

# Explorando os estresses oxidativo e nitrosativo contra fungos: um mecanismo subjacente à ação de tradicionais antifúngicos e um potencial novo alvo terapêutico na busca por indutores oriundos de fontes naturais

Cláudio Daniel Cerdeira<sup>1\*</sup>, Matheus Pereira de Araújo<sup>2b</sup>, Carla Benedini Ribeiro Jorge Ferreira<sup>3c</sup>, Amanda Latercia Tranches Dias<sup>3d</sup>, Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão<sup>1c</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica (DBq), Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Alfenas, 37130-001, Minas Gerais (MG), Brasil.

<sup>2</sup> Department of Medicine, Dokkyo Medical University, Mibu, 321-0293, Tochigi, Japan.

<sup>3</sup> Departamento de Microbiologia e Imunologia (DMI), ICB, UNIFAL-MG, Alfenas, 37130-001, MG, Brasil.

\* Autor para correspondência: [daniel.cerdeira.84@gmail.com](mailto:daniel.cerdeira.84@gmail.com), Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0002-7242-8028>.

<sup>a</sup> Correio eletrônico: [daniel.cerdeira.84@gmail.com](mailto:daniel.cerdeira.84@gmail.com)

<sup>b</sup> Correio eletrônico: [matheus\\_araujo88@hotmail.com](mailto:matheus_araujo88@hotmail.com)

<sup>c</sup> Correio eletrônico: [carlabrjf@gmail.com](mailto:carlabrjf@gmail.com)

<sup>d</sup> Correio eletrônico: [amanda.dias@unifal-mg.edu.br](mailto:amanda.dias@unifal-mg.edu.br)

<sup>e</sup> Correio eletrônico: [maisaunifal@gmail.com](mailto:maisaunifal@gmail.com)

Recebido: 3 de março de 2020

Revisado: 14 de setembro de 2020

Aceto: 14 de outubro de 2020

## RESUMO

**Objetivo:** nesta revisão sistemática, nós avaliamos o *link* entre indutores de estresse oxidativo e/ou nitrosativo (EO/EN) com atividade antifúngica, através de uma ação direta sobre a célula fúngica e/ou modulando a resposta de fagócitos contra fungos de interesse médico (incluindo *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Aspergillus* spp.). Ainda, foram avaliadas as implicações clínicas deste evento bioquímico, bem como as perspectivas quanto à busca por novos compostos com atividade antifúngica, principalmente, os provenientes de fonte natural e, que explorem a indução de um EO ou EN como parte de seu mecanismo de ação. **Metodologia:** foram avaliados artigos, provenientes de diferentes bases de dados e publicados a qualquer período, acessados entre abril e junho de 2017, através da utilização de diferentes descritores. **Resultados:** primeiramente, estabelecemos as definições de EO/EN, como sendo o

aumento das concentrações de espécies reativas do oxigênio e/ou nitrogênio (ERO/ERN) quantificado diretamente e, provenientes de fontes fúngicas mitocondriais, Reação de Fenton, retículo endoplasmático ou outras não definidas, e excedendo a capacidade de defesa antioxidante do microrganismo (avaliados por análises de perfis transcriptômicos ou proteômicos ou metabolômicos ou níveis de atividade enzimática). Este aumento de ERO/ERN causando EO/EN é definido por tempo e condições que conduzem a sinalização de apoptose ou reais danos a biomoléculas com perda de função (peroxidação lipídica ou oxidação proteica ou danos ao DNA) e, conseqüentemente, gerando morte fúngica ou outro efeito antifúngico associado. Portanto, 64 artigos (apenas um publicado antes do ano 2000 e 50 entre 2007-2017) abordam que a indução de EO ou EN na célula fúngica é parte do mecanismo de ação de clássicos agentes antifúngicos (22 publicações), tais como azóis (fluconazol, itraconazol e miconazol), polienos (anfotericina B [AnB]) e equinocandinas (micafungina), assim como tal modulação redox tem sido reportada como um importante alvo terapêutico na busca por novos e promissores compostos naturais com atividade antifúngica (32 publicações), que tem respaldo pela grande variedade de indutores que podem provir da natureza. Ainda, compostos que também induzem o *burst* oxidativo de fagócitos, incluindo AnB, são potencializadores do efeito antifúngico *in vivo*. Além do efeito antifúngico contra células planctônicas, os efeitos dos EO ou EN sobre biofilmes fúngicos, também têm sido reportados. Tem sido firmado na literatura recente um claro *link* entre EO ou EN e a atividade antifúngica, tanto para aqueles agentes antifúngicos já utilizados na terapêutica em humanos, quanto para possíveis candidatos a fármaco. Portanto, a indução do EO ou EN como parte do mecanismo de ação de antifúngicos demonstra ser um importante alvo terapêutico, com perspectivas favoráveis sobre os desfechos na prática clínica.

