Ação Global sobre Resistência Antimicrobiana, lançado pela OMS em maio de 2015 durante a Assembleia Mundial de Saúde, apresenta estratégias como conscientização sobre a resistência microbiana por meio de educação e treinamentos, redução na incidência de infecções por medidas de saneamento básico e higiene, e o investimento sustentável em novos medicamentos, ferramentas de diagnóstico, etc (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Portanto, a busca por novos agentes antifúngicos, eficientes e que apresentem baixa resistência, é essencial.

A Hst5 é um peptídeo antimicrobiano, encontrado naturalmente na saliva humana, cuja atividade antifúngica contra a *C. albicans* já é conhecida, e nos últimos anos, vêm sendo estudada como um potencial agente para o tratamento de infecções fúngicas. Porém, já foi observada uma resistência de células fúngicas à ação da Hst5, e sua atividade antifúngica também é passível de interferência por moléculas que possam estar presentes na cavidade oral. Ainda assim, se apresenta como um agente bastante promissor, de modo que novas estratégias vêm sendo buscadas visando aumentar a estabilidade do peptídeo, diminuir sua interação com outras moléculas, e, principalmente, melhorar sua atividade de modo que seja capaz de matar eficientemente as células patógenas de *C. albicans*.

Resultados animadores já foram apresentados em diferentes estratégias, como a complexação do peptídeo com íons metálicos que podem ser encontrados na cavidade oral, que demonstraram ser capazes de aumentar a eficiência antifúngica da Hst5, além de apresentarem mecanismos distintos do peptídeo original, adquirindo novas formas de interferir e induzir a morte de células fúngicas. As nanopartículas, por outro lado, são de grande interesse por serem capazes de direcionar o agente antimicrobiano para o alvo da infecção, diminuir possíveis degradações resultantes de interações com outras moléculas, e principalmente, possibilitar que as drogas sejam liberadas de forma mais gradual no organismo, e dessa forma, possam atuar por um período maior de tempo, podendo matar mais facilmente os patógenos causadores da infecção.

O conhecimento dos mecanismos de ação e de resistência da *C. albicans*, assim como a ação dos medicamentos antimicrobianos já utilizados como terapia, são essenciais para o desenvolvimento de novos agentes, que sejam eficientes e capazes de superar a problemática que ameaça a saúde mundial causada pela resistência das espécies fúngicas aos agentes antimicrobianos disponíveis atualmente no mercado.

## 6. Referências

ABU-ELTEEN, K. H.; ABU-ALTEEN, R. M. The prevalence of *Candida albicans* populations in the mouths of complete denture wearers. **The new microbiologica**, v. 21, n. 1, p. 41-48, 1998.

AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgraduate medical journal**, v. 78, n. 922, p. 455-459, 2002.

ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi—a review. **Medical mycology**, v. 50, n. 4, p. 337-345, 2012.

Alerta de Risco GVIMS/GGTES/Anvisa 01/2020. Identificação de possível caso de *Candida auris* no Brasil. **Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 2020 Disponível em: [https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/identificacao-de-possivel-caso-de-candida-auris-no-brasil/ALERTA012020CANDIDAAURIS07.12.2020\\_2.pdf](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/identificacao-de-possivel-caso-de-candida-auris-no-brasil/ALERTA012020CANDIDAAURIS07.12.2020_2.pdf). Acesso em 16/12/2020.

ASHMAN, R. B. et al. Innate versus adaptive immunity in *Candida albicans* infection. **Immunology and cell biology**, v. 82, n. 2, p. 196-204, 2004.

BAEV, D. et al. Human salivary histatin 5 causes disordered volume regulation and cell cycle arrest in *Candida albicans*. **Infection and immunity**, v. 70, n. 9, p. 4777-4784, 2002.

BAEV, D. et al. The TRK1 potassium transporter is the critical effector for killing of *Candida albicans* by the cationic protein, histatin 5. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 53, p. 55060-55072, 2004.

BERDICEVSKY, I. et al. Oral *Candida* in children. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology**, v. 57, n. 1, p. 37-40, 1984.

BLECHER, K.; NASIR, A.; FRIEDMAN, A. The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 395-401, 2011.

