



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS SOBRAL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

MARIA LAÍNA SILVA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DE K-AUREINA E SEU EFEITO
SOBRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Candida albicans***

SOBRAL

2021

MARIA LAÍNA SILVA

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DE K-AUREINA E SEU EFEITO
SOBRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Candida albicans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.

SOBRAL

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S581a Silva, Maria Laína.

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DE K-AUREINA E SEU EFEITO SOBRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Candida albicans* / Maria Laína Silva. – 2021.
69 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.

1. Biofilme. 2. Candida. 3. K-au. 4. Virulência. I. Título.

CDD 660.6

MARIA LAÍNA SILVA

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DE K-AUREINA E SEU EFEITO
SOBRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *Candida albicans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais e Sintéticos.

Aprovada em: ____/____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Victor Alves Carneiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

A Deus.

Aos meus pais, Francisco Grigório e Alzira
Maria.

Aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, por me permitir chegar a esse momento, por todas as bençãos na minha vida e pela proteção diária.

Aos meus pais Francisco Grigório da Silva e Alzira Maria de Jesus Silva, por sempre me falarem “Vai”, por todo o amor, suporte, confiança e certeza que eu chegaria até aqui. Isso tudo é por vocês!

Aos meus irmãos, Sebastião Grigório, Miscirlândia Kelly, Renato Cristiano, Regiane Crislen, Antônio Roberto, Francisco Ricardo, Leandro Cristino e Lair José, por todo o apoio em todos esses anos, por se fazerem presentes mesmo distante. Amo vocês!

A minha noiva Ragna Veras de Farias, por cada momento que você segurou em minha mão e disse que acreditava no meu potencial. Obrigada por ser meu porto e minha fortaleza, você é o diferencial na minha vida. Te amo tanto demais!

As minhas melhores, as minhas pessoas aqui na terra Laryssa Gondim Aragão e Efigênia Cordeiro Barbalho, obrigada por todos esses anos, por todas as risadas e por todos os momentos leves durante essa etapa, isto não seria possível sem vocês.

A minha sobrinha Bianca Evelyn, por todos os abraços calorosos que renovaram minhas energias, você é uma luz na minha vida. Teu futuro é lindo!

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Prof. Dr. Victor Alves Carneiro pela excelente orientação, paciência e todos os ensinamentos que levarei por toda a minha vida profissional.

Aos professores participantes da banca examinadora Eduardo Cilli, Anderson Weiny e Francisco Cesar pela disponibilidade, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos companheiros diários do laboratório. A Rafaela por sempre estar disposta a ajudar, por todos os conselhos e ensinamentos. A Leilah, pela parceria durante o mestrado, por todos os estudos e experiências compartilhadas. A Nágila por todas as orientações.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas. E em especial ao Henrique Oliveira (*In memoriam*) apesar de sua partida precoce nos deixou lembranças de alegrias e incentivo.

A programadora Alexandra Elbakyan, por facilitar a construção desse trabalho.

Obrigada a todos que de forma direta e indireta contribuíram para a finalização desta etapa em minha vida.

Gratidão!

“Ninguém despreze o dia das coisas pequenas”
Zacarias 4.10

RESUMO

Candida albicans é considerado um dos mais importantes patógenos fúngicos oportunistas, devido ao seu grande arsenal de fatores de virulência que auxiliam durante todo o progresso da infecção. Aliado a este cenário, o surgimento de resistência fúngica demonstrou a necessidade do desenvolvimento de antifúngicos mais eficazes. Assim, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) surgem como uma alternativa, dentre estes, a aureina apresenta grande ação antimicrobiana, se tornando base para a descoberta de outras moléculas bioativas, como é o caso da K-aureina (K-au). Nessa perspectiva, o estudo objetivou demonstrar a atividade antifúngica de K-aureina e o impacto de concentrações subinibitórias sobre o perfil de virulência de isolados de *C. albicans*. Para isso, foi realizado ensaios de determinação da atividade antifúngica preconizada pelo Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) e análise da cinética de morte dos isolados frente a K-au. Para o estudo dos fatores de virulência foi realizado a avaliação da inibição de enzimas hidrolíticas, formação do tubo germinativo e biofilme. Ensaios com biofilme pré-formado foram realizados para análise de redução da biomassa, viabilidade celular e desestruturação do biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Resultados demonstram a atividade antifúngica de K-au na concentração de $62,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para todas as cepas testadas, com tempo de ação de até 180 minutos. Quanto aos fatores de virulência, K-au não foi capaz de inibir a secreção de enzimas, no entanto interferiu significativamente na formação de tubo germinativo e biofilme, sugerindo sua ação sobre a morfogênese hifal. Por fim, os ensaios com biofilme pré-formado utilizando concentração fungicida de K-au mostraram uma tendência a redução da viabilidade celular, sem interferência na biomassa do biofilme. Isto pode ser comprovado com as imagens de MEV, que apresenta desestruturação do biofilme com células mortas e ausência de hifas. Os dados evidenciam o mecanismo antivirulência de K-au, possibilitando a inibição do polimorfismo, crucial para o início da infecção e manutenção de *C. albicans* nos sítios do hospedeiro. Portanto, o PAM K-au pode ser considerado uma alternativa contra *C. albicans*, tendo em vista que a sua ação antivirulência expande o repertório de potenciais alvos nesses patógenos.

Palavras-chave: Biofilme. *Candida*. K-au. Virulência.

ABSTRACT

Candida albicans is considered one of the most important opportunistic fungal pathogens, due to its large arsenal of virulence factors that help throughout the progress of the infection. Combined with this scenario, the emergence of fungal resistance demonstrated the need for the development of more effective antifungals. Thus, antimicrobial peptides (AMPs) appear as an alternative, among these, aurein has great antimicrobial action, becoming the basis for the discovery of other bioactive molecules, such as K-aurein (K-au). In this perspective, the study aimed to demonstrate the antifungal activity of K-aurein and the impact of subinhibitory concentrations on the virulence profile of *C. albicans* isolates. For this, tests were performed to determine the antifungal activity recommended by the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) and to analyze the kinetics of death of the isolates against K-au. For the study of virulence factors, the evaluation of the inhibition of hydrolytic enzymes, formation of the germ tube and biofilm was carried out. Tests with preformed biofilm were performed to analyze biomass reduction, cell viability and biofilm breakdown by Scanning Electron Microscopy (SEM). Results demonstrate the antifungal activity of K-au at a concentration of $62.50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for all strains tested, with an action time of up to 180 minutes. As for virulence factors, K-au was not able to inhibit the secretion of enzymes, however it significantly interfered in the formation of germ tube and biofilm, suggesting its action on hyphal morphogenesis. Finally, the tests with preformed biofilm using fungicidal concentration of K-au showed a tendency to reduce cell viability, without interference in the biomass of the biofilm. This can be confirmed with the SEM images, which present a disruption of the biofilm with dead cells and the absence of hyphae. The data show the K-au anti-virulence mechanism, enabling the inhibition of polymorphism, which is crucial for the onset of infection and maintenance of *C. albicans* at the host sites. Therefore, PAM K-au can be considered an alternative against *C. albicans*, considering that its antivirulent action expands the repertoire of potential targets in these pathogens.

Keywords: Biofilm. *Candida*. K-au. Virulence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais morfologias de patógenos fúngicos humanos	15
Figura 2	Estratégias de sobrevivência de <i>Candida albicans</i>	20
Figura 3	Estágios da formação de biofilme de <i>Candida albicans</i>	24
Figura 4	Mecanismos de ação dos medicamentos antifúngicos atuais.....	26
Figura 5	Representação esquemática de alguns mecanismos de ação de PAMs ativos em membrana	29
Figura 6	Fluxograma das atividades a serem realizadas para obtenção do objetivo geral do estudo	33
Figura 7	Desenho esquemático do ensaio Determinação da atividade antifúngica – CIM e CFM.....	35
Figura 8	Desenho esquemático do ensaio Curva do tempo de morte.....	36
Figura 9	Desenho esquemático do ensaio de inibição da secreção de enzimas hidrolíticas (fosfolipase, proteinase e hemolisina)	38
Figura 10	Desenho esquemático do ensaio Inibição da Formação de Tubo Germinativo.....	39
Figura 11	Desenho esquemático do ensaio Quantificação da biomassa por Cristal Violeta (CV).....	40
Figura 12	Desenho esquemático do ensaio Viabilidade celular pela Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs).....	41
Figura 13	Desenho esquemático do ensaio Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	42
Figura 14	Curva do tempo de morte das cepas <i>C. albicans</i> ATCC 90028 (a), 0102 (b), 0104 (c) e 0105 (d) tratadas com peptídeo antimicrobiano K-au (●) e anfotericina B (■), além do grupo controle (▲), sem tratamento. Foi considerada a concentração fungicida para cada agente antimicrobiano, $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para K-au e 0,5 a $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para AmB.....	44
Figura 15	Ação de K-au e AmB na inibição das enzimas fosfolipase (a), proteinase (b) e hemolisina (c) para as cepas de <i>C. albicans</i> . Foi considerado a concentração sub-inibitória (1/4CIM) para cada agente antimicrobiano, $15,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para K-au (■), e 0,06 a $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$	

de AmB (■). O grupo controle (■) foi utilizado apenas meio de cultura..... 45

Figura 16 Inibição da formação de tubo germinativo (a) e formação de biofilme (b) para cepas de *C. albicans*. Foi considerado a concentração sub-inibitória (1/4CIM) para cada agente antimicrobiano, $15,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para K-au (■), e 0,06 a $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AmB (■). O grupo controle (■) foi utilizado apenas meio de cultura..... 45

Figura 17 Quantificação do biofilme pré-formado quanto a biomassa (a) e contagem de unidades formadoras de colônias (b) das cepas de *C. albicans* ATCC 90028 (●), 0102 (■), 0104 (▲), 0105 (▼) após a exposição ao peptídeo antimicrobiano K-au e anfotericina B. Foi utilizada a concentração fungicida de cada um dos agentes antimicrobianos, $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para K-au, e 0,12 a $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para AmB..... 46

Figura 18 Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biofilme pré-formado de *C. albicans* 0105 sem tratamento (a) e tratada (3h) com K-au (b) e AmB (c) com concentrações fungicidas. Setas representam as hifas, asteriscos brancos representam células saudáveis e asteriscos pretos células mortas ou enrugadas..... 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Atividade antifúngica de fármacos antifúngicos e K- <i>au</i> sobre cepas de <i>C. albicans</i>	43
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Als	Adesinas
AmB	Anfotericina B
Au	Aureina
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
cAMP	Monofosfato Cíclico de Adenosina
CETO	Cetoconazol
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CV	Cristal Violeta
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substances</i>
et al	Colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FLC	Fluconazol
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FTG	Formação do tubo germinativo
K-au	K-aureina
Lys	Lisina
M	Concentração molar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
NaCl	Cloreto de sódio
Nm	Nanômetro
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
Pz	Zona de Precipitação

RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	Instituto Roswell Park Memorial
Saps	Proteases Aspárticas Segregadas
SDA	<i>Sabourad Dextrose Agar</i>
SDB	<i>Sabourad Dextrose Broth</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
QS	<i>Quorum Sensing</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
UV	Radiação Ultravioleta
UVA	Universidade Estadual Vale do Acaraú
VRC	Voriconazol
Zp	Zona de precipitação

LISTA DE SÍMBOLOS

$\%$	Porcentagem
α	Alfa
β	Beta
C	Carbono (elemento químico)
μg	Micrograma
μL	Microlitro
Nº	Número
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
H	Hora
<	Menor que
>	Maior que
\leq	Menor ou igual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Micro-organismos do gênero <i>Candida</i>.....	15
2.2	Infecções por <i>Candida</i> spp	17
2.3	<i>Candida albicans</i>	18
2.4	Fatores de virulência	19
2.4.1	<i>Adesão</i>	20
2.4.2	<i>Polimorfismo</i>	21
2.4.3	<i>Secreção de enzimas hidrolíticas</i>	22
2.5	Formação de biofilme	23
2.6	Fármacos antifúngicos	26
2.7	Peptídeos antimicrobianos – PAMs	28
2.8	Peptídeos sintéticos	30
2.9	K-aureina	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivos específicos	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	Fluxograma experimental	33
4.2	Aspectos éticos da pesquisa	33
4.3	Solução e armazenamento das substâncias testes	34
4.4	Cepas microbianas e condições de cultivo	34
4.5	Determinação da atividade antifúngica – CIM e CFM	34
4.6	Ensaio da cinética de morte frente aos antimicrobianos	35
4.7	Ensaios de inibição dos fatores de virulência	36
4.7.1	<i>Inibição de Fosfolipase</i>	36
4.7.2	<i>Inibição de Proteinase</i>	37
4.7.3	<i>Inibição de Hemolisina</i>	37
4.7.4	<i>Inibição da formação do tubo germinativo</i>	38
4.8	Atividade antibiofilme	39
4.8.1	<i>Inibição da formação do biofilme</i>	39

4.8.2	<i>Ataque ao Biofilme pré-formado</i>	40
4.9	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	41
4.10	Análise estatística	42
5	RESULTADOS	43
5.1	Determinação da atividade antifúngica – CIM e CFM	43
5.2	Cinética de morte	43
5.3	Inibição dos fatores de virulência	44
5.3.1	<i>Inibição da secreção de enzimas hidrolíticas</i>	44
5.3.2	<i>Inibição da formação de tubo germinativo e biofilme</i>	45
5.4	Atividade anti-biofilme (Biomassa e viabilidade celular)	46
5.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	47
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

Candida albicans emergiu como um dos mais importantes patógenos oportunistas presente na microbiota anfibiônica humana, valendo-se principalmente da redução da imunidade do hospedeiro para ocasionar uma série de doenças (SILVEIRA et al., 2018). Tem sido responsável por 60% dos casos de infecções envolvendo o gênero *Candida*. *C. albicans* é a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas, além de estar comumente associada à candidíase oral e vaginal (DADAR et al., 2018).

As manifestações clínicas causadas por esse fungo são variadas, que vai desde sintomas superficiais leves, até quadros mais graves com a disseminação do micro-organismo (FREIRE et al., 2016). Tornando-se uma ameaça séria à saúde pública, principalmente para pacientes pós-cirúrgicos e em cuidados intensivos. Aqueles submetidos a terapias anticâncer, transplantados, neonatos e portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) são os mais afetados (CUI et al., 2015).

A capacidade de transição para a forma patogênica é atribuída a diversos fatores de virulência que são acionados sob condições favoráveis do ambiente (RIPPKE et al., 2018). Dentre os quais, a secreção de enzimas hidrolíticas (proteinases, fosfolipases, lipases e hemolisinas), associadas à invasão do tecido do hospedeiro e adesão a superfícies (SRIVASTAVA et al., 2018). Além disso, a versatilidade de *C. albicans* de sofrer alterações no seu morfotipo (polimorfismo) tem implicações importantes para a evasão imune, promovendo criticamente a infecção invasiva (PAPPAS et al., 2018). A forma leveduriforme assume um papel importante para a disseminação na corrente sanguínea, e o desenvolvimento de hifas, promove principalmente a aderência do micro-organismo em substratos, ocasionando a formação de biofilmes (WILSON et al., 2016).

Os biofilmes de *C. albicans* possuem um papel crucial no estabelecimento da infecção, visto que podem se desenvolver em superfícies bióticas ou abióticas (MORSE et al., 2018). Incorporados a uma matriz extracelular adquirem um estado fisiológico distinto do modo de vida planctônico. Assim, são caracterizados por altos níveis de resistência tanto às terapias antifúngicas quanto às defesas imunológicas do hospedeiro e, portanto, representam um grande desafio para a antifungicoterapia atual (HACIOGLU et al., 2018). O arsenal de fármacos disponíveis no mercado para o tratamento e prevenção de infecções por *C. albicans* está distribuído em três grandes classes: polienos, azóis e equinocandinas (BEM-AMI, 2018). Contudo, células de *C. albicans* organizadas em biofilmes podem ser até 1000 vezes mais resistentes a ação destes medicamentos quando comparado a sua forma planctônica.

(HACIOGLU et al., 2018).

Aliado a essa forma de vida, o aumento do uso de drogas antifúngicas também está diretamente relacionado ao número crescente de relatos de resistência a antifúngicos comumente utilizados na prática clínica, assim como, a problemas quanto à toxicidade e a interação medicamentosa negativa (BEM-AMI, 2018). Portanto, novas abordagens para elaboração de fármacos e/ou potencialização de drogas já existentes, têm se tornado foco de inúmeras pesquisas no âmbito da biotecnologia.

Nas últimas três décadas estudos voltados para moléculas bioativas se intensificaram, o que tornou possível demonstrar a ampla atividade de Peptídeos Antimicrobianos (PAMs) (ULLIVARRI et al., 2020). Os PAMs são oligopeptídeos sintetizados ribossomicamente por diversos organismos, incluindo os seres humanos, representando a primeira linha de defesa contra uma variedade de patógenos microbianos (WUERTH; HANCOCK, 2011). Embora a perturbação da membrana fosfolipídica seja seu mecanismo de ação mais esclarecido, estudos têm demonstrado que os peptídeos podem penetrar células microbianas e ocasionar interferência em processos intracelulares vitais. Contrapondo aos antifúngicos convencionais, os PAMs têm demonstrado baixa propensão para desenvolvimento de resistência (DESLOUCHES; DI, 2018). Assim, na busca por quimioterápicos eficazes que impliquem na redução das taxas de resistência e toxicidade, os PAMs podem representar uma alternativa vantajosa.

Dentre a vasta gama de peptídeos já conhecidos, alguns tem se destacado apresentando grande potencial antimicrobiano, como a aureina 1.2 encontrada nas glândulas granulares da rã *Litorea aurea*. Amplamente estudada, este PAM já deu origem a diversos análogos sintéticos com ação comprovada, como é o caso do peptídeo K-aureina (K-au) (MADANCHI et al., 2019). K-au (KGLFDIINKKIAESF) é um peptídeo sintético com 14 resíduos de aminoácidos com adição de uma lisina (K) no N-terminal da sequência original. Estudos envolvendo a atividade desse PAM evidenciaram satisfatória ação bactericida, sugerindo que a sua eficácia poderia se estender para fungos de interesse clínico (DA SILVA, 2017; CHERAGHI et al., 2018). Nessa perspectiva, o presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial fungicida do peptídeo K-au sobre o crescimento planctônico, biofilme e sua interferência nos fatores de virulência de isolados clínicos de *C. albicans*, o que poderá tornar o K-au um candidato promissor na elaboração de alternativas contra patógenos fúngicos.