*Palavras-chave:* Estresse oxidativo, estresse nitrosativo, fungos, *Candida albicans*, antifúngico, produtos naturais.

## RESUMEN

Explorando los estréses oxidativos y nitrosativos contra hongos:  
un mecanismo subyacente a la acción de los antifúngicos  
tradicionales y un potencial nuevo objetivo terapéutico  
en la búsqueda de inductores de fuentes naturales

**Objetivo:** esta revisión sistemática, evaluamos el vínculo entre los inductores de estrés oxidativo o nitrosativo (EO/EN) con actividad antifúngica, a través de una acción directa sobre las células fúngicas o modulando la respuesta de los fagocitos

contra hongos de interés médico (incluyendo *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. y *Aspergillus* spp.). Aun así, se evaluaron las implicaciones clínicas de este evento bioquímico, así como las perspectivas con respecto a la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antifúngica, principalmente los de fuentes naturales y que exploran la inducción de un EO o EN como parte de su mecanismo. **Metodología:** entre abril y junio de 2017, evaluamos artículos de diferentes bases de datos publicados en el cualquier período, utilizando diferentes descriptores. **Resultados:** primero, establecemos las definiciones de EO/EN, como el aumento en las concentraciones de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno (ERO/ERN) directamente cuantificadas y, provenientes de fuentes fúngicas mitocondriales, reacción de Fenton, retículo endoplásmico u otros no definido y que excede la capacidad de defensa antioxidante del microorganismo (evaluado por análisis de perfiles trans-criptómicos o proteómicos o metabólicos o niveles de actividad enzimática). Este aumento de ERO/ERN que causa EO/EN se define por el tiempo y las condiciones que conducen a la apoptosis o daño real a las biomoléculas con pérdida de función (peroxidación lipídica y/u oxidación de proteínas o daño al ADN) y, en consecuencia, provoca la muerte microbiana u otro efecto antifúngico asociado. Por lo tanto, 64 artículos (solo uno publicado antes del año 2000 y 50 entre 2007-2017) abordan que la inducción de EO o EN en la célula fúngica es parte del mecanismo de acción de los agentes antifúngicos clásicos (22 publicaciones), como los azoles (fluconazol, itraconazol y miconazol), polienos (anfotericina B [AnB]) y equinocandinas (micafungina), así como dicha modulación redox se ha informado como un objetivo terapéutico importante en la búsqueda de compuestos naturales nuevos y prometedores con actividad antifúngica (32 publicaciones), que está respaldado por la amplia variedad de inductores que pueden provenir de la naturaleza. Además, los compuestos que también inducen la explosión oxidativa de fagocitos, incluido AnB, son potenciadores del efecto antifúngico *in vivo*. Además del efecto antifúngico contra las células planctónicas, también se han informado los efectos de EO o EN en las biopelículas fúngicas. Se ha establecido un vínculo claro entre EO o EN y la actividad antifúngica en la literatura reciente, tanto para aquellos agentes antifúngicos ya utilizados en terapia en humanos, como para posibles candidatos a fármacos. Por lo tanto, la inducción de EO o EN como parte del mecanismo de acción de los antifúngicos es un objetivo terapéutico importante, con perspectivas favorables sobre los resultados en la práctica clínica.

*Palabra clave:* estrés oxidativo, estrés nitrosativo, hongos, *Candida albicans*, antifúngico, productos naturales.