BOCHENSKA, O. et al. The action of ten secreted aspartic proteases of pathogenic yeast *Candida albicans* on major human salivary antimicrobial peptide, histatin 5. **Acta Biochimica Polonica**, v. 63, n. 3, p. 403-410, 2016.

BONGOMIN, F. et al. Global and multi-national prevalence of fungal diseases - estimate precision. **Journal of fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.

BRAND, A. et al. Hyphal orientation of *Candida albicans* is regulated by a calcium-dependent mechanism. **Current Biology**, v. 17, n. 4, p. 347-352, 2007.

BREWER, D.; LAJOIE, G. Evaluation of the metal binding properties of the histidine-rich antimicrobial peptides histatin 3 and 5 by electrospray ionization mass

spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 14, n. 19, p. 1736-1745, 2000.

BROWN, A. JP. et al. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 11, p. 614-622, 2014.

CALDERONE, R. A.; Clancy, C. J. ***Candida and candidiasis***. 2nd ed. American Society for Microbiology Press, 2011.

CALIXTO, G. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of oral cancer: a review. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 3719, 2014.

CANNON, R. D. et al. *Candida albicans* drug resistance—another way to cope with stress. **Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 3211-3217, 2007.

CAO, S. J. et al. Nanoparticles: oral delivery for protein and peptide drugs. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 5, p. 190, 2019.

CIOFFI, N. et al. Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 21, p. 5255-5262, 2005.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Systemic candidiasis: candidemia and deep-organ infections. In: CLANCY, C. J.; CALDERONE, R. A. ***Candida and Candidiasis***, 2. ed. American Society of Microbiology, 2012. Cap. 27, p. 429-441.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.

CONKLIN, S. E. et al. Specific histidine residues confer histatin peptides with copper-dependent activity against *Candida albicans*. **Biochemistry**, v. 56, n. 32, p. 4244-4255, 2017.

CONTI, H. R. et al. New mechanism of oral immunity to mucosal candidiasis in hyper-IgE syndrome. **Mucosal immunology**, v. 4, n. 4, p. 448-455, 2011.

COWEN, L. E.; STEINBACH, W. J. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 5, p. 747-764, 2008.

DADAR, M. et al. *Candida albicans*-biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control—An update. **Microbial pathogenesis**, v. 117, p. 128-138, 2018.

DALLE, F. et al. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 2, p. 248-271, 2010.

DANHOF, H. A. et al. Robust extracellular pH modulation by *Candida albicans* during growth in carboxylic acids. **MBio**, v. 7, n. 6, p e01646-16, 2016.

DE SMET, K.; CONTRERAS, R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. **Biotechnology letters**, v. 27, n. 18, p. 1337-1347, 2005.

DONG, J. et al. Calcium blocks fungicidal activity of human salivary histatin 5 through disruption of binding with *Candida albicans*. **Journal of dental research**, v. 82, n. 9, p. 748-752, 2003.

Epidemiological Alert. *Candida auris* outbreaks in health care services. **PAHO, Pan American Health Organization; WHO, World Health Organization**. 2016. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2016-oct-3-phe-candida-auris-epi-alert.pdf>. Acesso em 16/12/2020.

EPSTEIN, J. B. Antifungal therapy in oropharyngeal mycotic infections. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology**, v. 69, n. 1, p. 32-41, 1990.

EPSTEIN, J. B.; POLSKY, B. Oropharyngeal candidiasis: a review of its clinical spectrum and current therapies. **Clinical therapeutics**, v. 20, n. 1, p. 40-57, 1998.

EPSTEIN, J. B.; TRUELOVE, E. L.; IZUTZU, K. T. Oral candidiasis: pathogenesis and host defense. **Reviews of infectious diseases**, v. 6, n. 1, p. 96-106, 1984.

ESPINEL-INGROFF, A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 1, p. 15-22, 2009.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002585, 2012.

FRASER, V. J. et al. Candidemia in a tertiary care hospital: Epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. **Clinical Infectious Diseases**, n. 15, p. 414-421, 1992.

GÁCSER, A. et al. Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. **Infection and immunity**, v. 75, n. 10, p. 4710-4718, 2007.