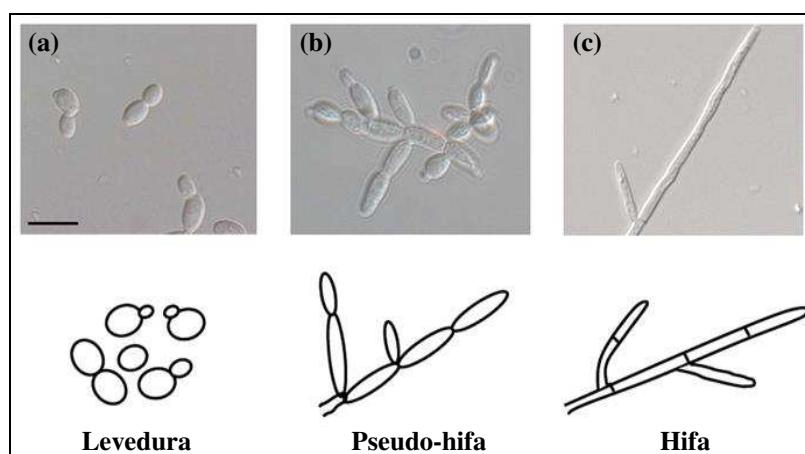
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Micro-organismos do gênero *Candida*

Leveduras do gênero *Candida* pertencentes ao filo ascomycota do reino fungi (WILSON et al., 2018), estão presentes na microbiota normal de indivíduos saudáveis, colonizando principalmente a cavidade oral, gastrointestinal, geniturinária e a pele (DADAR et al., 2018). Esses micro-organismos vivem comensalmente sem causar nenhum risco ao hospedeiro, podendo ser encontrados ainda em quaisquer áreas úmidas e quentes do corpo humano (OLIVER et al., 2019). Contudo, quando há alterações no sistema imunológico do hospedeiro essas leveduras manifestam-se mais agressivamente causando uma série de doenças. O que faz desses micro-organismos os patógenos fúngicos oportunistas mais prevalentes no mundo (ROSCETTO et al., 2018).

No tocante às características morfológicas das espécies desse gênero, *Candida* spp. é considerado um fungo polimórfico, se apresentando tanto como levedura, com a célula em formato ovóide (blastoconídeo) medindo entre 3 e 5 μm de diâmetro, ou mesmo evoluir formando pseudo-hifas e hifas filamentosas (figura 1) (RIBEIRO, 2008). Quanto a parede celular, esta é composta basicamente por quitina, polissacarídeos de glicose e polímeros de manose ligados covalentemente a manoproteínas (SANTANA et al., 2013).

Figura 1 - Principais morfologias de patógenos fúngicos humanos. (Superior) Imagens de células de *C. albicans*, visualizadas por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) (bar = 10 μm). Representação esquemática de cada morfologia.



Fonte: Adaptado de THOMPSON et al., 2011.

Tradicionalmente, as células leveduriformes eram vistas como organismos comensais enquanto as hifálicas consideradas patogênicas. Isso por que esse tipo morfológico apresenta a expressão de inúmeros fatores de virulência (NOBLE, GIANETTI, WITCHLEY, 2017). Porém hoje sabe-se que tanto a forma unicelular quanto a filamentosa possui grande importância para o processo de estabelecimento da infecção por *Candida*.

A forma de levedura (Figura 1a) é substancial para a disseminação do patógeno na corrente sanguínea, favorecendo a colonização de outros órgãos (DESAI, MITCHELL, 2015). Além disso, alguns estudos têm evidenciado a capacidade dessas leveduras de mudar o seu morfotipo transitando entre células brancas, opacas, cinzas e do tipo GUT (Gastrointestinal) de acordo com o nicho em que está inserida. Exibindo assim, diferentes perfis de comensalismo e capacidade de virulência (NOBLE, GIANETTI, WITCHLEY, 2017).

A transição entre morfotipos envolve uma série de fatores de transcrição, sendo os principais envolvidos o Efg1, frequentemente relacionado a alteração de fenótipo da branca para a opaca ou GUT, e da cinza para a branca (XIE et al., 2013). Outro bastante citado é o Wor1, relacionado a mudança do fenótipo opaca para a branca ou cinza, e da GUT para branca. Em síntese, o Efg1 e Wor1 se ligam aos promotores um do outro, onde podem mediar uma repressão transcracional mútua (PETERS et al., 2014). As últimas duas formas, pseudo-hifas e hifas (Figura 1b e 1c) são comumente chamadas de morfologias "filamentosas", isso porque as células além de serem alongadas crescem de maneira polarizada (crescimento apical) (THOMPSON, CARLISLE, KADOSH., 2011). Contudo, através de algumas características é possível diferenciar as duas formas, como por exemplo, as pseudo-hifas são elipsoidais e apresentam constricções nas junções septais, enquanto as hifas são alongadas e possuem septos sem constricções (SU, YU, LU, 2018).

As pseudo-hifas são células que completaram todo o processo de divisão celular, porém não foram capazes de se separar da célula mãe, em contraste com a hifa, que são ramificações do tubo germinativo (SUDBERY, 2011). Além disso, as hifas possuem um sistema de trigmotropismo, na qual crescem de acordo com a topologia do nicho que está inserida facilitando o dano celular do hospedeiro (MAYER, WILSON, HUBE, 2013). Assim, ambas as formas são essenciais para a invasão no tecido do hospedeiro e a colonização em sítios diversificados.

Diante disso, algumas espécies desse gênero têm se destacado por apresentar essas características que contribuem para a sua patogenicidade. Dentre elas está *C. albicans* representando 60 a 90% dos isolados, tornando-se a espécie mais relevante tanto em questão a sua distribuição ampla na natureza, como também em relação aos seus fatores de virulência

(CUÉLAR-CRUZ et al., 2012). Todavia, nos últimos anos com a utilização exacerbada de terapias antifúngicas, a incidência de infecções ocasionadas por espécies não-*albicans* tem crescido. *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. auris* tem se tornado frequente entre isolados clínicos, principalmente em pacientes com problemas hematológicos e associados a infecções nosocomiais (SALCI et al., 2018). Portanto, há uma necessidade urgente de se conhecer mais sobre o perfil de virulência desse gênero.

2.2 Infecções por *Candida* spp.

A patogenicidade dos fungos sobre plantas e animais é amplamente conhecida há muitos séculos, porém quando infecções fúngicas se estendem para humanos o assunto se torna um pouco desconhecido. Nos últimos anos a incidência e a prevalência de infecções ocasionadas por fungos se tornou um problema de saúde pública, devido principalmente ao aumento de cepas resistentes aos antifúngicos presentes no mercado. Estima-se que as mortes ocasionadas por infecções fúngicas invasivas ultrapassem 50% dos casos, com cerca de 1.350.000 mortes por ano (BROWN et al., 2012; QUINDÓS et al., 2018).

Entre as infecções mais comuns envolvendo patógenos fúngicos, aquelas ocasionadas por micro-organismos do gênero *Candida* têm ganhado destaque. A candidíase, como é conhecida, afeta cerca de 250.000 pessoas por ano em todo o mundo (CLEVELAND et al., 2015). Indivíduos imunossuprimidos são os mais acometidos, principalmente aqueles com a Síndrome da Imunodeficiência Humana (SIDA), neonatos, pacientes pós-cirúrgico e transplantados (CUI et al., 2015).

As manifestações clínicas da candidíase decorrem da resposta imunológica do hospedeiro, transitando desde casos leves, frequentemente relacionadas a infecções cutâneas de fácil tratamento, até a disseminação generalizada desse micro-organismo na corrente sanguínea. Neste último caso, a candidíase invasiva ou candidemia, ocorre principalmente devido à alta capacidade desses patógenos de se adaptarem a diversos nichos do indivíduo, utilizando estratégias de adesão e proliferação (DA SILVA DANTAS et al., 2016; MIKAMO et al., 2017; DADAR et al., 2018).

As infecções leves relacionadas a *Candida* normalmente são aquelas cutâneas de fácil tratamento, como a candidíase oral e vulvovaginal. Em relação à primeira, é uma infecção mais frequente em pacientes com a SIDA (COOGAN et al., 2006). Considerada ainda, a primeira via para infecções fúngicas mais complicadas como orofaríngeas e esofágicas (BARBEDO et al., 2010). Quanto a candidíase vulvovaginal, esta representa um dos

principais problemas relacionados ao trato genital inferior das mulheres, apontada como a segunda causa de vaginite aguda depois da vaginose bacteriana. A infecção nessa mucosa pode acometer cerca de 75 % das mulheres em todo o mundo pelo menos uma vez durante a vida (RODRIGUES et al., 2013).

A candidemia, no entanto, está intimamente associada à utilização de implantes médicos como cateteres, stents, tubos endotraqueais e próteses, na qual a superfície do dispositivo facilita a aderência da levedura, levando a posterior formação do biofilme (ROSCETTO et al., 2018). Assim, nos últimos anos tem sido observado um aumento significativo na ocorrência de casos, entre 3 a 5 por 100.000 pessoas, tornando-se a quarta infecção sanguínea mais comum no mundo (PAPPAS et al., 2018).

Embora a maioria das manifestações de *Candida* seja ocasionada pela microflora endógena dos pacientes, alguns estudos relataram a transmissão desses micro-organismos em UTIs (Unidades de Terapia Intensiva), provavelmente relacionadas a equipe médica caracterizando a infecção cruzada por esses micro-organismos (RANGEL-FRAUSTO et al., 1999; KAUR et al., 2020). Assim, infecções relacionadas a espécies de *Candida* podem resultar em um aumento significativo da morbidade e mortalidade em indivíduos debilitados, estando diretamente associado a supressão do sistema imunitário e a dificuldade no tratamento.

2.3 *Candida albicans*

C. albicans é considerada o patógeno fúngico mais comum em humanos, afetando milhares de pessoas em todo o mundo com infecções de origem endógena e exógena (WITCHLEY et al., 2019). Esse micro-organismo possui uma relativa resistência ao ambiente externo, com adaptação para colonizar diversos ambientes com variabilidade de nutrientes, pH e níveis de CO₂ (POULAIN, 2013). Dentre as espécies do gênero *Candida*, essa se destaca por apresentar inúmeros fatores que auxiliam desde a colonização inicial até a manutenção do micro-organismo no sítio do hospedeiro (JABRA-RIZK et al., 2016). Atributos como, a transição morfológica entre leveduras e hifas, a expressão de adesinas e invasinas na superfície celular, trigmotropismo, formação de biofilmes, troca fenotípica e secreção de enzimas hidrolíticas são considerados cruciais para o estabelecimento da infecção (MAYER, HUBE, WILSON, 2013).

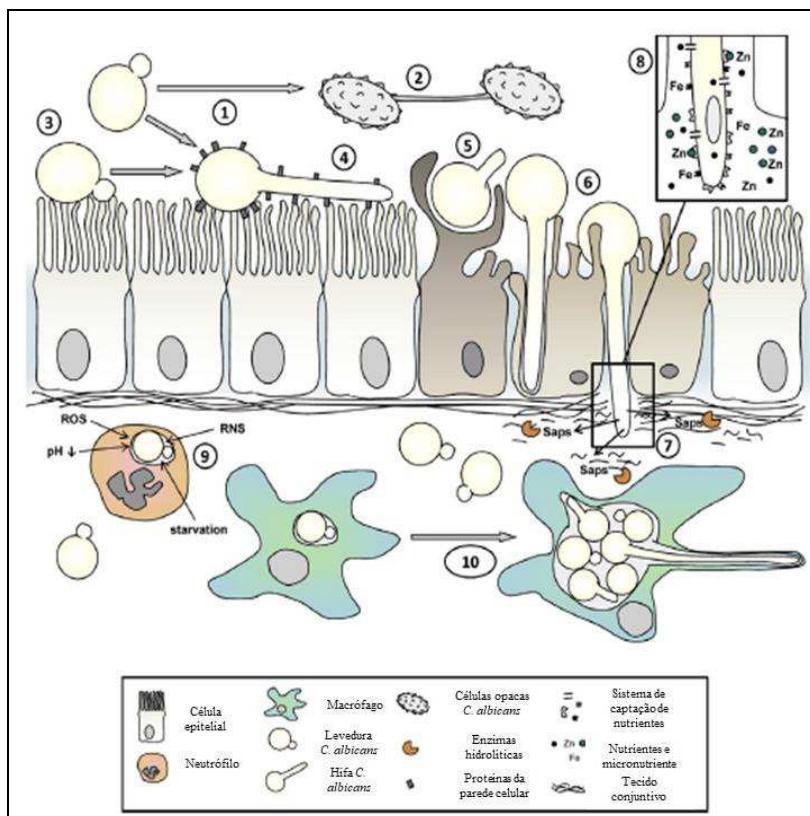
No que concerne às características moleculares, *C. albicans* têm demonstrado significativa diversidade fenotípica e genética, o que contribui para o seu perfil de

patogenicidade (DADAR et al., 2018). Ainda, evidências mostram que a instabilidade genética dessa espécie pode modular o seu comportamento na interface do hospedeiro como a taxa de crescimento, a morfologia, a resistência a estressores, entre outros (BRAUNSDORF, GUT-LANDMANN, 2018). É visto que essas diferenças fenotípicas e diversidade genética intra-espécies provocam mutações naturais na espécie, o que pode alterar o equilíbrio entre patogenicidade e comensalismo (SCÖNHERR et al., 2017). Assim, *C. albicans* se torna um micro-organismo modelo para estudos voltados ao gênero *Candida*, principalmente por suas características singulares durante todo o processo infeccioso.

2.4 Fatores de virulência

A capacidade de transição da forma inofensiva para a patogênica é atribuída a diversos fatores de virulência que auxiliam no processo infeccioso, e na superação dos fatores imunitários do hospedeiro (RIPPKE et al., 2018). Com a quebra do equilíbrio entre o patógeno e o hospedeiro, a colonização é proporcionada através da expressão de fatores relacionados a aderência, polimorfismo e secreção de enzimas hidrolíticas favorecendo a infecção (Figura 2) (SHARMA et al., 2017).

Figura 2 - Estratégias de sobrevivência de *Candida albicans*. (1) flexibilidade morfológica; (2) comutação de branco para opaca e acasalamento; (3) filamentos induzidos por contato; (4) hifa associada a expressão de adesinas; invasão nas células hospedeiras por endocitose induzida (5) ou penetração (6); (7) liberação de enzimas hidrolíticas (por exemplo, proteases aspárticas segregadas (Saps) que suportam a penetração e a degradação do material do tecido; (8) aquisição de nutrientes e micronutrientes das células hospedeiras, por exemplo, sistemas de absorção de zinco e ferro; (9) vias de resposta ao estresse, facilitando a resistência a condições ambientais adversas, por exemplo, espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS), pH baixo; (10) modificação ativa do fagossomo para promover o crescimento da hifa, facilitando dano e fuga de macrófagos.



Fonte: POLKE, HUBE, JACOBSEN 2015.

2.4.1 Adesão

A aderência aos tecidos epiteliais representa o primeiro passo para a colonização de *C. albicans*, na qual é mediada por alguns receptores específicos que estão presentes na superfície citoplasmática. Além desses, alguns estudos têm demonstrado o envolvimento de diversos fatores, fazendo esse processo ainda mais complexo. (MAGDALENA, 2001). Dessa forma, a hidrofobicidade relativa da parede celular de *C. albicans* é considerada um fator não biológico de importância crítica referente à adesão candidal (RAJKOWSKA, KUNICKA-STYCNSKA, PECZEK, 2015).

Um outro fator de relevância elevada para esse processo de adesão é a expressão de adesinas, que está intimamente associado ao início do processo infeccioso possibilitando uma melhor adesão às superfícies celulares (RIBEIRO, 2008). Nos últimos anos foram analisadas uma família de adesinas (Als) presentes no β -1,6-glucano da parede celular envolvidas no processo de adesão e invasão nas células epiteliais e endoteliais (HÖFS, MOGAVERO, HUBE, 2016). Estas adesinas são capazes de formar fibras amilóides e ligar peptídeos aleatoriamente; uma cavidade no terminal N permite um contato inicial extensivo com as células hospedeiras, reconhecendo a porção flexível do terminal C presente em sua superfície

(SALGADO et al., 2011). Apesar de apresentarem atividades relativamente redundantes, dentre as adesinas o Als3 destaca-se por ser expressa na superfície da hifa e por possuir ligação, o que facilita a formação de biofilmes (POULAIN, 2013).

Estudos moleculares também contribuem para a análise do fenômeno de adesão em *C. albicans*, o que já tem demonstrado a expressão de alguns fatores transcripcionais, como Bcr1, Ace2, Snf5 e Arg81 envolvidos no processo de adesão de células para posterior formação de biofilmes (NOBILE, JOHNSON, 2015). Além disso a formação de tubo germinativo, temperatura e produção de enzimas são cruciais para o estabelecimento do patógeno (PUMEESET et al., 2017; MAFOJANE, SHANGASE, PATEL 2017; WITCHLEY et al., 2020).

2.4.2 Polimorfismo

Outro mecanismo de grande importância utilizado por *C. albicans* é o polimorfismo, ou seja, a capacidade desse patógeno de sobreviver como levedura (blastocônídios), ou mesmo evoluir formando pseudo-hifas e hifas filamentosas, apresentando papéis distintos durante o curso da infecção (UWAMAHORO et al., 2014). Sabe-se que a forma leveduriforme está associada principalmente a disseminação do micro-organismo na corrente sanguínea enquanto as hifas auxiliam na invasão dos tecidos (WILSON et al., 2016). Contudo, ainda não se sabe muito sobre a influência das pseudo-hifas nesse processo (MAYER, WILSON, HUBE 2013).

A transição dessas formas normalmente se dá de acordo com o ambiente que o fungo está inserido, através de mudanças de pH, temperatura e presença de soro (DADAR et al., 2018). Por exemplo, em pH baixo (<6), as células de *C. albicans* crescem predominantemente na forma de levedura, enquanto que em pH mais elevado (>7) o crescimento hifal é induzido (ODDS et al., 1988). Esses estímulos ativam a via de sinalização cAMP / PKA ou MAPK, levando à expressão de ativadores principais da formação de hifas, ou seja, os fatores de transcrição Efg1 e Cph1 (SUDBERY, 2011).

Além disso, a formação de hifas está associada a expressão de alguns genes característicos de fatores de virulência. São os mais presentes, a proteína da parede hifal Hwp1, a proteína de sequência semelhante à aglutinina Als3, as proteases aspárticas segregadas (Saps) e as proteínas associadas à hifa Ece1 e Hyr1 (SUDBERY 2011; MAYER, WILSON, HUBE, 2013). Dessa forma, através da produção de estruturas denominadas tubos germinativos as células leveduriformes assumem um crescimento em forma de micélio

resultando em maior variabilidade antigénica e consequentemente maior capacidade de adesão e invasão a diferentes superfícies (OLIVER et al., 2019). Vale ressaltar que essas estruturas hifálicas também são de extrema importância para escapar de células do sistema imunológico do hospedeiro (Da SILVA DANTAS et al., 2016). Tendo em vista que as membranas dos macrófagos não restringem a expansão das hifas, resultando na ruptura dos fagócitos (BAIN et al., 2012). Portanto, a morfogênese de *C. albicans* representa um dos principais fatores de virulência durante o processo infeccioso.