## SUMMARY

## Exploring the oxidative and nitrosative stresses against fungi: an underlying mechanism beyond the action of traditional antifungal agents and a potential new therapeutic target in searching for inducers from natural sources

**Aim:** In this systematic review, we evaluated the link between inducers of oxidative or nitrosative stresses (OS/NS) and antifungal activity against fungi of medical relevance (including *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and *Aspergillus* spp.), through a direct action on the fungal cell or modulating phagocyte response. Moreover, the clinical implications of this biochemical event, as well as the perspectives, were examined, highlighting the search for new compounds with antifungal activity, mainly those from natural sources and, which explores the induction of OS or NS as part of the mechanism of action. **Methodology:** Articles from different databases and published at any time were evaluated, between April and June 2017, and using different descriptors. **Results:** First, a definition of OS and NS was established in which an increase in reactive oxygen or nitrogen species (ROS/RNS, quantified directly and from mitochondrial, Fenton reaction, endoplasmic reticulum or other fungal sources) should exceed the antioxidant defense capacity of the microorganism (evaluated by transcriptomic or proteomic or metabolomic profiles or enzyme activity levels). These events, by time and conditions delimited, can lead to the signaling of apoptosis or an actual damage toward biomolecules (lipid peroxidation or protein oxidation or DNA damage) and, consequently, they can cause cell death or other associated antifungal effect. Therefore, 64 articles were found, of these, only one was published before 2000 and 50 between 2007-2017, reporting the induction of OS or NS directly into the fungal cell via an increase in ROS or RNS as part of the mechanism of action of classical antifungal agents (22 publications), such as: azoles (fluconazole, itraconazole, and miconazole), polyenes (amphotericin B, [AnB]), and echinocandins (micafungin). This redox modulation has also been reported as an important therapeutic target in the search for new natural compounds with antifungal activity (32 publications), which is supported for the great variety of inducers from nature. Compounds that also induce the oxidative burst of phagocytes, including AnB, promote a combinatorial antifungal effect *in vivo*. In addition to the antifungal effect against planktonic cells, the relation between OS or NS and antifungal activity against fungal biofilms has also been reported. It has been established in the recent literature a clear link between OS or NS and antifungal effect, during the action of antifungal agents already used in the therapy in humans as well as for possible drug

candidates. Thus, the induction of OS or NS as part of the mechanism of action proves to be an important therapeutic target with favorable perspectives on the outcomes in clinical practice.

*Keywords:* oxidative stress, nitrosative stress, yeast, *Candida albicans*, antifungal, natural products.

### Abreviações, siglas e símbolos

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP – Trifosfato de adenosina

AnB - Anfotericina B

BIP - 2, 2'- biperidina

Ca<sup>+2</sup> – Íon Cálcio

cAMP - Monofosfato de adenosina cíclico

CasP – Caspofungina

Cat – Catalase

CIM – Concentração inibitória mínima

CFM – Concentração fungicida mínima

<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub> O<sub>2</sub> - Oxigênio singlete