GUSMAN, H. et al. Is salivary histatin 5 a metallopeptide?. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1545, n. 1-2, p. 86-95, 2001.

HAMPE, I. A. I. et al. An acquired mechanism of antifungal drug resistance simultaneously enables *Candida albicans* to escape from intrinsic host defenses. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 9, p. e1006655, 2017.

HAN, J. et al. Antifungal activity and action mechanism of histatin 5-halocidin hybrid peptides against *Candida ssp.* **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0150196, 2016.

HARFORD, C.; SARKAR, B. Amino terminal Cu (II)-and Ni (II)-binding (ATCUN) motif of proteins and peptides: metal binding, DNA cleavage, and other properties. **Accounts of chemical research**, v. 30, n. 3, p. 123-130, 1997.

HELMERHORST, E. J. et al. Characterization of histatin 5 with respect to amphipathicity, hydrophobicity, and effects on cell and mitochondrial membrane integrity excludes a candidacidal mechanism of pore formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 8, p. 5643-5649, 2001.

HELMERHORST, E. J. et al. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 11, p. 7286-7291, 1999.

HELMERHORST, E. J.; ALAGL, A. S.; SIQUEIRA, W. L.; OPPENHEIM, F. G. Oral fluid proteolytic effects on histatin 5 structure and function. **Archives of Oral Biology**, v. 51, n. 12, p. 1061–1070, 2006.

HELMERHORST, E. J.; TROXLER, R. F.; OPPENHEIM, F. G. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 25, p. 14637-14642, 2001.

HUANG, Y.; HUANG, J.; CHEN, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. **Protein & cell**, v. 1, n. 2, p. 143-152, 2010.

HUH, A. J.; KWON, Y. J. “Nanoantibiotics”: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of controlled release**, v. 156, n. 2, p. 128-145, 2011.

IBATA-OMBETTA, S. et al. Role of phospholipomannan in *Candida albicans* escape from macrophages and induction of cell apoptosis through regulation of bad phosphorylation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1010, n. 1, p. 573-576, 2003.

IKONOMOVA, S. P. et al. Effects of histatin 5 modifications on antifungal activity and kinetics of proteolysis. **Protein Science**, v. 29, n. 2, p. 480-493, 2020.

JACOBSEN, I. D. et al. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 10, n. 1, p. 85-93, 2012.

JANG, W. S. et al. The P-113 fragment of histatin 5 requires a specific peptide sequence for intracellular translocation in *Candida albicans*, which is independent of cell wall binding. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 497-504, 2008.

JIN, T. et al. Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, and *Escherichia coli* O157: H7. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, p. M46-M52, 2009.

KANAFANI, Z. A.; Perfect, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 1, p. 120-128, 2008.

KAVANAGH, K.; DOWD, S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 285-289, 2004.

KIM, S. H. et al. Design of TiO<sub>2</sub> nanoparticle self-assembled aromatic polyamide thin-film-composite (TFC) membrane as an approach to solve biofouling problem. **Journal of Membrane Science**, v. 211, n. 1, p. 157-165, 2003.

KNETSCH, M. L. W; KOOLE, L. H. New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. **Polymers**, v. 3, n. 1, p. 340-366, 2011.

KOSHLUKOVA, S. E. et al. Salivary histatin 5 induces non-lytic release of ATP from *Candida albicans* leading to cell death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 27, p. 18872-18879, 1999.

KUMAMOTO, C. A. Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 667-673, 2008.

KUMAR, R. et al. Histatin 5 uptake by *Candida albicans* utilizes polyamine transporters Dur3 and Dur31 proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 51, p. 43748-43758, 2011.

KUROWSKA, E. et al. Salivary histatin-5, a physiologically relevant ligand for Ni (II) ions. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 105, n. 9, p. 1220-1225, 2011.

LAMOTH, F. et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. suppl\_1, p. i4-i13, 2018.

LELLOUCHE, J. et al. Antibiofilm activity of nanosized magnesium fluoride. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5969-5978, 2009.

LEWIS, L. E. et al. *Candida albicans* infection inhibits macrophage cell division and proliferation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 9, p. 679-680, 2012.