2.4.3 Secreção de enzimas hidrolíticas

A secreção de enzimas hidrolíticas exerce um importante papel na patogenicidade de *C. albicans*, atuando na destruição e desorganização dos elementos da membrana das células do hospedeiro, levando na disfunção ou ruptura física (GALOCHA et al., 2019). As fosfolipases, proteases, lipases e hemolisinas são as principais atuantes nesse processo, tornando-se ainda, essenciais para a aquisição extracelular de nutrientes (NAGLIK, CHALLACOMBE, HUBE 2003).

A primeira família, as fosfolipases, é composta por quatro diferentes classes (A, B, C e D), porém apenas cinco membros da classe B (PLB1–5) são extracelulares e contribuem para a patogenicidade direta de *C. albicans* (MAVOR, THEWES, HUBE, 2005). Estas são responsáveis principalmente por causar danos teciduais, rompendo as membranas por hidrólise de uma ou mais ligações éster dos glicerofosfolipídeos e permitindo as hifas entrarem no citoplasma celular (ROSSONI et al., 2013).

As proteases por sua vez, é uma família composta por dez membros (Sap 1-10). Sap 1-8 são enzimas extracelulares liberadas para o meio circundante, enquanto as duas últimas Sap 9-10 permanecem ligadas a célula de *C. albicans* (MAYER, WILSON, HUBE, 2013). Em relação a atividade enzimática, estas desempenham atividades redundantes, todavia, estudos recentes sugerem que Sap1 e Sap6 não desempenham um papel significativo na virulência de *C. albicans*, enquanto Sap1 a Sap3 não são necessários para o sucesso da infecção por essa espécie (CORREIA et al., 2010). No geral, as proteases possuem como principais funções, a hidrólise de ligações peptídicas, interferência no sistema imunológico, “confundindo-o”, além de interromper a síntese de diversas proteínas importantes, como imunoglobulinas e citocinas (OMBRELLA et al., 2008), contribuindo para a melhor evasão imune.

Uma outra família de enzimas que também influencia de forma significativa a patogenicidade de *C. albicans* são as lipases. Estas, são formadas por 10 genes (Lip1-10)

expressos diferentemente de acordo com o progresso da infecção (CASTILLO, AZCURRA, SOTOMAYOR, 2019). As lipases atuam diretamente na catálise de reações, como a síntese de triacilgliceróis e modulação de reações inflamatórias (TOTH et al., 2017). Estudos têm demonstrado que essas enzimas induzem a produção de altas concentrações de compostos tóxicos de oxigênio e apoptose celular (PARAJE et al., 2008). Além disso, foi relatado a presença dos genes dessa família durante toda a fase de transição hifal de *C. albicans* e infecções experimentais (PARK, DO, JUNG, 2013). De fato, o papel das lipases na patogênese de *Candida* é evidenciado principalmente por seu comportamento adaptável em diversos nichos do hospedeiro.

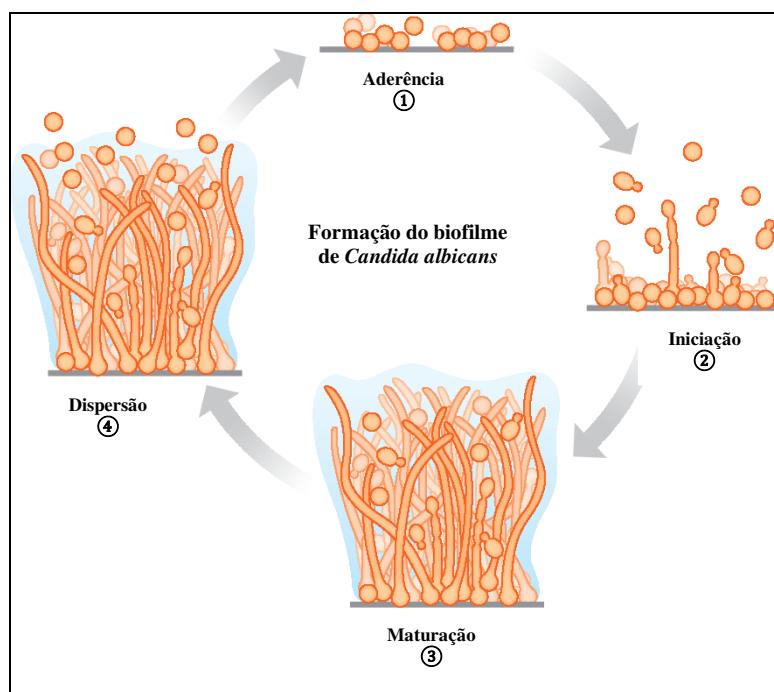
Contribuindo para a característica de adaptação, essa levedura também pode secretar enzimas conhecidas como hemolisinas. São mananoproteínas ligadas à superfície celular que tem como ação principal a destruição de hemácias. Sabe-se que essas enzimas atuam também no sequestro de ferro a partir da degradação de hemoglobinas (SARDI et al., 2013). Tendo em vista que o ferro é um cofator indispensável para várias proteínas e é um pré-requisito para vários processos metabólicos, como respiração celular e síntese de DNA. Dessa forma, a hemolisina é considerada um fator crucial de virulência em *C. albicans* por permitir a disseminação através da corrente sanguínea (KHAN et al., 2020). Em síntese, nenhum fator de virulência se sobressai ao outro, são necessários ambientes propícios para a ativação e expressão coordenada dessas características, que irão possibilitar a patogênese fúngica.

2.5 Formação de biofilme

Uma das mais importantes habilidades dos micro-organismos do gênero *Candida* é a capacidade de se aderir a uma infinidade de superfícies, bióticas ou abióticas, e formar aglomerados microbianos denominados biofilmes (ALIM, SIRCAIK, PANWAR, 2018). Estas comunidades mostram propriedades distintas da forma planctônica, são altamente organizadas e sua estabilidade e proteção é atribuída a uma camada de matriz exopolissacarídica produzida pelas suas próprias células (LÓPEZ et al, 2010). Como comprovada em estudos *in vitro*, a formação do biofilme compreende quatro etapas principais, ou seja, adesão, proliferação, maturação e dispersão (Figura 3) (NOBILE, MITCHELL 2006).

Figura 3 - Estágios da formação de biofilme de *Candida albicans*. ① Adesão das células da forma de levedura a uma superfície. ② Iniciação da proliferação celular, formando uma camada basal de células ancoradoras. ③ Maturação, incluindo o crescimento de hifas

concomitantes com a produção de material da matriz extracelular. ④ Dispersão de células em forma de levedura do biofilme para semear novos locais.



Fonte: NOBILE; JOHNSON 2015.

A primeira fase na formação do biofilme é a adesão, que leva poucas horas dependendo do tipo de substrato. Essa interação entre a levedura e o substrato é possível através de forças eletrostáticas e hidrofobicidade (PIERCE et al., 2017). Após o contato com a superfície, as células fúngicas utilizam adesinas para uma melhor ancoragem, formando assim, uma camada basal para sustentar todo o biofilme (NOBILE, JOHNSON, 2015). Durante esse processo inicial foram descobertos a expressão de diversos genes da família de adesinas, dentre eles ALS1, ALS2, ALS3 ALS4, EAP1, MSB2, PGA6. Além disso, outros genes foram identificados atuando em processos como síntese de DNA, RNA e de proteínas, sugerindo preparação para mudanças morfológicas e fisiológicas drásticas após uma adesão física (FOX et al., 2015).

Na fase seguinte, de proliferação, inicia-se o desenvolvimento de hifas e pseudo-hifas. Essas células seguem se alongando durante todo o desenvolvimento do biofilme, conferindo assim sua robustez (MITCHELL et al., 2016). A mudança de morfologia de *C. albicans* é possível apenas com a mudança de temperatura, pH ou níveis de CO₂, sendo facilmente controlada em ambiente laboratorial. Estudos têm evidenciado ainda, a alta capacidade de formação de biofilmes de cepas clínicas relacionadas à expressão de genes específicos de hifas, confirmando o significado das hifas na formação de biofilmes (RAJENDRAN et al.,

2016).

No processo de maturação, as células produzem a matriz exopolissacarídica que envolve todo o biofilme mantendo-o em conjunto. Esta é composta principalmente de glicoproteínas e carboidratos, juntamente com lipídios e ácidos nucléicos (ZARNOWSKI et al., 2014). Em particular, a matriz exopolissacarídica (EPS) confere maior resistência às células fúngicas tanto aos fatores imunitários do hospedeiro, como as terapias antifúngicas (TAFF, NETT, ANDES, 2012).

Por fim, os biofilmes de *C. albicans* liberam continuamente células de levedura para colonizar outros substratos e garantir o “ciclo de vida do biofilme”, caracterizando assim a fase de dispersão (UPPULURI et al., 2018). Vários componentes, como reguladores da transcrição, proteínas da parede celular, acompanhantes, dentre outros, são cruciais para esta etapa, como Ume6, Pes1 e Nrg1, aumentando ou diminuindo o processo de dispersão (GRANGER, 2012). As células liberadas do biofilme de *Candida* originam-se principalmente das camadas mais superiores, além de apresentarem um fenótipo diferenciado. Em comparação com células planctônicas, as células dispersas exibem maior adesão, maior dano epitelial ao hospedeiro e maior capacidade de formar novos biofilmes (WALL et al., 2019).

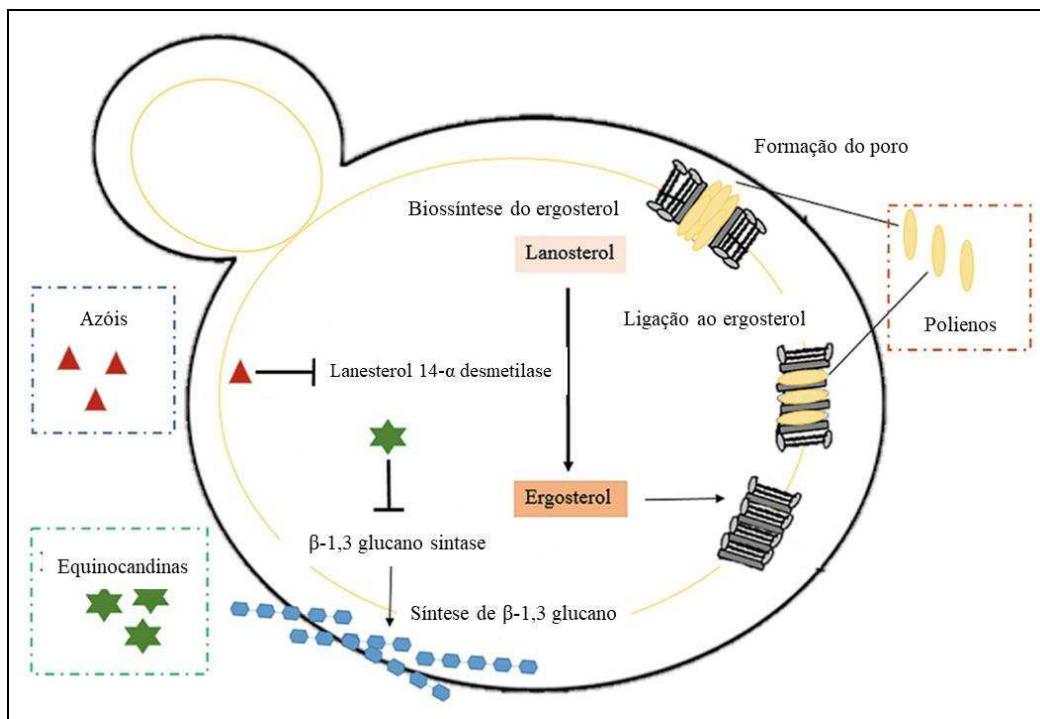
Dentre as vantagens na formação destas comunidades está na maior captação de nutrientes, favorecimento do crescimento celular, proteção a radiação ultravioleta (UV), aos agentes antifúngicos e fagocitose (SUZUKI et al., 2009). Evidências mostram que a resistência do biofilme também está relacionada ao aumento da densidade celular, regulação positiva de bombas de efluxo, ativação de mecanismo de resposta ao estresse, alterações na membrana celular fúngica e a presença de uma subpopulação de células persistentes (TAFF et al., 2012).

Para a manutenção dessa população microbiana um dos mecanismos mais importantes utilizados por *C. albicans* é o *quorum sensing*, na qual possibilita a comunicação entre os micro-organismos. Caracterizado principalmente por propiciar a expressão de alterações fenotípicas marcantes em células fúngicas, é o principal meio para propagação de resistência microbiana (KARKOWSKA-KULETA, RAPALA-KOZIK, KOZIK, 2009). Portanto, essa forma de vida de *C. albicans* regulada através da expressão de diversos genes específicos, propiciando a morfogênese e a mudança na patogenicidade é crucial para a sobrevivência da espécie, seja no hospedeiro, ou no planeta.

2.6 Fármacos antifúngicos

Infecções ocasionadas por *C. albicans* normalmente são de fácil tratamento e não se estendem por longos períodos. Porém, com o surgimento de cepas resistentes e a dificuldade de lançar novos antifúngicos no mercado, a terapia contra esse patógeno têm se tornado um desafio para a comunidade médica. Atualmente está disponível para a terapia antifúngica três classes de fármacos: azóis, equinocandinas e polienos (ARENDRUP et al., 2013). Cada uma dessas classes de drogas possui alvos celulares distintos, como demonstrado na figura 4.

Figura 4 - Mecanismos de ação dos medicamentos antifúngicos atuais.



Fonte: SOONTORNGUN, SOMBOOM, WATCHAPUTI 2019

Cada uma dessas classes possui mecanismos de ação diferentes que culminam na inibição ou morte celular do fungo. Os azóis, como fluconazol (FLC), cetoconazol (CETO), voriconazol (VRC), dentre outros, são amplamente difundidos na clínica. Possuem ação relacionada a inibição da enzima desmetilase P450, crucial para a síntese do ergosterol, levando a paralisação do crescimento celular fúngico (SPAMPINATO, LEONARDI 2013). Contudo, apesar de ser a classe de antifúngicos de primeira escolha no tratamento de infecções por *C. albicans*, esses medicamentos possuem apenas caráter fungistático, ou seja, não são capazes de erradicar os micro-organismos (KUHN et al., 2002).

Além disso, diversas pesquisas apontam o aumento da resistência dos micro-

organismos quando postos em contato com medicamentos dessa classe (PRISTOV, GHANNOUM 2019). Assim, alguns mecanismos têm sido propostos com objetivo de explicar a resistência de *Candida* aos azóis. A introdução de bombas de efluxo na parede celular é um desses mecanismos, favorecendo o bombeamento do fármaco para fora da célula (SAKAGAMI et al., 2019). Outra estratégia é a alteração da enzima alvo, dificultando a ligação do fármaco e evitando alteração na membrana celular (SPAMPINATO, LEONARDI 2013).

Assim, outros fármacos têm sido utilizados na terapia antifúngica, como é o caso das equinocandinas. Essas drogas possuem mecanismo de ação voltado para inibidores das 1,3-β-D-glucanas sintase Fks1 / Fks2, enzimas responsáveis pela síntese de 1,3-β-D-glucana, um componente importante e essencial da parede celular de todos os fungos (TSCHERNER, KUCHLER, SCHWARZMÜLLER 2011). Os medicamentos aprovados dessa classe (caspofungina, anidulafungina e micafungina) são inibidores não competitivos de Fks1 / Fks2, interrompendo a integridade e organização estrutural da parede celular, exercendo ação fungicida. E tendo em vista que as células eucarióticas humanas não possuem parede celular, a enzima glucano sintase se torna um alvo de grande importância, reduzindo os índices de citotoxicidade (PIERCE et al., 2013). Todavia, em alguns estudos recentes têm documentado a susceptibilidade reduzida de isolados a esse fármaco, indicando o surgimento de resistência (PRISTOV, GHANNOUM 2019). Foi observado ainda, que as cepas isoladas possuíam mutação em alguns genes responsáveis pela codificação do alvo β-(1,3) D-glucana sintase, o que ocasiona a mudança e inibição da ação das equinocandinas (MEDICINI, POETA 2015).

Então, na tentativa de tratar a infecção, os profissionais de saúde utilizam como última escolha a classe dos polienos. Estes antifúngicos tais como a anfotericina B (AmB), possuem como principal alvo o ergosterol, um esterol essencial na membrana fúngica. Após a ligação do fármaco ao ergosterol inicia-se o processo de formação de poros e extravasamento do conteúdo intracelular, com consequente perda de íons de K⁺ e Mg⁺⁺ e morte do patógeno (ALDER-MOORE et al., 2019).

Porém apesar de exibirem amplo espectro de ação com concentrações relativamente baixas e praticamente nenhum relato de resistência, esse fármaco apresenta elevados níveis de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (RODRIGUEZ et al., 2020). De acordo com alguns estudos, cerca de 80 % dos pacientes que fazem o uso de AmB para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas apresentaram aumento da creatina sérica, enquanto cerca de 40 % a 60 % dos pacientes teve a concentração de creatina dobrada, e 15 % evoluíram para disfunção renal com necessidade de diálise (LANIANO-LABORIN; CABRALES-VARGAS 2009;

SCHLOTTFELDT et al., 2015). Justificando assim, a utilização dessa classe de antifúngicos como último recurso no tratamento de infecções por *C. albicans*.

Quanto às formas mais resistentes, como o biofilme, esses antifúngicos possuem ação reduzida acarretado principalmente pela matriz extracelular que protege as células. Com mecanismos relacionados ao sequestro de moléculas dos antifúngicos impedindo a entrada nas camadas mais densas, hiperexpressão de bombas de efluxo e a presença de células persistentes, o biofilme se torna uma grande barreira para um tratamento eficiente por essas drogas (TAFF et al., 2013).

Os antifúngicos da classe dos azóis, principalmente o FCZ, não são tão eficazes contra biofilmes de *Candida*, assim como os polienos, que necessitam de altas concentrações para a erradicação, o que pode ocasionar citotoxicidade (KUHN et al., 2004). No entanto as equinocandinas, como discutido anteriormente, possui ação voltada para a parede celular fúngica, exibindo excelente atividade anti-biofilme em concentrações terapêuticas em cepas que não apresentam resistência (PIERCE et al., 2013). Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de drogas eficazes que culmine na morte do patógeno até nas formas mais resistentes, com seletividade elevada a células microbianas sem causar nenhum tipo de citotoxicidade, levando assim, o progresso da terapia antifúngica.