DNA - *Deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico

EN - Estresse nitrosativo

EO - Estresse oxidativo

ERNS - Espécies reativas do nitrogênio

EROs - Espécies reativas do oxigênio

Fe - Ferro

Fe<sup>2+</sup> - Íon Ferroso

Fe<sup>3+</sup> - Íon Férrico

FLC - Fluconazol

fMLP - N-formil-metionil-leucil-fenilalanina

GPx - Glutaciona peroxidase

GR - Glutaciona redutase

GSH – Glutaciona reduzida

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

HO• - Radical hidroxila

HOCl - Ácido hipocloroso

IFIs - Infecções fúngicas invasivas

ITC – Itraconazol

iNOS - Óxido nítrico sintetase induzida

LASER – *Light amplification by stimulated emission of radiation*

LT – Laserterapia

MΦ – Macrófago

MF - Micafungina

MN – Miconazol

NAC - N-acetil-l-cisteína

NADPH oxidase - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

•NO - Óxido nítrico

Nox – Subunidade catalítica de NADPH oxidases

O<sub>2</sub> - Oxigênio molecular

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - Superóxido

OCl<sup>-</sup> - Ânion hipoclorito

ONOO<sup>-</sup> - Peroxinitrito

PMA - Acetato Miristato de Forbol

RE – Retículo endoplasmático

Sod - Superóxido dismutase

UFC - Unidade formadora de colônias

### Destaques

- Antifúngicos tradicionais e candidatos a antifúngicos podem induzir o acúmulo de EROs/ERNs na célula fúngica que, quando acompanhado de uma não efetiva defesa antioxidante do fungo, gera os chamados EO/EN, causando danos a biomoléculas do microrganismo e provocando uma inibição do crescimento ou morte do fungo.
- Os antifúngicos ou candidatos a antifúngicos podem incrementar a produção de oxidantes via fontes naturais de produção basal de EROs/ERNs na célula fúngica e/ou criar novos alvos redox para a produção de oxidantes, desse modo levando ao acúmulo na célula fúngica.
- Através da avaliação de sistemas de detoxificação de oxidantes em microrganismos e/ou uso de antioxidantes exógenos, o papel do EO e/ou EN no mecanismo de ação de antifúngicos tem sido estabelecido.
- Independente do EO e/ou EN induzido pelo antifúngico (ou candidato) gerar um efeito fungistático ou fungicida, o acúmulo de EROs/ERNs leva a uma diminuição da viabilidade celular e possível morte fúngica associada.
- Por outro lado, doses/concentrações sub-letais de antifúngicos pode gerar baixas produções de EROs/ERNs e, causar um *priming* da defesa antioxidante do

fungo, dessa forma esta sinalização via oxidantes pode contribuir com a resistência aos antifúngicos através de múltiplos mecanismos.

## INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas causadas por fungos apresentam considerável incidência em todo o mundo, sendo que, os fungos considerados oportunistas (como exemplos, *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Aspergillus* spp.) acometem principalmente pacientes imunocomprometidos e, os chamados patógenos fúngicos verdadeiros (como exemplos, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*), normalmente acometem tanto pacientes imunocomprometidos como os imunocompetentes. Ambos, fungos oportunistas ou patogênicos, podem causar infecções fúngicas invasivas (IFIs), com repercussão em altas taxas de mortalidade (20-90%, dependendo do contexto) [1-3].

Resistência aos agentes antifúngicos é um problema atual, sendo reportados, anualmente, aproximadamente 3400 casos de doenças infecciosas causadas por *C. albicans* resistente ao flucanazol (FLC) em hospitais dos EUA, com sérias repercussões para a saúde pública, elevando as taxas de morbimortalidade (neste caso, com aproximadamente 220 mortes anuais) e aumentando os gastos com internações e tratamentos [1, 2]. No Brasil, embora os dados sejam escassos e subestimados, a problemática quanto às infecções fúngicas e perfis de resistência aos agentes terapêuticos demonstram também serem preocupantes. Portanto, a busca por novos antifúngicos tem crescido nos últimos anos e a possibilidade de encontrar novos alvos terapêuticos também tem sido reavaliada [3, 4].

Neste contexto, diferentes estudos têm visado a busca por compostos que possam induzir elevada produção de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (ERO/ERN) na célula fúngica [5-9]. Esta elevação de ERO/ERN, quando acompanhada de uma ineficiência dos sistemas de detoxificação redox da célula fúngica (como exemplos, das enzimas superóxido dismutase [Sod], catalase [Cat], glutathione peroxidase [GPx], tio-redoxinas, entre outras), pode culminar nos chamados estresses oxidativos ou nitrosativos (EO/EN). Como consequência do EO/EN, ocorrem, danos a importantes macromoléculas do fungo, como lipídeos, proteínas e o DNA, independentemente de a ação antifúngica principal ser fungioestática (efeito de inibição do crescimento) ou fungicida (com morte microbiana imediata) [6].