LI, R. et al. *Candida albicans* flu1-mediated efflux of salivary histatin 5 reduces its cytosolic concentration and fungicidal activity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1832-1839, 2013.

LIAKOS, I.; GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. Magnetite nanostructures as novel strategies for anti-infectious therapy. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12710-12726, 2014.

LIFE: Leading International Fungal Education. Fungal Infections: Oral Candidiasis. Disponível em: <http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases/oral-candidiasis>. Acesso em 01/12/2020.

LUO, Y. et al. Targeted nanoparticles for enhanced X-ray radiation killing of multidrug-resistant bacteria. **Nanoscale**, v. 5, n. 2, p. 687-694, 2013.

LYNCH, D. P. Oral candidiasis: history, classification, and clinical presentation. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology**, v. 78, n. 2, p. 189-193, 1994.

MADNI, A. et al. Liposomal drug delivery: a versatile platform for challenging clinical applications. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 3, p. 401-426, 2014.

MATEJUK, A. et al. Peptide-based antifungal therapies against emerging infections. **Drugs of the Future**, v. 35, n. 3, p. 197, 2010.

MAVOR, A. L.; THEWES, S.; HUBE, B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. **Current drug targets**, v. 6, n. 8, p. 863-874, 2005.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MELINO, S. et al. Histatins: salivary peptides with copper (II)-and zinc (II)-binding motifs: Perspectives for biomedical applications. **The FEBS Journal**, v. 281, n. 3, p. 657-672, 2014.

MELINO, S. et al. Metal-binding and nuclease activity of an antimicrobial peptide analogue of the salivary histatin 5. **Biochemistry**, v. 45, n. 51, p. 15373-15383, 2006.

MELINO, S. et al. Zn<sup>2+</sup> ions selectively induce antimicrobial salivary peptide histatin-5 to fuse negatively charged vesicles. Identification and characterization of a zinc-binding motif present in the functional domain. **Biochemistry**, v. 38, n. 30, p. 9626-9633, 1999.

MIRAMON, P.; LORENZ, M. C. A feast for *Candida*: metabolic plasticity confers an edge for virulence. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006144, 2017.

MOCHON, A. B.; LIU, H. The antimicrobial peptide histatin-5 causes a spatially restricted disruption on the *Candida albicans* surface, allowing rapid entry of the peptide into the cytoplasm. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 10, p. e1000190, 2008.

MOFFA, E. B. et al. Histatin 5 inhibits adhesion of *C. albicans* to reconstructed human oral epithelium. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 885, 2015.

NAGLIK, J. R. et al. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 12-13, p. 963-976, 2011.

NIIMI, M.; FIRTH, N. A.; CANNON, R. D. Antifungal drug resistance of oral fungi. **Odontology**, v. 98, n. 1, p. 15-25, 2010.

NOËL, T. The cellular and molecular defense mechanisms of the *Candida* yeasts against azole antifungal drugs. **Journal de mycologie medicale**, v. 22, n. 2, p. 173-178, 2012.

ÖDMAN, P. A. The effectiveness of an enzyme-containing denture cleanser. **Quintessence international**, v. 23, n. 3, 1992.

OPPENHEIM, F. G. et al. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 16, p. 7472-7477, 1988.

PELGRIFT, R. Y.; FRIEDMAN, A. J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 13-14, p. 1803-1815, 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.

PURI, S. et al. *Candida albicans* Shed Msb2 and host mucins affect the candidacidal activity of salivary Hst 5. **Pathogens**, v. 4, n. 4, p. 752–63, 2015.

PURI, S. et al. Iron binding modulates candidacidal properties of salivary histatin 5. **Journal of dental research**, v. 94, n. 1, p. 201-208, 2015b.

PURI, S.; EDGERTON, M. How does it kill?: understanding the candidacidal mechanism of salivary histatin 5. **Eukaryotic cell**, v. 13, n. 8, p. 958-964, 2014.

RAE, T. D. et al. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. **Science**, v. 284, n. 5415, p. 805-808, 1999.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 76-83, 2009.