2.7 Peptídeos antimicrobianos – PAMs

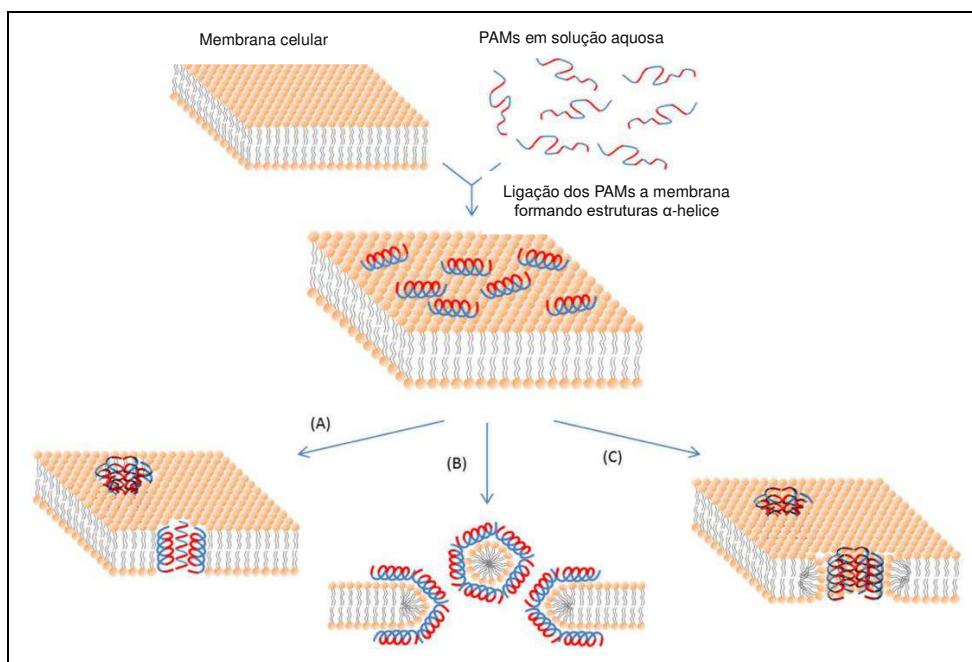
Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são oligopeptídeos encontrados naturalmente no sistema imune inato de diversos organismos, desde vírus até mamíferos incluindo o ser humano (BAHAR et al., 2013). Esses PAMs são moléculas pequenas, com cerca de oito a cinquenta aminoácidos e possuem natureza catiônica/anfipática que facilitam a interação com a membrana fosfolipídica (CHERAGHI et al., 2018).

A ação antimicrobiana dessas biomoléculas tem sido reconhecida a alguns anos, principalmente contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos (JENSSSEN et al., 2006; MIGÓN et al 2018). Com mecanismo de ação voltado principalmente para a formação de poros na membrana fosfolipídica, essas biomoléculas dificilmente desencadeiam resistência microbiana (BAHAR et al., 2013).

Diversos modelos têm sido propostos na tentativa de explicar a formação de poros causados pelos PAMs, porém apenas três são os mais aceitos: o modelo poro toroidal, barril e o modelo carpete (Figura 5) (NGUYEN et al., 2011; JAVIA et al., 2018). É importante ressaltar que a interação do peptídeo com as membranas fosfolipídicas se dá primeiramente

através de forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas, seguida pela formação de poros e lise celular (BROGDEN, 2005).

Figura 5 - Representação esquemática de alguns mecanismos de ação de PAMs ativos em membrana. (A) Modelo Barril: As moléculas do PAM se inserem na membrana perpendicularmente. (B) Modelo de carpete: Pequenas áreas da membrana são revestidas com moléculas do PAM com lados hidrofóbicos voltados para dentro, deixando os poros para trás na membrana. (C) Modelo de poro toroidal: Esse modelo se assemelha ao modelo barril, mas os PAMs estão sempre em contato com os grupos de cabeça fosfolipídica da membrana. A cor azul representa as porções hidrofóbicas dos PAMs, enquanto a cor vermelha representa as partes hidrofílicas.



Fonte: SWITHENBANK, MORGAN 2017.

No modelo de poro toroidal, a região hidrofílica dos PAMs se associa com a porção polar do fosfolipídeo que liga as monocamadas lipídicas para adquirir uma curvatura estável e formar poros, ocasionando o extravasamento do conteúdo intracelular (BOZELLI et al., 2011). No modelo de barril o peptídeo se arranja em uma condição transmembranar, com as regiões hidrofóbicas interagindo com a região do núcleo lipídico enquanto as hidrofílicas formam a face interior do poro (GUILHELMELLI et al., 2013). Para o modelo de carpete, os peptídeos cobrem a membrana como um tapete. Ao obter uma concentração limiar, os PAMs penetram na membrana celular e, formam micelas contendo resíduos da membrana (DE LIMA, 2012). Existe ainda a possibilidade de alvos intracelulares para os PAMs, porém ainda

não são muito bem elucidados. Sabe-se que os PAMs podem se ligar a alvos importantes ocasionando a inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas (LIU et al., 2011).

Nessa perspectiva, com o aumento exponencial de fungos resistentes, os peptídeos antimicrobianos podem representar uma solução plausível para o tratamento de doenças fúngicas. No entanto essas biomoléculas ainda apresentam algumas limitações, como a atividade citolítica em eritrócitos humanos, baixa estabilidade em fluidos humanos além do alto custo (TORCATO et al., 2013). Em razão disso a produção de peptídeos sintéticos tem crescido nos últimos anos na tentativa de contornar esses problemas, com modificações que conferem melhoria na ação antimicrobiana, bem como na diminuição dos efeitos citotóxicos.

2.8 Peptídeos sintéticos

O processo de síntese de peptídeos oferece inúmeras vantagens na obtenção de novas biomoléculas, permitindo a modificação precisa de aminoácidos de forma a potencializar estrutura/atividade (FUENTE-NUÑES; HANCOCK 2010), além de viabilizar a inserção de moléculas não naturais e aumentar o tamanho da sequência (HANEY; MANSOUR; HANCOCK 2017). Desse modo, a modificação de PAMs visa a alteração de algumas características naturais, como aumento de carga positiva, anfipaticidade, hidrofobicidade e etc (XU et al., 2015). Ademais, é sabido que mudanças simples no aminoácido tem efeito substancial na estrutura secundária e consequentemente, na sua atividade (JIANG et al., 2008).

Para que essas mudanças ocorram são necessários estudos relacionados a modelos de peptídeos já existentes, estudos biofísicos e triagem virtual. Na primeira é utilizado como base um modelo de PAM já existente para confecção de uma nova biomolécula com ação potencializada, com mudanças mais gerais ou pontuais. Já em relação ao estudo biofísico, este busca a ação do PAM através de diferentes designs, avaliando a estrutura em nível atômico, ou analisando o desempenho em ambiente hidrofóbico, incluindo termodinâmica, simulação de dinâmica molecular, e interações peptídeo/membrana microbiana. Quanto a triagem virtual, ela é responsável por inferir propriedades quantificáveis dos peptídeos, tais como hidrofobicidade, carga e, posteriormente, a relação da atividade biológica (SAFDER; ISLAM 2017).

Dessa maneira são conferidos aspectos como especificidade, citotoxicidade e estabilidade através de ajustes de sequência primária, densidade de elétrons, permitindo interações com as membranas negativamente carregadas de micro-organismos, mas

restringindo as interações com células eucarióticas. Além de introdução de aminoácidos não naturais ou D-aminoácidos para garantir a estabilidade do PAM quando em contato com fluidos e proteases humanas (TORRES et al., 2019). Como sugere Loose et al (2006), os PAMs são originalizados de acordo com uma linguagem formal, a partir do vocabulário (resíduos de aminoácidos) e regras (padrões de aminoácidos), agindo de forma mais específica, reconhecendo alvos e agindo nas membranas microbianas.

Assim, através de uma sequência base padrão de um PAM é gerado peptídeos otimizados e funcionais (PORTO et al., 2018; CARDOSO et al., 2020). Todas essas técnicas contribuem para a descoberta de inúmeros PAMs com eficácia terapêutica sem a interferência intensa na natureza, além de conferir características adicionais que viabilizam seu uso no combate a micro-organismos, tais como *C. albicans*.

2.9 K-aureína

Os peptídeos de aureína (AU) são uma grande família de PAMs encontrados nas secreções de glândulas granulares da pele das rãs *Litorea aurea* e *L. raniformes* dotados de vários graus de ação antimicrobiana (DURGEST et al., 2017). Aureína é considerado um dos mais potentes PAMs de sequência curta, com atividade comprovada contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (LAADHARI et al., 2016). Além de alguns estudos demonstrarem eficácia contra células tumorais, com baixa taxa de toxicidade em eritrócitos humanos (ROZEK et al., 2000).

Em virtude da sequência curta, aureína é muito utilizado para a obtenção de PAMs sintéticos a partir de modificações simples em aminoácidos (RAMEZANZADEH et al., 2020). Na presente proposta, é analisado o potencial antifúngico do peptídeo K-au, um análogo da aureína, que em cuja sequência de aminoácidos foi adicionado uma lisina (K) na extremidade N-terminal da sequência polipeptídica da estrutura nativa (AU), isto através de modificação estrutural pontual por Síntese de Peptídeos de Fase Sólida (SPFS) (LORENZÓN et al., 2013).

O PAM K-au resultou então na seguinte sequência de aminoácidos: KGLFDIINKKIAESF, com propriedades que conferem ação antibacteriana através de mecanismos voltados para a formação de poros, como os peptídeos antimicrobianos catiônicos convencionais (DA SILVA, 2017). Desse modo surge o interesse em avaliar a ação deste PAM contra fungos patogênicos, preferencialmente aqueles do gênero *Candida*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade antifúngica do peptídeo antimicrobiano sintético K-au e o impacto das concentrações subinibitórias sobre o perfil de virulência de isolados clínicos de *C. albicans*.

3.2 Objetivos específicos

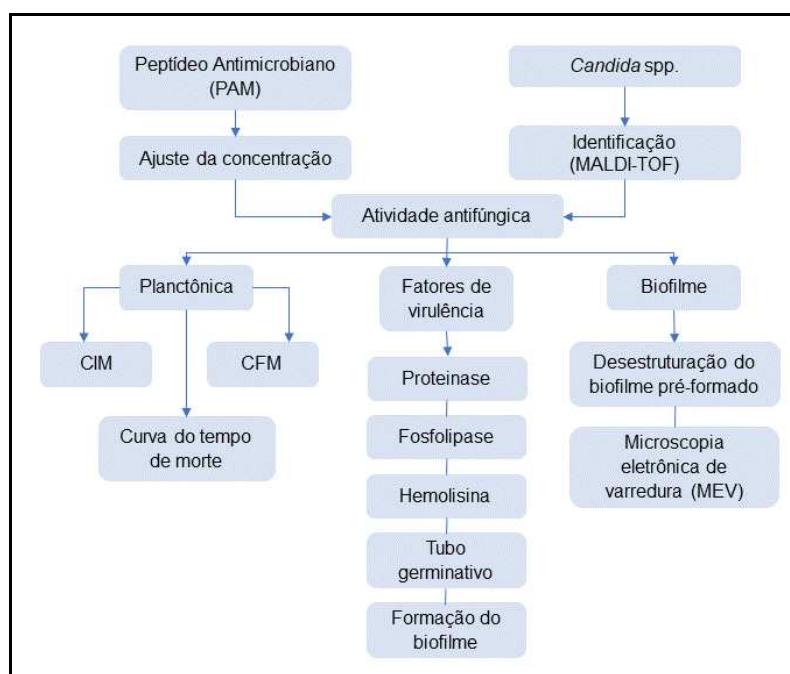
- Determinar as concentrações inibitória e fungicida mínima do peptídeo antimicrobiano K-au e dos antifúngicos fluconazol (FLC), cetoconazol (CETO) e anfotericina B (AmB) contra isolados clínicos de *C. albicans*;
- Avaliar a cinética de morte das cepas de *C. albicans* frente a K-au e a AmB;
- Verificar a ação de K-au e AmB sobre a virulência dos isolados de *C. albicans*, quanto a atividade de fosfolipase, proteinase, hemolisina, formação de tubo germinativo e formação do biofilme.
- Analisar a atividade de K-au e AmB sobre o biofilme pré-formado de isolados clínicos de *C. albicans* quanto a biomassa e viabilidade celular.
- Analisar as modificações estruturais do biofilme de *C. albicans* após o tratamento com a K-au e AmB através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fluxograma experimental

Esse estudo possui como objetivo principal avaliar a ação antifúngica do PAM K-au sobre isolados clínicos de *C. albicans*, segundo o fluxograma abaixo (Figura 6). Inicialmente foram realizados ensaios de atividade antifúngica para determinação da concentração inibitória e fungicida mínima (CIM e CFM), seguido da análise da cinética de morte dos micro-organismos frente aos antimicrobianos. No que concerne a análise dos fatores de virulência das cepas, foram realizados ensaios sobre a inibição da atividade das enzimas proteinase, fosfolipase e hemolisina, e inibição da formação de tubo germinativo e biofilme. Por fim, foi realizado o ensaio de inibição do biofilme pré-formado através da quantificação da biomassa e contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFCs), com posterior análise da desestruturação do biofilme em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Figura 6 - Fluxograma das atividades realizadas para obtenção do objetivo geral do estudo.



Fonte: Próprio autor, 2021.

4.2 Aspectos éticos da pesquisa

A coleta de dados e procedimentos experimentais utilizando isolados clínicos de

material humano seguiu a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, sob aprovação do Comitê de Ética da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA com N° do parecer 644.365, garantindo a confidencialidade e privacidade, proteção de imagem e não estigmatização dos participantes da pesquisa (BRASIL, 2012).

4.3 Solução e armazenamento das substâncias testes

O peptídeo foi gentilmente cedido pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Eduardo Cili da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, o qual foi sintetizado e purificado. O peptídeo foi dissolvido em água deionizada estéril com 0,1% de ácido acético à concentração de 3 mg.mL⁻¹ e armazenado em freezer -20 °C. Além do PAM foram utilizados no estudo três antifúngicos: fluconazol (FCZ), cetoconazol (KCZ) e anfotericina B (AmB), estes foram obtidos comercialmente e preparados para a concentração de 2, 16 e 32 mg.mL⁻¹ respectivamente, de acordo com o protocolo M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Após a preparação foram estocados em alíquotas de 1 mL e armazenados para posterior utilização.

4.4 Cepas microbianas e condições de cultivo

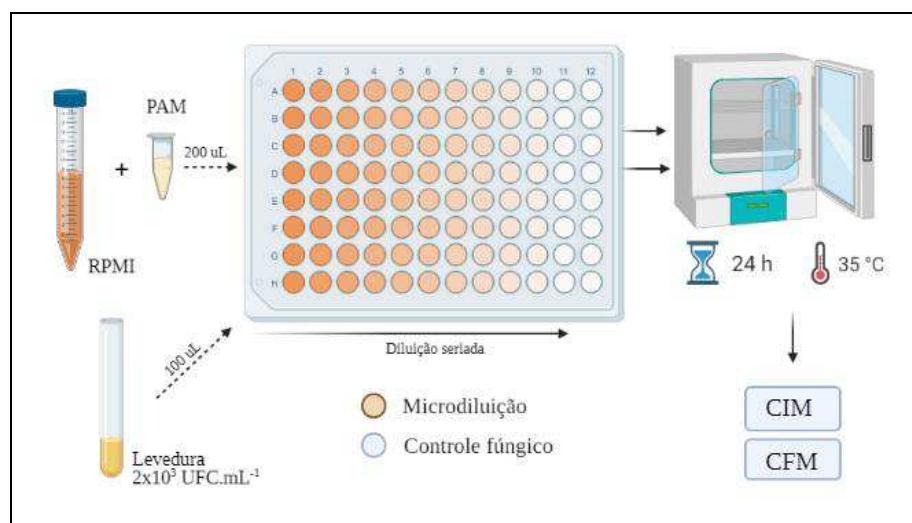
Foram utilizados no estudo três cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes da Santa Casa de Misericórdia de Sobral (SCMS) Ceará – Brasil, além da cepa padrão ATCC 90028 disponibilizada pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro – Brasil. Os isolados clínicos foram identificados através de MALDI-TOF (*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight*) e estocados em meio Sabouraud Dextrose Broth (SDB) com 20% de glicerol a -80 °C. Para ativação, uma alíquota de 50 µL do estoque foi inoculada em 5 mL de meio SDB por 24 h a 35 °C em agitação. Após 24 h de incubação, as culturas foram renovadas, e em seguida mantidas sob as mesmas condições por 18 h. Para utilização nos ensaios biológicos, a suspensão microbiana foi ajustada em câmara de Neubauer de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental.

4.5 Determinação da atividade antifúngica – CIM e CFM

A atividade dos antifúngicos e do peptídeo K-au foi verificada segundo o teste de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços padronizado pelo *Clinical and*

Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). Foram realizadas diluições seriadas na base dois para obtenção de diferentes concentrações de cada agente em um volume de 100 µL. Em seguida 100 µL do micro-organismo ajustado para 2×10^3 UFC.mL⁻¹ foram adicionados aos poços da placa obtendo um volume final de 200 µL. Os poços contendo apenas inóculo e meio de cultura SDB foram utilizados como controle de crescimento microbiano. Após a montagem, a placa foi incubada durante 24 h a 35 °C em agitação constante (150 RPM). Foi considerado como Concentração Inibitória Mínima (CIM) a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano após 24 h de incubação. Para determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM), 10 µL dos poços que não houveram crescimento microbiano visível foram inoculados em placas de petri contendo meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Após um período de 24 h de incubação a 35 °C, foi considerado CFM a menor concentração capaz de erradicar completamente o micro-organismo na superfície do ágar (Figura 7).

Figura 7 - Desenho esquemático do ensaio Determinação da atividade antifúngica – CIM e CFM.



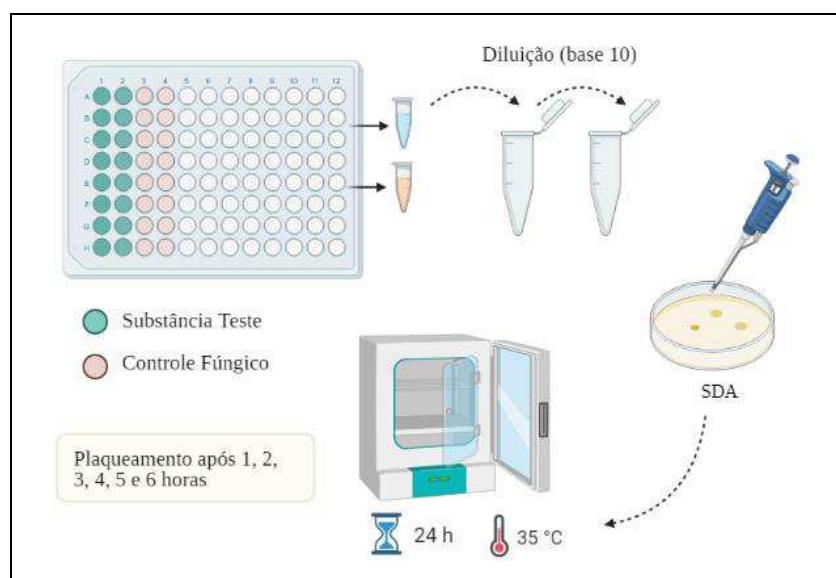
Fonte: Próprio autor, 2021.