Não apenas restrito à busca por novos compostos, tem sido reportado que, consagrados fármacos antifúngicos, como exemplos, os azóis (FLC, itraconazol [ITC] e miconazol [MN]) [4, 6, 10], polienos (anfotericina B [AnB]) [11] e equinocandinas (micafun-

gina [MF]) [12], tomam parte na produção aumentada de ERO/ERN, como parcela de seus mecanismos de ação, podendo haver nestes casos, efeito fungistático ou fungicida associado ao tratamento.

A possibilidade da indução do EO ou EN como alvo no tratamento de infecções fúngicas atrai o interesse de novos estudos, uma vez que este processo pode induzir a morte fúngica, seja via apoptose ou vias correlatas (incluindo aquelas que levam a indução de danos a biomoléculas do fungo e um efeito fungicida associado) [13]. Portanto, o objetivo desta revisão sistemática foi fornecer uma visão geral sobre os estudos relacionados à indução de EO ou EN como alvo terapêutico nas infecções fúngicas, além das implicações e perspectivas quanto à exequibilidade na prática clínica.

## METODOLOGIA

Nesta revisão sistemática da literatura nós, primariamente, avaliamos a associação entre o EO ou EN e a atividade antifúngica. Para tal, foi realizado um levantamento bibliográfico nas bases de dados indicados na tabela 1, usando uma combinação dos descritores: “oxidative stress”, “antifungal”, “nitrosative stress”, “reactive oxygen species (ROS)”, “reactive nitrogen species (RNS)”, “natural compounds” e “fungicidal”. As questões norteadoras desta revisão sistemática foram: Quais as reais associações entre o EO ou EN e a ação antifúngica? Como o EO ou EN podem causar danos a biomoléculas e morte fúngica? Quais fatores podem interferir ou serem considerados durante a indução de um EO ou EN por compostos de interesse? Quais são os compostos de fontes naturais que podem induzir o EO ou EN na célula fúngica? Apenas artigos publicados em periódicos, a qualquer período, foram considerados elegíveis. Dentre os critérios de elegibilidade (tabela 2) foram considerados os seguintes aspectos: (i) disponibilidade do texto integral para estudo; (ii) clareza no detalhamento metodológico utilizado (metodologia fidedigna para avaliar diretamente EROs/ERNs, danos oxidativos associados [peroxidação lipídica e danos ao DNA] e viabilidade fúngica); e (iii) relevância científica e clínica (indutores de EO ou EN com aplicabilidade clínica, com baixa toxicidade e ausência ou poucos efeitos colaterais). Para a consolidação do artigo, a contextualização do tema apresentado foi complementada com outras referências relevantes aos propósitos desta revisão.

**Tabela 1.** Estratégias de pesquisa conduzida nesta revisão sistemática sobre o tema abordado, realizada em diferentes bases de dados/domínios públicos.

Banco de dado	Palavras-chave	Período	Critérios de inclusão primária	Critérios de exclusão primária
PubMed (via PubMed); Embase (via OVID); Lilacs (via Bireme); Cochrane Library; Web of Science; Science Direct; OMIM; SciELO (via SciELO); CINAHL; MEDLINE (via Bireme); Scopus; BIOSIS; HNO	“oxidative stress”, “antifúngica”, “nitrosative stress”, “reactive oxygen species (ROS)”, “reactive nitrogen species (RNS)”, “natural compounds” e “fungicidal”	Sem restrição	Pertinência/relevância ao tema	Texto integral não disponível

Última pesquisa no PubMed em maio de 2017. Última pesquisa no Embase em maio de 2017. Última pesquisa no Lilacs em maio de 2017. Última pesquisa no Cochrane Library em maio de 2017. Última pesquisa no Web of Science em maio de 2017. Última pesquisa no Science Direct em maio de 2017. Última pesquisa no OMIM em maio de 2017. Última pesquisa no SciELO em maio de 2017. Última pesquisa no CINAHL em maio de 2017. Última pesquisa no MEDLINE em maio de 2017. Última pesquisa no Scopus em maio de 2017. Última pesquisa no BIOSIS em maio de 2017. Última pesquisa no HNO em maio de 2017. \*Apenas artigos publicados foram aceitos como documentos, para uma prévia triagem.