RAJ, P. A.; EDGERTON, M.; LEVINE, M. J. Salivary histatin 5: dependence of sequence, chain length, and helical conformation for candidacidal activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 7, p. 3898-3905, 1990.

ROCHA, L. Antibióticos: resistência de microrganismos é grave ameaça à saúde global. **Fundação Oswaldo Cruz**. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/antibioticos-resistencia-de-microrganismos-e-grave-ameaca-saude-global>. Acesso em 16/12/2020.

ROTHSTEIN, D. M. et al. Anticandida activity is retained in P-113, a 12-amino-acid fragment of histatin 5. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 5, p. 1367-1373, 2001.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida species* to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 73-85, 2002.

SANTOS, G. C. de O. et al. *Candida* infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1351, 2018.

SARDI, J. C. O. et al. *Candida species*: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SATO, M. R. et al. Recent advances in nanoparticle carriers for coordination complexes. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 15, n. 4, p. 287-297, 2015.

SAVILLE, S. P. et al. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 5, p. 1053-1060, 2003.

SCHAIRER, D. O. et al. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 271-279, 2012.

SELMECKI, A.; FORCHE, A.; BERMAN, J. Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 7, p. 991-1008, 2010.

SEO, M. D. et al. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: A review. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12276-12286, 2012.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 7, p. 317-324, 2004.

SWIDERGALL, M.; ERNST, J. F. Interplay between *Candida albicans* and the antimicrobial peptide armory. **Eukaryotic cell**, v. 13, n. 8, p. 950-957, 2014.

SZAFRANSKI-SCHNEIDER, E. et al. Msb2 shedding protects *Candida albicans* against antimicrobial peptides. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 2, p. e1002501, 2012.

TATI, S. et al. Histatin 5-spermidine conjugates have enhanced fungicidal activity and efficacy as a topical therapeutic for oral candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 756-66, 2014.

TAY, W. M. et al. A plausible role of salivary copper in antimicrobial activity of histatin-5—metal binding and oxidative activity of its copper complex. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 23, p. 6709-6712, 2009.

TEIXEIRA, V.; FEIO, M. J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in lipid research**, v. 51, n. 2, p. 149-177, 2012

TUITE, A.; MULLICK, A.; GROS, P. Genetic analysis of innate immunity in resistance to *Candida albicans*. **Genes & Immunity**, v. 5, n. 7, p. 576-587, 2004.

UMA, V. et al. A new dinuclear biphenylene bridged copper (II) complex: DNA cleavage under hydrolytic conditions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1760, n. 5, p. 814-819, 2006.

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

VILA, T. et al. Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 150-158, 2017.

VILLAR, C. C.; ZHAO, X. R. *Candida albicans* induces early apoptosis followed by secondary necrosis in oral epithelial cells. **Molecular oral microbiology**, v. 25, n. 3, p. 215-225, 2010.

VOLTAN, A. R. et al. Fungal diseases: could nanostructured drug delivery systems be a novel paradigm for therapy?. **International journal of nanomedicine**, v. 11, p. 3715, 2016.

VYLKOVA, S. Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to conquer the host. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006149, 2017.

VYLKOVA, S. et al. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. **MBio**, v. 2, n. 3 p. e00055-11, 2011.

WÄCHTLER, B. et al. *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. **PLoS one**, v. 7, n. 5, p. e36952, 2012.

WILSON, D.; NAGLIK, J. R.; HUBE, B. The missing link between *Candida albicans* hyphal morphogenesis and host cell damage. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 10, p. e1005867, 2016.

World Health Assembly. Global action plan on antimicrobial resistance. **WHO, World Health Organization**. 2015. Disponível para download em: <https://www.who.int/publications/i/item/global-action-plan-on-antimicrobial-resistance>. Acesso em 16/12/2020.

ZAMBOM, C. R. et al. A novel antifungal system with potential for prolonged delivery of Histatin 5 to limit growth of *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1667, 2019.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.

ZHU, W.; FILLER, S. G. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 3, p. 273-282, 2010.

ZIPFEL, P. F. Complement and immune defense: from innate immunity to human diseases. **Immunology letters**, v. 126, n. 1-2, p. 1-7, 2009.