4.6 Ensaio da cinética de morte frente aos antimicrobianos

Para o ensaio da curva do tempo de morte foi realizada a medição do número de células viáveis de *C. albicans*, quando submetida à ação de K-au e AmB. Após o ajuste da concentração das células para 1×10^3 UFC.mL⁻¹ 100ul dessa suspensão foi distribuída nos poços de uma placa de microtitulação, e incubada a 35 °C em contato com a CFM de cada

agente antimicrobiano. Após 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h de incubação, 10 µL da suspensão microbiana de cada poço da placa foram diluídos em série na base 10 em solução de NaCl 0,15 M. Em seguida, 10 µL de cada diluição foram inoculados em placas de petri com SDA e incubados por 24 h a 35 °C. As Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) foram enumeradas e realizada a correção do número de células multiplicando o número de UFC pela diluição, o qual foi expresso como UFC.mL⁻¹ (Figura 8).

Figura 8 - Desenho esquemático do ensaio Curva do tempo de morte.



Fonte: Próprio autor, 2021.

4.7 Ensaios de inibição dos fatores de virulência

4.7.1 Inibição de Fosfolipase

Inicialmente foram preparados o meio SDA suplementado com gema de ovo (184 mL de meio SDA (13,0 g) com 11,7 g de NaCl e 0,11 g de CaCl₂ na qual foi esterilizado e posteriormente adicionado 20 mL de emulsão de gema de ovo). Foram transferidas 0,5 mL das células de leveduras previamente ajustadas para dois tubos, o primeiro com 2 mL de PBS e o segundo com 2 mL de PBS/Antifúngicos com concentrações subinibitórias. Os tubos foram incubados a 37 °C durante 30 minutos e posteriormente centrifugados (3000g por 10 min). Em seguida o precipitado foi ressuspêndido em 2,5 mL de PBS, e 10 µL da suspensão foi inoculado em placas contendo o meio SDA suplementado (figura 9). A atividade fosfolipásica (Z_p) foi determinada pela divisão do diâmetro da colônia da levedura pelo diâmetro total da

zona de precipitação (colônia + zona de precipitação).

$$Zp = \text{Diâmetro Colônia} / (\text{Diâmetro Colônia} + \text{precipitação})$$

A atividade fosfolipásica foi classificada em 5 grupos: ($Zp = 1$) sem atividade, ($Zp = 0,90 - 0,99$) atividade fraca, ($Zp = 0,80 - 0,89$) atividade suave, ($Zp = 0,70 - 0,79$) atividade moderada, ($Zp = \leq 0,69$) atividade potente (PRICE, WILKINSON, GENTRY 1982).

4.7.2 Inibição de Proteinase

Inicialmente foram preparados dois meios de cultura, o primeiro apenas ágar em 900 ml de água destilada, e segundo, uma solução com 2,5 g de vitamina líquida (PROTOVIT) mais 11,5 g de SDB e 2 g de BSA em 100 ml de água destilada. Após esterilizados, os meios foram misturados e transferidos para placas de petri. Concomitante a isso, foram transferidas 0,5 mL das células de leveduras previamente ajustadas para dois tubos, o primeiro com 2 mL de PBS e o segundo com 2 mL de PBS/Antifúngicos com concentrações subinibitórias. Os tubos foram incubados a 37 °C durante 30 minutos e posteriormente centrifugados (3000g por 10 min). Em seguida o precipitado foi ressuspensido em 2,5 mL de PBS, e 10 µl da suspensão foi inoculado em placas contendo o meio suplementado a uma temperatura de 37 °C por 5 dias (figura 9). A produção de protease foi verificada pelo halo em torno da formação da colônia resultando da hidrólise do substrato. A atividade proteinásica (Zp) foi determinada pela divisão do diâmetro da colônia da levedura pelo diâmetro total da zona de precipitação (colônia + zona de precipitação).

$$Zp = \text{Diâmetro Colônia} / (\text{Diâmetro Colônia} + \text{precipitação})$$

A atividade enzimática foi classificada em: negativa ($Zp = 1$), positiva ($Zp \geq 0,64 < 1$) e fortemente positiva ($Zp < 0,64$) (CASTILHO *et al.*, 2018).

4.7.3 Inibição de Hemolisina

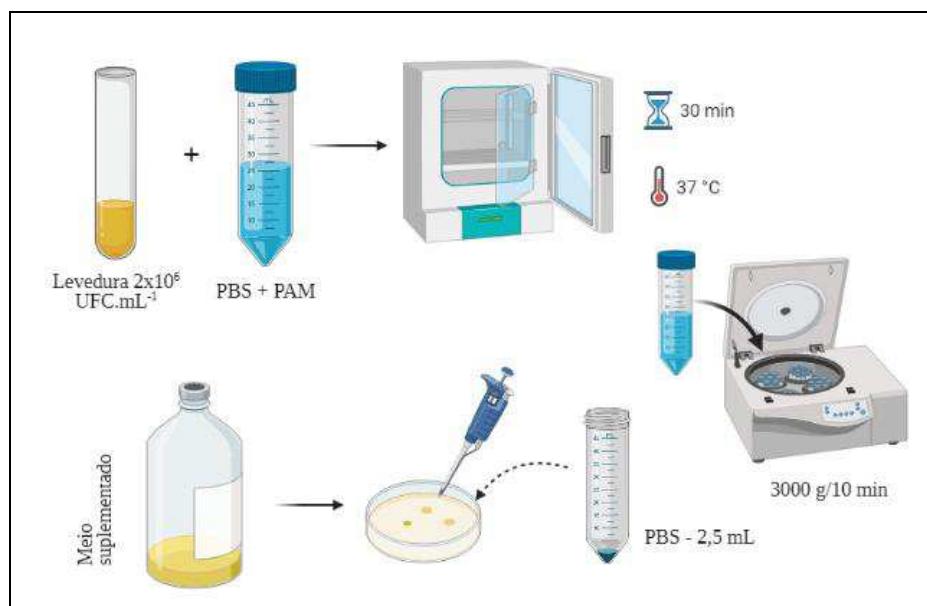
Para análise da atividade hemolítica, os isolados de *C. albicans* previamente ajustados para a concentração 1×10^6 UFC.mL⁻¹ foram postos em contato com K-au e AmB em concentrações subinibitórias por um período de 1 hora em estufa a 37 °C. Após esse período

foram realizadas centrifugações para a retirada das substâncias testes, e o precipitado foi ressuspensionado em PBS e então inoculado 10 µl em meio SDA suplementado com 3% de glicose e 7% de sangue de ovelha. Em seguida as placas foram incubadas por 48 horas em estufa a 37 °C (figura 9). A produção de hemolisina foi verificada pelo halo em torno da formação da colônia resultando da hidrólise do substrato. A atividade da hemolisina (Zp) foi determinada pela divisão do diâmetro da colônia da levedura pelo diâmetro total da zona de precipitação (colônia + zona de precipitação).

$$Zp = \frac{\text{Diâmetro Colônia}}{\text{Diâmetro Colônia} + \text{Precipitação}}$$

A atividade enzimática será classificada em: negativa ($Zp = 1$), positiva ($Zp \geq 0,64 < 1$) e fortemente positiva ($Zp < 0,64$) (OLIVEIRA et al., 2016).

Figura 9 – Desenho esquemático do ensaio de inibição da secreção de enzimas hidrolíticas (fosfolipase, proteinase e hemolisina).



Fonte: Próprio autor, 2021.

4.7.4 Inibição da Formação de Tubo Germinativo

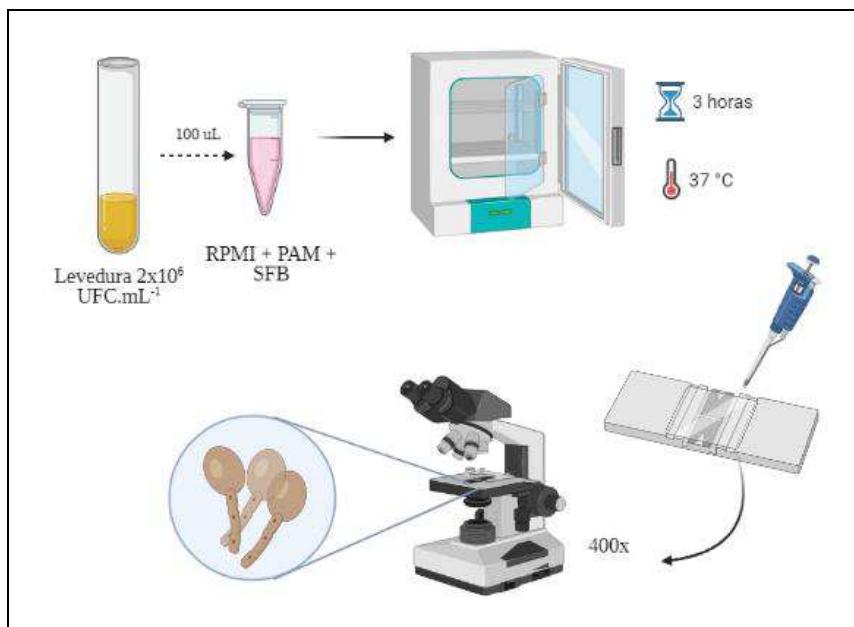
Inicialmente a suspensão fúngica foi ajustada para 1×10^6 UFC.mL⁻¹ e inoculada em eppendorf com meio RPMI contendo 10 % de BSA (*Bovine Serum Albumin*) na presença ou ausência da substância teste, e incubado a 37 °C em agitação (100 RPM) por cerca de 3 horas. Após esse período, as células foram analisadas por microscópio de luz com aumento de 400x

(figura 10). Os resultados foram expressos como FTG/100 células (formação do tubo germinativo para cada 100 células). O percentual de redução de germinação (PRG) foi calculado através da seguinte equação:

$$\text{PRG} = (\text{FTG}_{\text{controle}} - \text{FTG \% teste}) \times 100$$

Os resultados serão classificados em: baixo (0 - 30%), moderado (31 – 59%) e alto (acima de 60%) (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Figura 10 - Desenho esquemático do ensaio Inibição da Formação de Tubo Germinativo.



Fonte: Próprio autor, 2021.

4.8 Atividade antibiofilme

4.8.1 Inibição da formação do biofilme

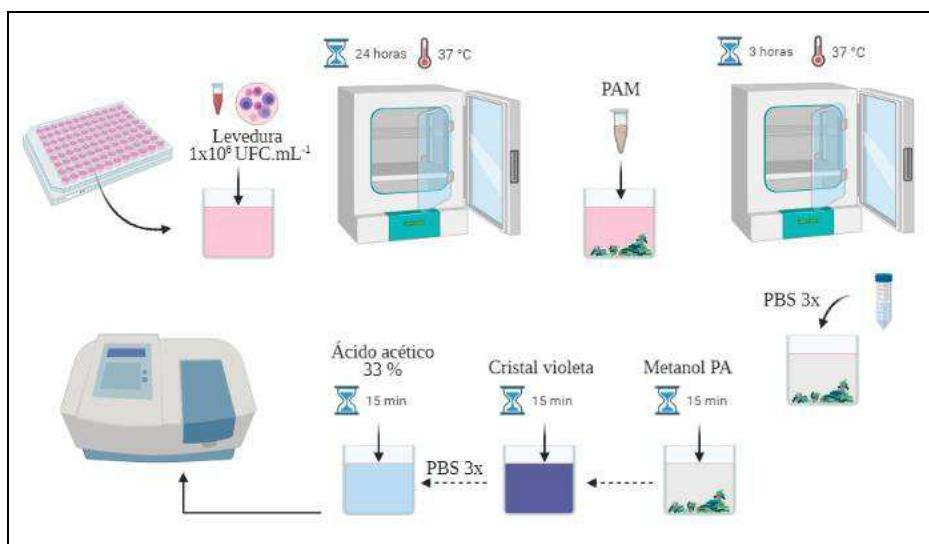
A análise da inibição da formação do biofilme por K-au e AmB foi realizada a partir da quantificação da biomassa com Cristal Violeta (CV). Inicialmente as placas de poliestireno de fundo chato foram montadas como descrito no item 4.5, com a microdiluição do antimicrobiano, adição da levedura e posterior incubação por 24 h a 37 °C. Por fim, foi quantificado a biomassa do biofilme formado.

4.8.2 Ataque ao biofilme pré-formado

O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços para testar o efeito de K-au e AmB sobre biofilmes pré-formados de *C. albicans* utilizando a metodologia de YADAV et al. (2015) com modificações. Os biofilmes de cada uma das cepas foram formados com uma concentração inicial de células de 1×10^6 UFC.mL⁻¹ durante 24 h e, posteriormente, lavado três vezes (3x) para retirada das células planctônicas residuais. Os poços contendo biofilmes foram tratados com 200 µL de K-au e AmB na concentração de CIM por 3 h a 37 °C. Após nova lavagem dos poços com PBS, a quantificação do biofilme foi determinada pela técnica do cristal violeta (CV) e a viabilidade celular por contagem de UFCs.

Para a quantificação da biomassa residual do biofilme, as células planctônicas foram removidas e os poços lavados duas vezes com água destilada. Após secagem da placa a temperatura ambiente, 200 µL de álcool metílico foram adicionados por 15 min para fixação das células aderidas. Após a remoção do metanol, 200 µL de CV 0,1% (Synth®, São Paulo, Brasil) foram adicionados por 10 min para permitir a quantificação da biomassa através da coloração. Em seguida o CV foi removido e adicionado de 200 µL de ácido acético 33% por 10 min para dissolução do corante preso ao biofilme. A suspensão obtida foi transferida para uma nova placa onde foi realizada a leitura da absorbância através do espectrofotômetro $\lambda = 590$ nm (figura 11).

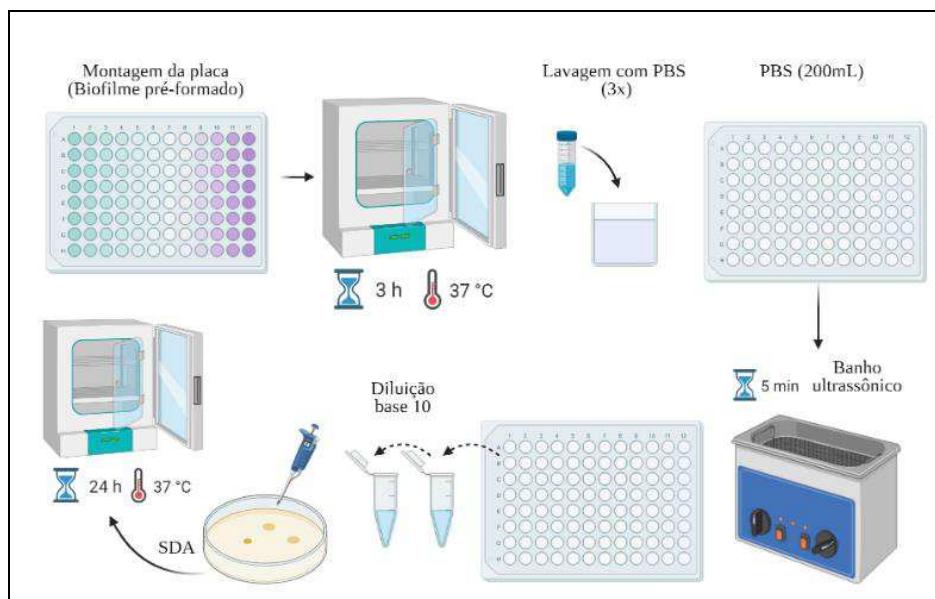
Figura 11 - Desenho esquemático do ensaio Quantificação da biomassa por Cristal Violeta (CV).



Fonte: Próprio autor, 2021.

A viabilidade celular do biofilme foi determinada por contagem de UFCs como descrito por YADAV et al. (2015) com modificações. Após tratamento e lavagem das placas, os poços foram preenchidos com 200 µL de PBS para desprendimento das células em biofilmes utilizando ultrassom digital (GNATUS, São Paulo, Brasil) por 5 minutos. Em seguida foram realizadas diluições seriadas na razão de 1:10 dos biofilmes, e posteriormente 10 µl foram adicionados à superfície do SDB e incubados por 24 h a 37 °C para contagem das colônias formadas (figura 12).

Figura 12 - Desenho esquemático do ensaio Viabilidade celular pela Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs).



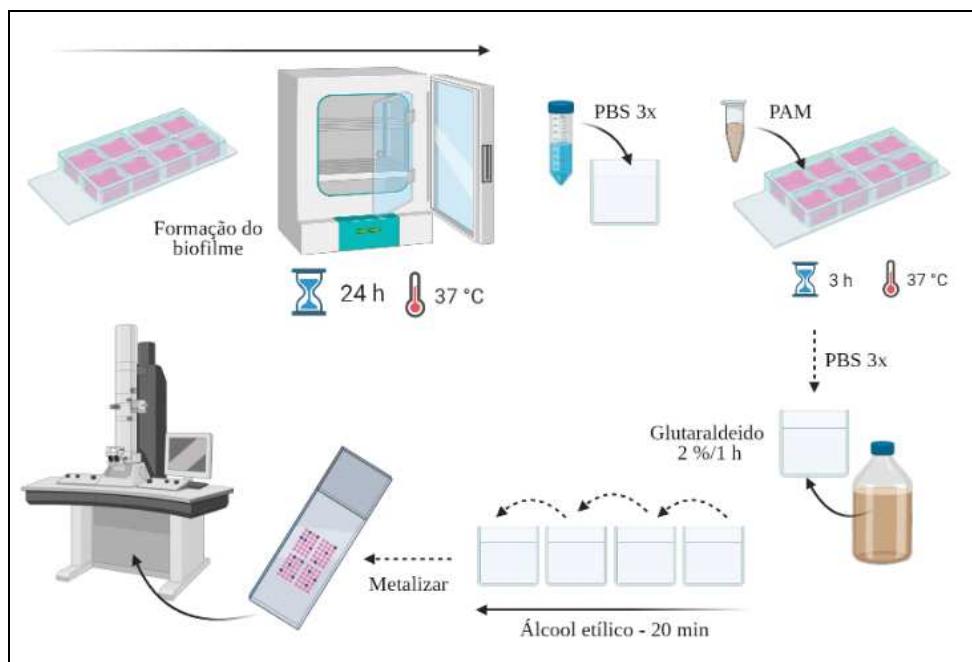
Fonte: Próprio autor, 2021.

4.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As alterações do arranjo estrutural do biofilme de *C. albicans* induzidas pelo tratamento com K-au e AmB (CIM) foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV - Inspect S50 - FEI Company®, Oregon, EUA), segundo Yadav et al (2015) com modificações. O biofilme foi formado a partir de uma suspensão celular (1×10^6 UFC.mL⁻¹) em RPMI fresco por 24 h a 37 ° C em placas de 24 poços contendo lâminas de vidro (1 cm x 1 cm). As lâminas foram então lavadas três vezes com PBS e as células adsorvidas na superfície foram tratadas com K-au e AmB (CIM) por 3 h a 37 ° C. Para o grupo controle, foi utilizado apenas PBS (solução diluente). Antes da análise por MEV, as células foram pré-fixadas com

glutaraldeído 2% e desidratadas com solução de álcool a 10, 30, 50, 70, 90 e 100% por 20 minutos cada, e secas à temperatura ambiente. As lâminas foram fixadas sobre o suporte de amostra de alumínio (*stubs*) e revestidas com ouro (Emitech Q150T, Lewes, Reino Unido) para posterior análise em MEV a 20 kW (figura 13).