## DISCUSSÃO

Nesta revisão nós analisamos artigos que relatam sobre novos compostos com ação antifúngica, cujo mecanismo de ação, foi reivindicado para ser dependente de ERO/ERN. Além disso, nós avaliamos trabalhos que tratam de mecanismos de ação antifúngica dependente de ERO/ERN, creditados a antifúngicos rotineiramente usados na prática clínica, com possíveis mecanismos de ação paralelos ou ainda parcialmente elucidados. Motivo de controvérsias por parte da comunidade científica, o chamado “mecanismo comum para a morte microbiana” (do inglês *unified mechanism of killing*), induzida por ERO/ERN, tem sido amplamente abordado para antibacterianos e agora é relatado também para os antifúngicos [14-19]. De fato, determinados níveis de ERO/ERN tomam partes na sinalização apoptótica e [20], até o momento, está via tem sido considerada um alvo promissor para a ação de candidatos a antifúngico [7].

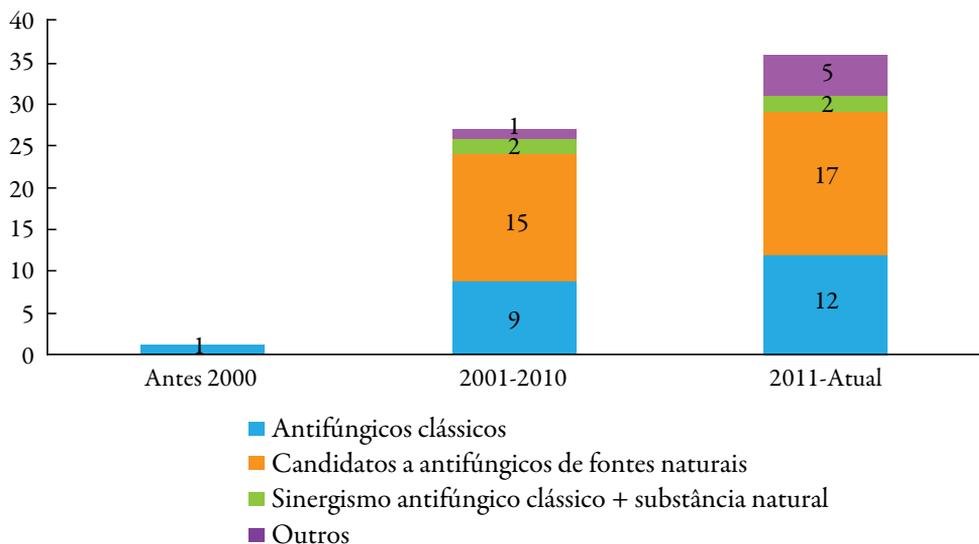
Nós realizamos criteriosa revisão sistemática, na qual 64 artigos que claramente abordavam o tema alvo (figura 1) foram encontrados. Como observado na figura 1, as pesquisas neste campo de estudo são recentes (apenas um artigo publicado antes dos anos 2000)

**Tabela 2.** Sumário dos critérios de inclusão e exclusão adotados nesta revisão sistemática.

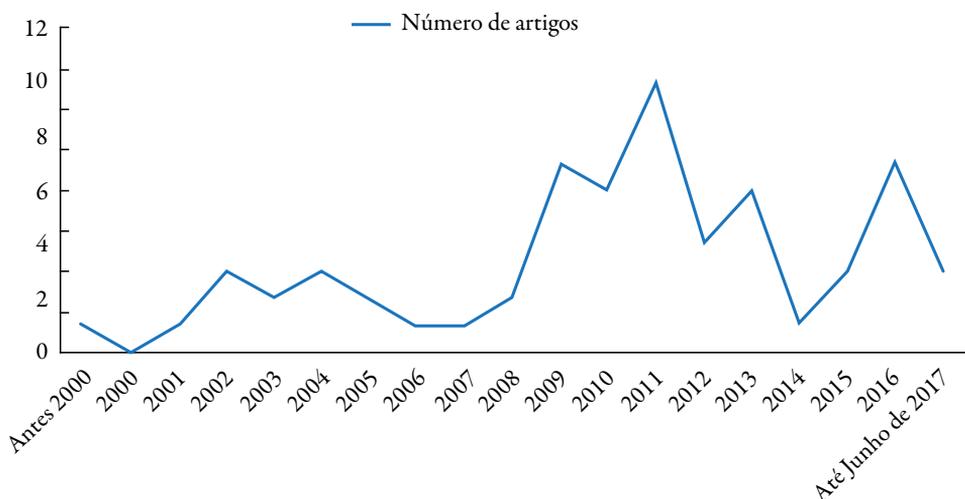
<b>Portal</b>	Descritos na tabela 1
<b>Período aceito</b>	Qualquer época
<b>Interstício</b>	Abril–junho 2017
<b>Palavras-chave</b>	“oxidative stress”, “antifungal”, “nitrosative stress”, “reactive oxygen species (ROS)”, “reactive nitrogen species (RNS)”, “natural compounds” e “fungicidal”
<b>Critérios para triagem primária*</b>	(i) Dados reportando a relação entre estresse oxidativo ou nitrosativo e ação antifúngica comprovada (independente de induzir apoptose ou das ações serem fungistática ou fungicida); Relevância da proposta, plausibilidade biológica e clínica/terapêutica; (ii) Viabilidade metodológica respaldando os achados; Conclusão suportada pelos resultados; (iii) Clareza na descrição dos mecanismos que permeiam o estresse oxidativo como evento primário ou coadjuvante da ação antifúngica
<b>Tipos de documentos</b>	Apenas artigos publicados em periódicos indexados
<b>Critérios de elegibilidade</b>	(i) Disponibilidade do documento integral (ii) Metodologia apropriada (iii) Estudos com relevância científica
<b>Total de artigos abordando o tema</b>	64

\*Para produtos de origem natural, apenas compostos isolados e identificados com concentração inibitória mínima (CIM) ou concentração fungicida mínima (CFM) < 600 µg/mL e baixa ou nenhuma toxicidade para humanos (bom índice de seletividade [IS]) foram considerados.

e crescentes (50 artigos foram publicados entre 2007-2017, figura 2), visto que o tema EO ou EN é relativamente recente [21]. Controvérsias a parte, é notória a convergência de achados mostrando a estreita relação entre a indução e acúmulo de EROs/ERNs na célula fúngica e consequente ação antifúngica, quando a defesa antioxidante da célula microbiana é superada, desde que, na definição de “estresse oxidativo ou nitrosativo”, há favorecimento para o aumento de fatores pró-oxidantes em detrimento dos antioxidantes (sistemas de defesa enzimáticos, entre outros), por tempo e contexto definidos, levando em conta que o ambiente redox pode variar significativamente [21]. Ainda, nós consideramos possíveis ações adjuvantes dos indutores/clássicos antifúngicos, como a imunomodulação, bem como consideramos a presença de cepas fúngicas que exploram mecanismos de resistência ao EO ou EN como repertório de virulência e patogenicidade.



**Figura 1.** Número de artigos abordando o tema “Estresse oxidativo ou nitrosativo e atividade antifúngica” encontrados nesta revisão e estratificados de acordo com o foco. Antifúngicos clássicos: Aqueles usados na prática clínica (exemplos: AnB, FLC, MF); Outros: estudos que abordavam a elevação de ERO/ERN e atividade antifúngica induzida por compostos de origem sintética.



**Figura 2.** Número de artigos abordando o tema “Estresse oxidativo ou nitrosativo e atividade antifúngica” ao longo dos anos.

### Possíveis fontes de ERNs/ERNs na célula fúngica

Após estabelecer os conceitos de EO/EN, nós examinamos as fontes de ERO/ERN na célula fúngica. A produção de superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), relativamente um fraco oxidante que, normalmente, é o primeiro formado dando origem a EROs/ERNs mais fortes em cascatas subsequentes, tem o oxigênio molecular ( $O_2$ ) comoceptor de elétrons. O  $O_2^{\bullet}$  em fungos pode ser de origem mitocondrial (mais comum, por conta de um aumento na atividade da cadeia transportadora de elétrons e a consequente toxicidade do  $O_2$ ) ou originário da atividade do retículo endoplasmático (RE) [22-25]. Estruturas proteicas homólogas em fungos, semelhantes aquelas do complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase encontrado em humanos, podem gerar  $O_2^{\bullet}$  (segundo a equação:  $4 O_2 + 4 NADPH \rightarrow 4 O_2^{\bullet} + 2 NADP^+ + 4 H^+$ ).