Figura 13 - Desenho esquemático do ensaio Microscopia eletrônica de varredura (MEV).



Fonte: Próprio autor, 2021.

4.10 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata com os respectivos resultados categorizados em Microsoft Excel (Versão 2012 para Windows) e analisados no software GraphPad Prism (Versão 5.0 para Windows, San Diego California USA). As diferenças significativas entre os grupos foram verificadas através da aplicação do teste One-way ANOVA pós-teste de Bonferroni com nível de significância $p < 0,01$.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da atividade antifúngica – CIM e CFM

Para o presente estudo foi realizado a determinação a CIM e CFM de três fármacos antifúngicos, AmB, CETO, FLC, e do PAM, K-au. Os resultados evidenciaram a ação de todas as substâncias, com ênfase para K-au e AmB que obtiveram melhores resultados, como indicado na tabela 1.

Tabela 1. Atividade antifúngica de fármacos e K-au sobre cepas de *C. albicans*. CIM: Concentração inibitória mínima; CFM: Concentração fungicida mínima; AmB: Anfotericina B; KCZ: Cetoconazol; FCZ: Fluconazol; K-au: K-aureina.

Cepa	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				CFM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	AmB	CETO ₈₀	FLC ₈₀	K-au	AmB	CETO	FLC	K-au
ATCC	0,25	$\leq 0,03$	1,950	62,5	0,50	≥ 16	≥ 125	62,50
0102	0,12	$\leq 0,03$	1,950	62,5	0,50	≥ 16	≥ 125	62,50
0104	0,12	$\leq 0,03$	0,970	62,5	0,50	≥ 16	≥ 125	62,50
0105	0,50	$\leq 0,03$	3,900	62,5	2,00	≥ 16	≥ 125	62,50

Fonte: Próprio autor, 2021.

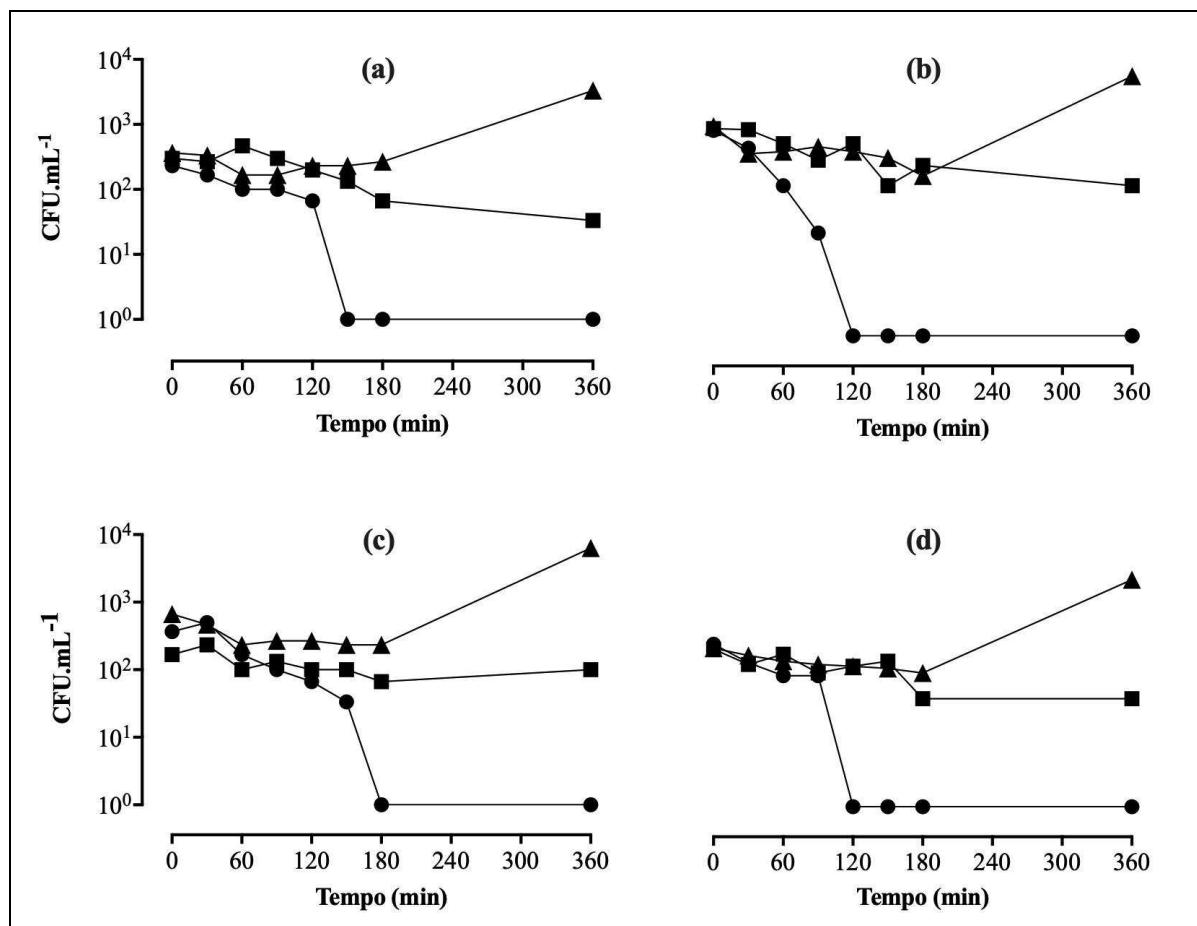
AmB foi eficaz contra todas as cepas testadas, com concentrações variando de 0,12 a 0,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o CIM e de 0,50 a 2,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o CFM. Já os dois representantes dos azóis, FLC e CETO apresentaram apenas atividade fungistática com CIM₈₀, característico desses fármacos, já a CFM não foi encontrada entre as concentrações testadas. No que diz respeito a K-au, este demonstrou eficácia anti-*Candida* para todas as cepas, com CIM e CFM de 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ou seja, a concentração de K-au não variou entre as estirpes. Nota-se ainda, que nenhuma das cepas padrão ou isolados exibiram perfil de resistência segundo CLSI.

5.2 Cinética de morte frente aos antimicrobianos

A partir do ensaio da atividade antifúngica, AmB foi escolhida juntamente com o K-au para a determinação da cinética de morte das cepas testadas por meio do ensaio da curva do tempo de morte (Figura 14), utilizando as concentrações fungicidas de cada antimicrobiano.

Figura 14 - Curva do tempo de morte das cepas *C. albicans* ATCC 90028 (a), 0102 (b), 0104

(c) e 0105 (d) tratadas com peptídeo antimicrobiano K-au (●) e anfotericina B (■), além do grupo controle (▲), sem tratamento. Foi considerada a concentração fungicida para cada agente antimicrobiano, $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para K-au, e $0,5$ a $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para AmB.



Fonte: Próprio autor, 2021

É possível observar que K-au teve seu efeito fungicida estabelecido entre 120 e 180 minutos de contato na concentração de $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para todas as cepas de *C. albicans* incluindo a padrão. Em contraste, AmB na concentração de $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não foi observada essa ação microbicida, mesmo após 6 horas de intervalo, para nenhuma das cepas testadas.

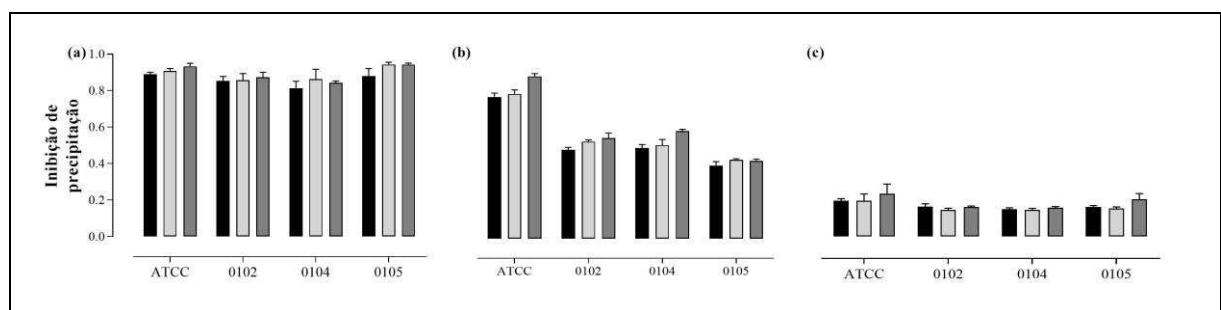
5.3 Inibição dos fatores de virulência

5.3.1 Inibição da secreção de enzimas hidrolíticas

Foram realizados ensaios com concentrações subinibitórias ($1/4\text{CIM}$) para avaliação da inibição dos principais fatores de virulência de *C. albicans* relacionado a invasão do tecido

do hospedeiro. A inibição da formação de enzimas hidrolíticas (fosfolipase, proteinase e hemolisina) foi avaliada com concentração de $15,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para K-au e diferentes concentrações para AmB ($0,125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para cepa ATCC, $0,062 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para 0102 e 0104 e $0,250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para 0105).

Figura 15 - Ação de K-au e AmB na inibição das enzimas fosfolipase (a), proteinase (b) e hemolisina (c) para as cepas de *C. albicans*. Foi considerado a concentração sub-inibitória (1/4CIM) para cada agente antimicrobiano, $15,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para K-au (■), e 0,06 a $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AmB (■). Para o grupo controle (■) foi utilizado apenas meio de cultura.



Fonte: Próprio autor, 2021.

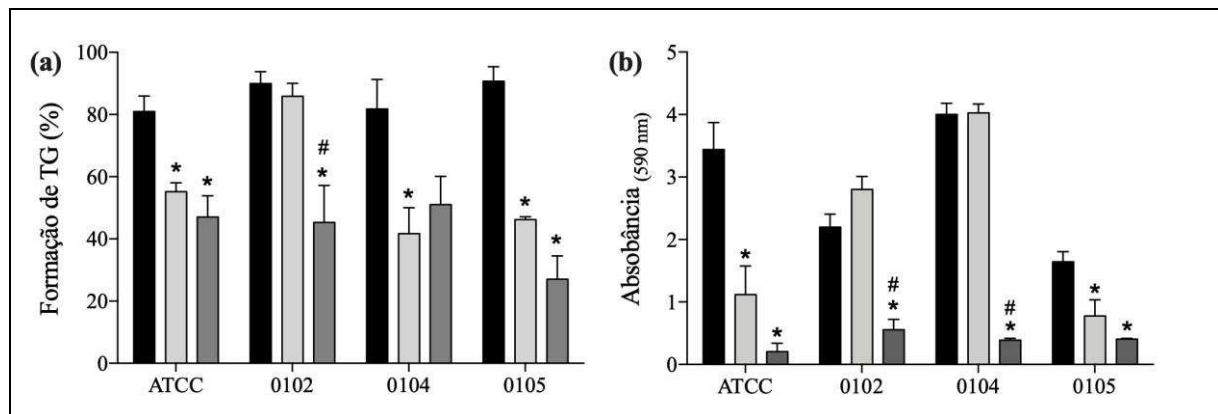
Nos gráficos é possível observar que não houve redução significativa da secreção das enzimas para nenhum dos testes realizados, com as zonas de precipitação se igualando ao controle. Isso demonstra que o PAM K-au não interfere nesse fator de virulência, podendo sua atividade estar atrelada a outro mecanismo.

5.3.2 Inibição da formação de tubo germinativo e biofilme

A inibição da formação de tubo germinativo e formação de biofilme foram também avaliados para os diferentes antimicrobianos. Na figura 16a é possível observar a inibição da formação do tubo germinativo das quatro cepas testadas utilizando AmB e K-au, com a inibição variando entre 50 %, para a cepa 0104, a 70 %, para a cepa 0105. Em relação a figura 16b pode-se perceber o efeito inibitório da formação do biofilme, demonstrando grande redução da biomassa de biofilme formada na presença de K-au, sendo inclusive mais efetiva que AmB para as cepas 0102 e 0104.

Figura 16 - Inibição da formação de tubo germinativo (a) e formação de biofilme (b) para cepas de *C. albicans*. Foi considerado a concentração sub-inibitória (1/4CIM) para cada

agente antimicrobiano, $15,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para K-au (■), e $0,06$ a $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AmB (▨). Para o grupo controle (●) foi utilizado apenas meio de cultura.

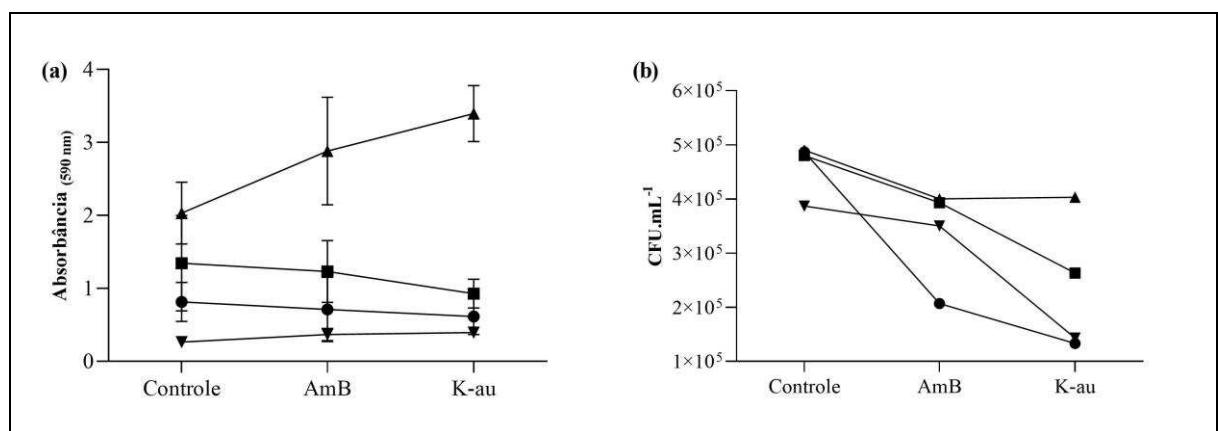


Fonte: Próprio autor, 2021

5.4 Atividade antibiofilme (Biomassa e viabilidade celular)

Com intuito de avaliar ação de K-au contra o biofilme pré-formado (24h) de *Candida* sp. foi realizado a quantificação da biomassa e das células viáveis do biofilme residual após tratamento com os agentes antimicrobianos por três horas.

Figura 17 – Quantificação do biofilme pré-formado quanto a biomassa (a) e contagem de unidades formadoras de colônias (b) das cepas de *C. albicans* ATCC 90028 (●), 0102 (■), 0104 (▲), 0105 (▼) após a exposição ao peptídeo antimicrobiano K-au e anfotericina B. Foi utilizada a concentração fungicida de cada um dos agentes antimicrobianos, $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para K-au, e $0,12$ a $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para AmB.



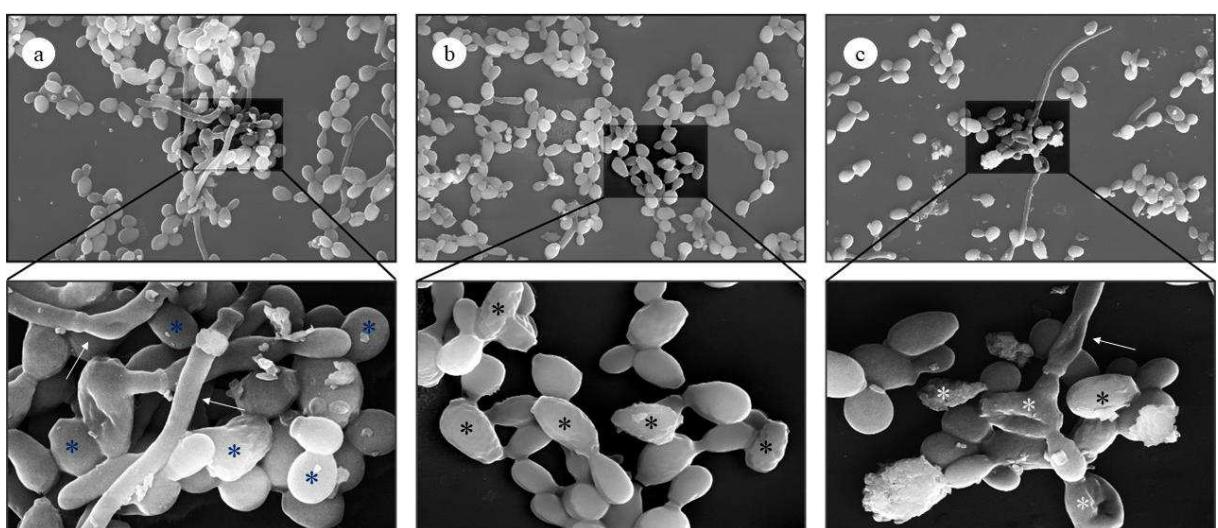
Fonte: Próprio autor, 2021.

A biomassa do biofilme se manteve inalterada em ambos os tratamentos, apresentado o mesmo patamar do grupo controle (Figura 17a), enquanto a contagem de células simula uma tendência de redução da viabilidade celular após os tratamentos (Figura 17b), embora sem diferença estatística. Essa ação sutil de K-au frente ao biofilme pré-formado pode estar associado a concentração fungicida utilizada, tendo em vista a resistência intrínseca dessa forma de crescimento microbiana são necessárias concentrações mais elevadas para efeitos mais satisfatórios.

5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com intuito de visualizar o efeito da CFM de AmB e K-au sobre as células do biofilme pré-formado de *Candida* sp. após exposição de 3 horas foram analisadas imagens de MEV. Na figura 18a pode-se observar que as células têm uma ampla distribuição sobre a superfície analisada, com formação de agregados (clusters), e apresentando ampla quantidade de hifas filamentosas (seta branca), além de células integrais e turgidas (*), mantendo a integridade da superfície das células.

Figura 18 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biofilme pré-formado de *C. albicans* 0105 sem tratamento (a) e tratada (3h) com K-au (b) e AmB (c) em concentrações fungicidas. Setas representam as hifas, asteriscos brancos representam células saudáveis e asteriscos pretos células mortas ou enrugadas.



Fonte: Próprio autor, 2021.

O biofilme tratado com K-au (figura 18b) apresentou uma tendência a desagregação

celular, o que pode estar relacionado a ausência de hifas, além disso percebe-se um claro enrugamento da superfície das células (*). Quando tratado com AmB (Figura 18c) as células se mostram individualizadas, sem aparente agregação e em menor densidade, mas com a formação, mesmo que escassa, de hifas filamentosas (seta). Além disso, é possível perceber a existência de células enrugadas (*) e mortas (*).

6 DISCUSSÃO

A incidência e a prevalência de infecções por *C. albicans* tem crescido a cada ano, fazendo necessário a busca por novos fármacos antifúngicos com maior atividade, baixa propensão no desenvolvimento de resistência e menores efeitos colaterais. Nessa perspectiva, os PAMs da classe das aureinas têm se mostrado excelentes candidatos, com ação comprovada contra uma ampla gama de micro-organismos, com mecanismo voltado primariamente para a perturbação da membrana celular, que pode ocasionar lise e, consequentemente, a morte do patógeno.

No presente estudo foi verificado a ação do PAM K-aureina frente a *C. albicans* ATCC 90028 e três isolados clínicos (0102, 0104 e 0105). Inicialmente, foi demonstrado o perfil de susceptibilidade das cepas frente a três antifúngicos (AmB, CETO e FLC) e o PAM K-au. Os resultados evidenciaram a ação de todas as substâncias, com ênfase em K-au e AmB que obtiveram melhor efeito fungicida comparado aos representantes azólicos. Estudos recentes realizados por Silva et al. (2020), também evidenciaram a ação de AmB, apresentando CIM similares aos apresentados na tabela 1.

No que concerne o potencial antifúngico de K-au, este demonstrou eficácia para todas as cepas testadas com CIM e CFM na concentração de $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Madanchi et al. (2019) observaram resultados similares quando testaram um análogo de aureina 1.2 (peptídeo nativo), o AurH1 (substituição do ácido aspártico por lisina e adição de um triptofano no N-terminal). O análogo demonstrou eficácia fungistática na concentração de $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto o PAM nativo obteve o mesmo efeito apenas na concentração de $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$, isto sugere que as modificações na estrutura primária do PAM pode potencializar sua ação antifúngica.

Nos dados apresentados na curva do tempo de morte, K-au teve efeito microbicida estabelecido em um período de tempo curto, diferente de AmB, que mesmo após o intervalo de 6 h este efeito não foi observado. Resultados similares foram obtidos em estudos com AmB, na qual foi atestada a incapacidade de erradicação do antifúngico em CFMs em um período de 24 h (SILVA et al., 2020). Ainda, Bezerra (2015) realizou pesquisas demonstrando que a eficácia de AmB é obtida apenas com 2 x CIM para um período de 6 horas. Portanto é característico desse fármaco a necessidade de maiores concentrações e tempo de ação para erradicação de cepas do gênero *Candida* (LEMOS et al., 2009; ALDER-MOORE et al., 2019).

Em contrapartida, K-au exibiu efeito fungicida em um tempo máximo de 180 minutos

para as cepas testadas, apresentando intervalo de morte similar a outros PAMs. Madanchi et al. (2019) mostraram a cinética de morte do PAM AurH1, análogo de aurein 1.2, este apresentou capacidade fungicida com 4 horas de contato, em concentração 2 x maior que a CIM. Para o PAM nativo, mesmo com concentrações 2 x CIM só houve inibição da cepa em um período de 24 h. Em outro estudo, com o PAM Histatina, foi avaliado a sua eficácia apresentando redução significativa da viabilidade fúngica de *Candida* em um período de 60 minutos (SANTOS et al., 2016). E ainda, em estudos anteriores com K-au realizados por Da Silva (2017) revelou o sinergismo desse PAM com Ciprofloxacina (CIP) contra *Pseudomonas aeruginosa*, obtendo ação bactericida com 120 minutos.

Apesar do mecanismo de ação de K-au não estar esclarecido, sabe-se que o peptídeo nativo em contato com a membrana, de preferência aniônica, através de forças eletrostáticas, atua por meio da formação de poros através do modelo de carpete (FERNANDEZ et al., 2013; RAI, QUIAN 2017). Ademais, alguns resíduos de aminoácidos, Phe3, Lys7 e Lys8, são críticos para atividade lítica de aurein 1.2, atuando principalmente em interações eletrostáticas e na absorção de moléculas de água pela membrana dos micro-organismos, causando posteriormente a lise celular (SAJJADIYAN et al., 2017). Assim, a adição de lisina no N-terminal e consequentemente o aumento da carga líquida positiva do PAM pode estar relacionada a melhor ação de K-au frente as células de *C. albicans* (MANZO et al., 2019). E diretamente relacionado a redução do tempo da cinética de morte destas leveduras.

Nessa perspectiva, uma das características marcantes de *C. albicans* é a expressão de fatores de virulência que auxiliam durante todo o progresso da infecção. Desse modo, buscouse verificar a capacidade de K-au na inibição de enzimas hidrolíticas (fosfolipases, proteinases e hemolisinas), formação de tubo germinativo e biofilme utilizando concentrações subinibitórias. Quanto a primeira análise, foi verificado que nenhum dos tratamentos (K-au e AmB) interferem na secreção das enzimas. No entanto, o PAM K-au exibiu considerável redução na formação de tubo germinativo, variando de 50 a 70 % para as cepas testadas, sugerindo que a biomolécula atua na inibição do polimorfismo. Esta característica também é observada para outros PAMs, como EntV⁶⁸ e Histatina5, com a redução da expressão de genes relacionados a morfogênese hifal (GRAHAN et al., 2017; CURVELO et al., 2019).

Nessa linha, a formação de biofilmes é suportada por inúmeros mecanismos, desde a adesão inicial com a expressão de adesinas, até a formação de hifas e matriz exopolissacarídica. A interferência em alguns desses fatores pode inviabilizar o desenvolvimento do biofilme, e consequentemente, interferir no processo infeccioso. Assim, os dados demonstram que o PAM K-au foi capaz de reduzir a biomassa do biofilme com

concentrações subinibitórias para todas as cepas testadas. O que pode estar diretamente relacionado na redução do percentual de formação do tubo germinativo, tendo em vista que estes precedem as hifas, responsáveis pela estruturação das células dentro do biofilme (SHARECK; BELHUMEUR 2011). Tais características apresentadas por K-au sugerem efeito antivirulência sobre *C. albicans*, com mecanismo voltado para inibição da filamentação e formação de biofilme, desarmando o patógeno de seus dois fatores de virulência mais importantes durante a infecção (MAYER; WILSON; HUBE 2013; TUMBARELLO, 2007).

Além disso, alguns estudos demonstram que os tratamentos que visam a virulência podem ser menos propensos no desenvolvimento de resistência. Isso foi demonstrado por Pierce et al. (2015) na avaliação da atividade do composto 61894700 que exibe características relacionadas a inibição do biofilme e filamentação, que mesmo após exposições repetidas não foi induzida a resistência.

A partir dessa análise, foi avaliada a ação das concentrações fungicidas dos tratamentos (K-au e AmB) sobre a biomassa e viabilidade celular residual do biofilme pré-formado. É observado que não houve interferência na biomassa do biofilme de nenhuma das cepas, no entanto há uma tendência na redução da viabilidade celular quando o biofilme foi tratado com K-au. Esses dados são confirmados com a MEV, na qual o tratamento com K-au apresentou células que sofreram lise e mudanças na superfície, além da ausência de hifas, confirmando a sua interferência nesse mecanismo de *C. albicans* mesmo com o biofilme já estabelecido. Isso indica que o PAM K-au pode atuar no início da infecção ou mesmo desestabilizar biofilmes pré-formados nos sítios do hospedeiro.

Estudos similares, demonstraram a capacidade de PAMs na inibição e erradicação de biofilmes. O Ctn[15-34] fragmento da crotalicidina por exemplo, é um PAM capaz de reduzir a viabilidade de células de biofilmes pré-formados interagindo com a membrana dos patógenos (AGUIAR, 2020). Ainda, Paulone et al. (2017) demonstraram a capacidade do killer peptide (KP) de inibir e erradicar biofilmes pré-formados de *C. albicans* através do estresse oxidativo e permeabilidade da membrana fosfolipídica. Em um contexto mais geral, Dias et al. (2020) demonstraram que o PAM ToAP2 é eficaz na redução da formação de tubo germinativo, filamentação, inibição e erradicação de biofilmes de *C. albicans* através da permeabilização da membrana.

Assim, é sabido que os PAMs podem interferir em diversas fases do processo infeccioso, agindo na prevenção e no tratamento. O atual estudo demonstrou que K-au pode atuar durante o progresso da infecção através da inibição de alguns fatores virulentos, tais como polimorfismo e formação de biofilme. Tais características podem estar intimamente

interligadas, tendo em vista que a morfogênese hifal afeta diretamente a formação de biofilmes (KADRY; EL-GANINY; EL-BAZ 2018). Por fim, o efeito sutil sobre o biofilme pré-formado, tanto biomassa quanto células viáveis remanescentes, pode estar relacionado a concentração utilizada (CFM) dos agentes testados, visto que para erradicação desses agregados microbianos valores acima da CIM são fortemente recomendados.

Desse modo, K-au demonstra ser uma alternativa eficaz no desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos contra *C. albicans*, tendo em vista que a sua ação antivirulência expande o repertório de potenciais alvos nesses patógenos, além dessa característica contribuir para a baixa propensão no surgimento de resistência, exercendo baixos níveis de pressão seletiva (CLATWORTHY et al., 2007).

7 CONCLUSÃO

Esse estudo demonstrou o potencial antifúngico do PAM K-aureina frente a isolados clínicos de *C. albicans*. K-au apesar de não apresentar efeito direto sobre a secreção de enzimas hidrolíticas, foi capaz de reduzir o percentual de formação de tubo germinativo, interferindo de maneira direta no polimorfismo fúngico. Isso pode estar diretamente relacionada a capacidade de inibição da formação do biofilme, processo indispensável para o estabelecimento da infecção. Nesse sentido, os ensaios com o biofilme pré-formado evidenciaram uma tendência a redução da viabilidade celular quando tratados com K-au, comprovadas com as análises de MEV que apresentaram células lisadas e ausência de hifas, caracterizando a desestruturação do biofilme.

Os dados demonstram que K-au possui mecanismo antivirulência, com capacidade de atuar no início da infecção ou mesmo após o estabelecimento do patógeno no sítio do hospedeiro, através da interferência na morfogênese hifal. Portanto, K-au pode se tornar uma alternativa eficaz contra *C. albicans*, tendo em vista seu mecanismo de ação que configura baixa propensão no desenvolvimento de resistência e sua capacidade de interferir em diferentes estágios da infecção. Novos estudos são necessários visando elucidar seu mecanismo de ação a nível molecular, a fim de demonstrar de forma mais precisa o potencial fungicida e o perfil antivirulento dessa biomolécula.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, F. L. L. et al. Antibiofilm Activity on *Candida albicans* and Mechanism of Action on Biomembrane Models of the Antimicrobial Peptide Ctn[15–34]. **International Journal of Molecular Sciences**. Fortaleza, v. 21, n. 21, 8339. nov. 2020.
- ALDER-MOORE, J. et al. Preclinical Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Antifungal Activity of Liposomal Amphotericin B. **Clinical Infectious Diseases**, Pomona, v. 68, n. 4, p. s244-s259, 2019.
- ALIM, D.; SIRCAIK, S.; PANWAR, S. L. The Significance of Lipids to Biofilm Formation in *Candida albicans*: An Emerging Perspective. **Journal of Fungi**, New Delhi, v. 4, n. 14º, p. 1-18, dec. 2018.
- ARENDRUP, M. C. *Candida* and *Candidaemia*. **Doctor of Medical Science**, Copenhagen, v. 60, n. 11, sep. 2013.
- BAHAR, A A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. **Pharmaceuticals**, Syracuse, v. 6, p. 1543-1575, nov. 2013.
- BAIN, J. M. et al. Non-lytic expulsion/exocytosis of *Candida albicans* from macrophages. **Fungal Genetics and Biology**, Aberdeen, v. 49, p. 677-678, feb. 2012.
- BARBEDO, L. S.; SAGARBI D. B. G. Candidiasis. **DST - J bras Doenças Sex Transm**, Niterói, v. 22, n. 1, p. 22-38, apr. 2010.
- BEM-AMI, R. Treatment of Invasive Candidiasis: A Narrative Review. **Journal of Fungi**, Tel Aviv, v. 4, n. 97, p. 1-18, ago. 2018.
- BEZERRA, A. P. B. **Avaliação da atividade antifúngica de fitoconstituintes contra *Candida albicans***. 2015. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.
- BOZELLI JR, J. C. et al. Effect of Head Group and Curvature on Binding of the Antimicrobial Peptide Tritrpticin to Lipid Membranes. **Chem Phys Lipids**, São Paulo, v. 165, n. 4, p. 365-373, may. 2011.
- BRAUNSDORF, C.; LEIBUNDGUT-LANDMANN. Modulation of the fungal-host interaction by the intra-species diversity of *C. albicans*. **Pathogens**, Winterthurerstrasse, v. 7, n. 11, p. 1-12, jan. 2018.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. **Nat Rev Microbiol**, Iowa, v. 3, n. 3, p. 238-250, feb. 2005.
- BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Sci Transl Med**, Worcester, v. 19, n. 4, p. 165, dec. 2012.
- CARDOSO, M. H. et al. Computer-Aided Design of Antimicrobial Peptides: Are We Generating Effective Drug Candidates? **Front. Microbiol**. Campo Grande, v. 10, n. 3097, p. 1-15, jan. 2020.

CASTILLO, G. V.; AZCURRA, A. I.; SOTOMAYOR, C. E. *Candida* lipases: a review on biochemical, molecular and pathogenic aspects. **Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba**, Córdoba, v. 76, n. 2, p. 107-112, apr. 2019.

CASTILLO, G. V. et al. Study of virulence factor of *Candida* species in oral lesions and its association with potentially malignant and malignant lesions. **Archives of Oral Biology**, Córdoba, v. 91, p. 35-41, feb. 2018.

CHERAGHI, N.; HOSSEINI, M.; MOHAMMADINEJAD, S. Pore formation and the key factors in antibacterial activity of aurein 1.2 and LLAA inside lipid bilayers, a molecular dynamics study. **BBA- Biomembranes**, Zanjan, v. 1860, p. 347-356, 2018.

CLATWORTHY, A. E.; PIERSON, E.; HUNG, D. T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. **Nat Chem Biol.** Massachusetts, v. 3, n. 9, p. 541-548, 2007.

CLEVELAND, A. A. et al. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance. **Plos One**, India, v.10, n. 3, mar. 2015.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of yeasts, Twenty-Fifth Informational Supplement. Document M60. Wayne, PA: CLSI, 2017.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard – Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA. 2008.

COOGAN, M. M. et al. *Candida* and mycotic infections. **Adv Dent Res.**, Johannesburg, v. 19, n 1, p. 130-138, apr. 2006.

CORREIA, A. et al. Limited Role of Secreted Aspartyl Proteinases Sap1 to Sap6 in *Candida albicans* Virulence and Host Immune Response in Murine Hematogenously Disseminated Candidiasis. **Infection and Immunity**, Porto, v. 78, n. 11, p. 4839-4849, nov. 2010.

CUÉLLAR-CRUZ, M. et al. *Candida* species: new insights into biofilm formation. **Future Microbiol.**, Jalisco, v. 7, n. 6, p. 755-771, jun. 2012.

CUI, J. et al. Synergistic combinations of antifungals and antivirulence agents to fight against *Candida albicans*. **Virulence**, Beijing, v. 6, n. 4, p. 362-371, mai/jun. 2015.

DA SILVA, R. L. **Utilização do peptídeo sintético aureína K (K-au) como adjuvante na atividade antimicrobiana de ciprofloxacina contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.** 2017. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2017.

DA SILVA DANTAS, A. et al. Cell biology of *Candida albicans*-host infections. **Current Opinion in Microbiology**, Aberdeen, v. 34, p. 111-118, sep. 2016.

DADAR, M. et al. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and

advances in diagnosis and control – **An update.** *Microbial Pathogenesis*, Karaj, v. 117, p. 128-138, fev. 2018.

DE LIMA, L. A. **Prospecção e purificação de peptídeos com atividade antimicrobiana a partir de corais da costa brasileira.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2012.

DESAI, J. V.; MITCHELL, A. P. *Candida albicans* Biofilm Development and its genetic control. **Microbiology Spectrum**, Pittsburgh, v. 3, n. 3, p. 1-12, jun. 2015.

DESLOUCHES, S.; DI P. Y. Antimicrobial Peptides: A Potential Therapeutic Option for Surgical Site Infections. **Clin Surg**, Pittsburgh, p. 1-8, ago. 2018.

DIAS, J. N. et al. Mechanisms of action of antimicrobial peptides ToAP2 and NDBP-5.7 against *Candida albicans* planktonic and biofilm cells. **Sci Rep.** Brasília, v. 10, n. 1, 10327, jun. 2020.

DURGESH, K.; QIAN, S. Interaction of the Antimicrobial Peptide Aurein 1.2 and Charged Lipid Bilayer. **Scientific Reports**, Oak Ridge, v. 7, p. 3719, jun. 2017.

FERNANDES, K. E.; WEEKS, K.; CARTER, D. A. Lactoferrin is broadly active against yeasts and highly synergistic with amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Sydney, p. 1-55, feb. 2020.

FERNANDEZ, D. I. et al. Membrane defects enhance the interaction of antimicrobial peptides, aurein 1.2 versus caerin 1.1. **Biochimica et Biophysica Acta**, London, v. 1828, n. 8, p. 1863-1872, mar. 2013.

FOX, E. P. et al. An expanded regulatory network temporally controls *Candida albicans* biofilm formation. **Molecular Microbiology**, San Francisco, v. 96, n. 6, p. 1226-1239, apr. 2015.

FREIRE, J. C. P. et al. Herbal of antifungal activity on oral candidose: a literature review. **Salus vita**, Bauru, v. 35, p. 537-546, dez. 2016.

FUENTE-NUÑES, C.; HANCOCK, R. E. W. Using anti-biofilm peptides to treat antibiotic-resistant bacterial infections. **Postdoc J.** Vancouver, v. 3, n. 2, p. 1-8, fev. 2015.

GALOCHA, M. et al. Divergent approaches to virulence in *C. albicans* and *C. glabrata*: Two sides of the same coin. **International Journal of Molecular Sciences**. Lisboa, v. 20, n. 2345, p. 1-25, may. 2019.

GRANGER, B. L. Insight into the Antiadhesive Effect of Yeast Wall Protein 1 of *Candida albicans*. **Journals ASMorg**, Montana, v. 11, n. 6, p. 795-805, jun. 2012.

GUILHELMELLI, F. et al. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers in Microbiology**, Brasília, v. 4, dec. 2013.

HACIOGLU, M. et al. *In vitro* activities of antifungals alone and in combination with

tigecycline against *Candida albicans* biofilms. **PeerJ**, Istanbul, p. 2-17, jul. 2018.

HANEY, E. F.; MANSOUR, S. C.; HANCOCK, R. E. W. Antimicrobial Peptides: An Introduction. **Methods Mol Biol**. Vancouver, v. 1548, p. 3-22, jan. 2017.

HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal of microbiology**, Jena, v. 54, n. 3, p. 149-169, nov. 2015.

HORNE, W. S. et al. Antiviral Cyclic D,L- α -Peptides: Targeting a General Biochemical Pathway in Virus Infections. **Bioorg Med Chem**, La Jolla, v. 1, n. 13, p. 5145-5153, sep. 2005.

JABRA-RIZK, M. A. et al. *Candida albicans* pathogenesis: fitting within the host-microbe damage response framework. **Infection and Immunity**, Louisiana, v. 84, n. 10, p. 2724-2739, oct. 2016.

JAVIA, A. et al. Antimicrobial peptide delivery: an emerging therapeutic for the treatment of burn and wounds. **Therapeutic Delivery**, Gujarat, v. 9, n. 5, p. 375-386, apr. 2018.

JENSSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Vancouver, v. 19, n. 3, p. 491-511, jul. 2006.

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

KADRY, A. A.; EL-GANINY, A. M.; EL-BAZ, A. M. Relationship between Sap prevalence and biofilm formation among resistant clinical isolates of *Candida albicans*. **Afr Health Sci**. Zagazig, v. 18, n. 4, p. 1166-1174, dec. 2018.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M. KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonica**, Kraków, v. 56, n. 2, p. 211-224, jun. 2009.

KAUR, H. et al. Prolonged Outbreak of *Candida krusei* Candidemia in Paediatric Ward of Tertiary Care Hospital. **Mycopathologia**, Chandigarh, v. 185, n. 2, p. 257-268, apr. 2020.

KHAN, M. S. et al. Virulence and biofilms as promising targets in developing antipathogenic drugs against candidiasis. **Future Science**. Dammam, v. 6, n. 2, feb. 2020.

KUHN, D. M.; GHANNOUM, M. A. *Candida* biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 5, n 2, p. 186-197, feb. 2004.

LAADHARI, M. A. A. et al. Interaction of the antimicrobial peptides caerin 1.1 and aurein 1.2 with intact bacteria by ²H solid-state NMR. **Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr**, Montréal, v. 12, p. 2959-2964, dec. 2016.

LANIADO-LABORIN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Rev Iberoam Micol**. v. 26, n. 4, p. 223-227, 2009.

- LEE, M. et al. Incorporation of β -amino acids enhances the antifungal activity and selectivity of the helical antimicrobial peptide aurein 1.2. **ACS Chem Biol.** Madison, v. 12, n. 12, p. 2957-2980, dec. 2018.
- LEMOS, J. A. et al. Susceptibility testing of *Candida albicans* isolated from oropharyngeal mucosa of hiv+ patients to fluconazole, amphotericin b and caspofungin. Killing kinetics of caspofungin and amphotericin b against fluconazole Resistant and susceptible isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, Goiânia, v. 40, p. 163-169, feb 2009.
- LIU, Y. et al. Effect of the antimicrobial decapeptide KSL on the growth of oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Sichuan, v. 37, n. 1, p. 33-38, jan. 2011.
- LOOSE, C. et al. A linguistic model for the rational design of antimicrobial peptides. **Nature**, v. 443, p. 867–869. 2006.
- LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER R. Biofilms. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, Boston, v. 2, p. 1-11, 2010.
- LORENZÓN, E. N. et al. Dimerization of aurein 1.2: effects in structure, antimicrobial activity and aggregation of *Candida albicans* cells. **Amino Acids**, Araraquara, v. 44, p. 1521-1528, mar. 2013.
- MAGDALENA, M. H.; PERRONE, M. Factores determinantes de patogenicidad en relación a la ecología de *Candida albicans* en cavidad bucal. **Acta Odontol**, Caracas, v. 39, n. 2, oct. 2001.
- MADANCHI, H. et al. AurH1: a new heptapeptide derived from Aurein1.2 antimicrobial peptide with specific and exclusive fungicidal activity. **Journal of Peptide Science**, Semnan, v. 25, n. 3175, p. 1-9, feb. 2019.
- MANZO, G. et al. Temporin L and aurein 2.5 have identical conformations but subtly distinct membrane and antibacterial activities. **Scientific Reports**, v. 9, n. 10934, p. 1-13, jul. 2019.
- MAVOR, A. L.; THEWES, S.; HUBE, B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. **Current Drug Targets**, Berlin, v. 6, n. 8, p. 863-874, 2005.
- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, Jena, v. 4, n. 2, p. 119-128, feb. 2013.
- MEDICI, N. P.; POETA, M. D. New insights on the development of fungal vaccines: from immunity to recent challenges. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 8, p. 966-973, dec. 2015.
- MIGÓN, D. et al. Alanine Scanning Studies of the Antimicrobial Peptide Aurein 1.2. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, Gdańsk, dec. 2018.
- MIKAMO, H. et al. High glucose-gated overexpression of ICAM-1 in human vaginal

epithelial cells increases adhesion of *Candida albicans*. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Shiki, v.38, n. 2, p. 226-230, sep. 2017.

MITCHELL, K. F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D. R. The extracellular matrix of fungal biofilms. **Adv Exp Med Biol**, Madison, p. 21-35, 2016.

MORSE, D. J. et al. Denture-associated biofilm infection in three-dimensional oral mucosal tissue models. **Journal of Medical Microbiology**, Cardiff, v. 67, p. 364-375, jan. 2018.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Berlin, v. 67, n. 9, p. 400-428, sep. 2003.

NETT, J. E. et al. Development and Validation of an In Vivo *Candida albicans* Biofilm Denture Model. **Infection and Immunity**, Madison, v. 78, n. 9, p. 3650-3659, sep. 2010.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, Alberta, v. 29, n. 9, p. 464-472, sep. 2011.

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

NOBILE, C. J.; MITCELL, A. P. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. **Cellular Microbiology**, Columbia, v. 8, n. 9, p. 1382-1391, jul. 2006.

NOBLE, S. M.; GIOANETTI, B. A.; WITCHLEY, J. N. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. **Nature Reviews Microbiology**, San Francisco, v. 15, p. 97-107, feb. 2017.

ODDS, F. C. et al. *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, London, v. 26, p. 277-283, aug. 1988.

OLIVER, J. C. et al. *Candida* spp. and phagocytosis: multiples evasion mechanisms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Alfenas, may. 2019.

OLIVEIRA, V. M. C. et al. Lactobacillus is able to alter the virulence and the sensitivity profile of *Candida albicans*. **Journal of Applied Microbiology**, São Paulo, v. 121, p. 1737-1744, aug. 2016.

OMBRELLA, A. M.; RAMOS, L.; RAMOS, L. Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. **Rev. Iberoam. Micol.**, Barcelona, v. 25, p. 12-16, 2008.

PAULONE, S. et al. The synthetic killer peptide KP impairs *Candida albicans* biofilm in vitro. **PLoS One**. Modena, v. 12, n. 7, e0181278. jul. 2017.

PAPPAS, G. P. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews**, Birmingham, v. 4, p. 1-20, mai. 2018.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis; 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, Birmingham, v. 62, feb. 2016.

PARAJE, M. G. et al. *Candida albicans*-secreted lipase induces injury and steatosis in immune and parenchymal cells. **Canadian Journal of Microbiology**, Córdoba, v. 54, n. 8, p. 647-649, may. 2008.

PARK, M.; DO, E.; JUNG, W. E. Lipolytic Enzymes Involved in the Virulence of Human Pathogenic Fungi. **Microbiology**, Anseong, v. 41, n. 2, p. 67-72, jun. 2013.

PETERS, B. M. et al. Fungal morphogenetic pathways are required for the hallmark inflammatory response during *Candida albicans* vaginitis. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 2, p. 532-543, feb. 2014.

PIERCE, C. G. et al. A novel small molecule inhibitor of *Candida albicans* biofilm formation, filamentation and virulence with low potential for the development of resistance. **NPJ Biofilms Microbiomes**. San Antonio, v. 1, 15012, 2015.

PIERCE, C. G. et al. Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. **Curr Opin Pharmacol**, San Antonio, v. 13, n. 5, p. 726-730, oct. 2013.

PIERCE, C. G. et al. The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. **Journal of Fungi**, San Antonio, v. 3, n. 14, p. 1-8, mar. 2017.

PORTO, W. F. et al. Joker: an algorithm to insert patterns into sequences for designing antimicrobial peptides antimicrobial peptides. **Biochim. Biophys. Acta Gen. Subjects**, v. 1862, p. 2043–2052, 2018.

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. *Candida* Survival Strategies. **Advances in Applied Microbiology**, Jena, v. 91, p. 1-61, 2015.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Med Mycol**. Houston, v. 20, p. 7-14, jul. 1981.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, Cleveland, v. 25, p. 792-798, apr. 2019.

POULAIN, D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. **Critical reviews in Microbiology**, Lille, p. 1-10, aug. 2013.

QUINDÓS, G. et al. The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*. **International Microbiology**, Bilbao, jun. 2018.

RAI, D. K.; QUIAN, S. Interaction of the Antimicrobial Peptide Aurein 1.2 and Charged Lipid Bilayer. **Scientific Reports**, Oak Ridge, v. 7, n. 3719, p. 1-10, jun. 2017.

RAJENDRAN, R. et al. Integrating *Candida albicans* metabolism with biofilm heterogeneity

by transcriptome mapping. **Scientific Reports**, Glasgow, v. 6, n. 35436, p. 1-11, oct. 2016.

RAJKOWSKA, K.; KUNICKA-STYCNSKA, A.; PECZEK, M. Hydrophobic properties of *Candida* spp. under the influence of selected essential oils. **ACTA ABP Biochimica Polonica**, Lódz, v. 62, n. 4, p. 663-668, nov. 2015.

RAMEZANZADEH, M. et al. Design and characterization of new antimicrobial peptides derived from aurein 1.2 with enhanced antibacterial activity. **Biochimie**. 2020.

RANGEL-FRAUSTO, M. S. et al. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. **Clinical Infectious Diseases**, Mexico, v. 29, n. 2, p. 253-258, jul. 1999.

RIBEIRO, E. L. **Leveduras de *Candida* isoladas da boca de crianças com Síndrome de Down: aspectos feno-genotípicos, relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas**. 2008. 129 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

RIPPKE, F.; BERARDESCA, E.; WEBER, T. M. pH and Microbial Infections. **Curr Probl Dermatol**, Hamburg, v. 54, p. 87-94, 2018.

RODRIGUES, M. T. et al. Association between vaginal secretion culture, sócio-demographic characteristics and clinical manifestations of patients with vulvovaginal candidiasis. **Rev Bras Ginecol Obstet**, Juiz de Fora, v. 35, n. 12, p. 554-561, dec. 2013.

RODRIGUEZ, Y. J. et al. Development of Amphotericin B Micellar Formulations Based on Copolymers of Poly(ethylene glycol) and Poly(ϵ -caprolactone) Conjugated with Retinol. **Pharmaceutics**, Colombia, v. 12, p. 1-20, feb. 2020.

ROSCETTO, E. et al. Antifungal and anti-biofilm activity of the first cryptic antimicrobial peptide from an archaeal protein against *Candida* spp. clinical isolates. **Scientific Reports**, Naples, v. 8, p. 17570, dec. 2018.

ROSSONI, R. D. et al. Correlation of phospholipase and proteinase production of *Candida* with in vivo pathogenicity in *Galleria mellonella*. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, São José dos Campos, v. 12, n. 3, p. 199-204, jul/sep. 2013.

ROZEK, T. et al. The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*. **European Journal of Biochemistry banner**, South Australia, v. 267, n. 17, p. 5330-5341, sep. 2000.

SCHLOTTFELDT, F. S. et al. Prevenção da nefrotoxicidade da anfotericina B por meio do uso de fitomedicamentos. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**. São Paulo, v. 49, p. 74-79, jul. 2015.

SAFDER, I.; ISLAM, A. Antimicrobial peptides: Therapeutic potential as an alternative to conventional antibiotics. **Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences (JIPBS)**. Ningbo, v. 4, n. 1, p. 25-32. 2017.

SAJJADIYAN, Z. et al. Interaction of aurein 1.2 and its analogue with DPPC lipid bilayer. **J Biol Phys**, Zanjan, v. 43, p. 127-137, jan. 2017.

SAKAGAMI, T. et al. Antifungal susceptibility trend and analysis of resistance mechanism for *Candida* species isolated from bloodstream at a Japanese university hospital. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Aichi, v. 25, n. 1, p. 34-40, jan. 2019.

SALCI, T. P. et al. Targeting *Candida* spp. to develop antifungal agentes. **Drug Discovery Today**, Mato Grosso, v. 00, n. 00, p. 1-13, jan. 2018.

SALGADO, P. S. et al. Structural basis for the broad specificity to host-cell ligands by the pathogenic fungus *Candida albicans*. **PNAS**, Urbana, v. 108, n. 38, p. 15775-15779, sep. 2011.

SANTANA, D. P. et al. New approaches on virulence factors of *Candida albicans*. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, Anápolis, v. 12, n. 2, p. 229-233, may/aug. 2013.

SANTOS, R. et al. The multidrug resistance transporters CgTpo1_1 and CgTpo1_2 play a role in virulence and biofilm formation in the human pathogen *Candida glabrata*. **Cellular Microbiology**, Lisboa, v. 19, n. 12686, p. 1-13, oct. 2016.

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

SCHÖNHERR, F. A. et al. The intraspecies diversity of *C. albicans* triggers qualitatively and temporally distinct host responses that determine the balance between commensalism and pathogenicity. **Mucosal Immunology**, Zürich, v.10, n. 5, p. 1335–1350, feb. 2017.

SHARECK, J.; BELHUMEUR, P. Modulation of morphogenesis in *Candida albicans* by various small molecules. **Eukaryot Cell**, Québec, v. 10, n. 8, p. 1004-1012. 2011.

SHARMA, Y.; CHUMBER, S. K.; KAUR, M. Studying the prevalence, species distribution, and detection of *in vitro* production of phospholipase from *Candida* isolated from cases of invasive candidiasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, New Delhi, v. 9, n. 1, p. 8-11, feb. 2017.

SIEVERT, D. M. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. **Infect Control Hosp Epidemiol**, Atlanta, v. 34, n. 1, p. 1-14, jan. 2013.

SILVA, D. et al. (R)-(+)- β -Citronellol and (S)-(-)- β -Citronellol in Combination with Amphotericin B against *Candida* Spp. **International Journal of Molecular Sciences**, João Pessoa, v. 21, n. 1785, p. 1-14, mar. 2020.

SILVEIRA, P. V. et al. Twice-daily red and blue light treatment for *Candida albicans* biofilm matrix development control. **Lasers in Medical Science**, London, aug. 2018.

SOONTORNGUN, N.; SOMBOON, P.; WATCHAPUTI, K. Frontier in Antifungal

Treatments Against Major Human Fungal Opportunistic Pathogen *Candida Species* and Medically Important Fungi. Non-Conventional Yeasts: From Basic Research to Application. **Frontiers**, Bangkok, p. 453–476, 2019.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida Infections*, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **BioMed Research International**, Rosario, p. 1-13, jun. 2013.

SRIVASTAVA, V.; SINGLA, R. K.; DUBEY, A. K. Emerging Virulence, Drug Resistance and Future Anti-Fungal Drugs for *Candida* Pathogens. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, New Delhi v. 18, p. 1-20, mai. 2018.

SU, C.; YU, J.; LU, Y. Hyphal development in *Candida albicans* from different cell states. **Current Genetics**. Wuhan, may. 2018.

SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature reviews Microbiology**. Sheffield, v. 9, p. 737-747, oct. 2011.

SUZUKI, L. C. **Desenvolvimento de biofilme formado por Candida albicans in vitro para estudo da terapia fotodinâmica**. 2009. 48f. Tese (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Matérias) - Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SWITHENBANK, L.; MORGAN, C. The Role of Antimicrobial Peptides in Lung Cancer Therapy. **Journal of Antimicrobial Agents**, Swansea, v. 3, n. 1, feb. 2017.

TAFF, H. T. et al. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future Microbiol**, Madison, v. 8, n. 10, p. 1-19, oct. 2013.

TAFF, H. T.; NETT, J. E.; ANDES, D. R. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays. **Med Mycol**, Wisconsin, v. 50, n. 2, p. 214-218, feb. 2012.

TOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of Morphology and Virulence in *Candida* Species. **Eucaryotic Cell**, San Antonio, v. 10, n. 9, p. 1173-1182, sep. 2011.

TORCATO, I. M. et al. Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 and RW-BP100, with activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, Lisboa, v. 1828, n. 3, p. 944-955, mar. 2013.

TORRES, M. D. T. et al. Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. **J Mol Biol**, v. 431, p. 3547-3567. 2019.

TOTH, R. et al. *Candida parapsilosis* Secreted Lipase as an Important Virulence Factor. **Current Protein and Peptide Science**, Hungary, v. 18, p. 1-7, 2017.

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

TUMBARELLO, M. et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. **J Clin Microbiol.** Gemelli, v. 45, n. 6, p. 1843-1850.

ULLIVARRI, M. F. et al. Antifungal Peptides as Therapeutic Agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Norwich, v. 10, n. 105, p. 1-22, mar. 2020.

UPPULURI, P. et al. *Candida albicans* Dispersed Cells Are Developmentally Distinct from Biofilm and Planktonic Cells. **mBio**, Los Angeles, v. 9, n. 4, jul/aug. 2018.

UWAMAHORO, N. et al. The Pathogen *Candida albicans* Hijacks Pyroptosis for Escape from Macrophages. **mBio**, Victoria, v. 5, n. 2, p. 3-14, mar/apr. 2014.

WALL, G. et al. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Science Direct**, San Antonio, v. 52, p. 1-6, 2019.

WILSON, D.; NAGLIK, J. R.; HUBE, B. The Missing Link between *Candida albicans* Hyphal Morphogenesis and Host Cell Damage. **Plos Pathogens**, Aberdeen, v. 12, out. 2016.

WILSON, D. *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, Aberdeen, v. xx, n. yy, p. 1-2, 2018.

WITCHLEY, J. N. et al. *Candida albicans* morphogenesis programs control the balance between gut commensalism and invasive infection. **Cell Host & Microbe**, San Francisco, v. 25, p. 432-443, mar. 2019.

WUERTH, K.; HANCOCK, R. E. New insights into cathelicidin modulation of adaptive immunity. **Eur J Immunol**, Vancouver, v. 41, n. 10, p. 2817-2819, 2011.

XIE, J. et al. White-Opaque switching in natural MTL α / α isolates of *Candida albicans*: evolutionary implications for roles in host adaptation, pathogenesis, and sex. **PLOS Biology**, Beijing, v. 11, n. 3, p. 1-12, mar. 2013.

XU, L. et al. Antimicrobial activity and membrane-active mechanism of tryptophan zipper-like β -hairpin antimicrobial peptides. **Amino Acids**. Harbin, v. 47, n. 11, p. 2385-2397, nov. 2015.

YADAV, M. K. et al. The Small Molecule DAM Inhibitor, Pyrimidinedione, Disrupts Streptococcus Pneumoniae Biofilm Growth *In vitro*. **PLoS One**, Seoul, v. 10, n. 10, p. 0139238, oct. 2015.

ZARNOWSKI, R. et al. Novel Entries in a Fungal Biofilm Matrix Encyclopedia. **mBio**, Wisconsin, v. 5, n. 4, p. 1-13, aug 2014.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc. Natl. Acad. Sci.** Bethesda, v. 84, p. 5449-5453, jan. 1987.