Quando o  $O_2^{\bullet}$  é formado, este oxidante pode ser dismutado espontaneamente ou enzimaticamente (catalizada pela Sod, na reação:  $2 O_2^{\bullet} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ ), formando o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O  $H_2O_2$  pode sofrer ação de catalases/peroxidases fúngicas (como exemplo, a GPx) ou seguir diferentes caminhos originando outras EROs. Assim, o  $H_2O_2$  pode gerar radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ), através da reação de Fenton e a reação acoplada de Haber-Weiss (dependentes de  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ ). Paralelamente, o  $O_2^{\bullet}$  pode reagir com o óxido nítrico ( $\bullet NO$ ) ou alguns outros compostos, gerando o peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ , uma ERN). De nota, alguns destes oxidantes podem ser gerados intensamente durante ação específica de um fármaco/composto. O  $HO^{\bullet}$  e o  $ONOO^{\bullet}$  são altamente reativos e podem prontamente causar danos aos lipídios, proteínas e DNA e, na ausência ou ineficiência de sistemas de reparos destas biomoléculas, podem levar a perda de função e a morte microbiana.

Como exemplos de ativação pontual do EO em fungos, Avci *et al.* [25] mostraram que ascorbato pode eliciar aumento de EROs, exclusivamente, via reação de Fenton, com aumento de  $HO^{\bullet}$  a partir do  $H_2O_2$  e  $O_2^{\bullet}$ . Yu *et al.* [24] demonstraram que alguns agentes que podem perturbar a parede celular fúngica (40  $\mu g/mL$  de calcoflúor branco, em inglês *Calcofluor White* [CFW], ou 0, 1  $\mu g/mL$  de caspofungina [CasP]) causam quadro de EO (em até 60 min após o tratamento) intracelular via aumento de EROs (oxidantes totais avaliados com a sonda DCFH-DA) originários do RE em *C. albicans*, gerando peroxidação lipídica e danos associados. N-acetil-l-cisteína (NAC) preveniu a elevação dos níveis de EROs e os danos associados a ação antifúngica do CFW (NAC regenera GSH, que previne a formação das induzidas pelo antifúngico), demonstrando a dependência de EROs (principalmente o  $H_2O_2$ , como verificado em sistemas de hiperexpressão de *SOD1* e *CAT1* por um forte promotor de *ACT1*) para a ação destes disruptores de parede. Disfunção mitocondrial e, aumento de  $O_2^{\bullet}$  a partir desta organela, não foram observadas. Além disso, os grupos tratados com CFW ou CasP com adição

de um quelante de ferro (2, 2'-bipiridina [BIP]) ou *scavenger* de HO• (etanol) ou efeito do CFW/CasP sobre cepas mutantes para este alvo (reação de Fenton) não atenuaram o EO e a consequente inibição do crescimento microbiano.

O aumento de EROs a partir do RE foi atribuído pelos autores a uma hiperexpressão gênica e indução de uma resposta via acúmulo de proteínas desdobradas (do inglês *unfold protein response* (UPR)), por conta da disrupção na parede fúngica. Isto se refletiu em um aumento na secreção de proteínas e consequente aumento da enzima oxidoreductina do RE (Ero1), relacionada ao dobramento oxidativo de proteínas, fazendo um rearranjo redox de pontes dissulfeto, como contrarresposta para superar o quadro de UPR ou de proteínas oxidadas encontradas em células tratadas com CFW ou CasP. Assim, durante sua função, Ero1 na forma redutiva recebe elétrons do O<sub>2</sub>, formando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fazendo com que haja predominância da forma oxidada de Ero1 e, explicando, tanto este incremento em Ero1 oxidada, quanto os altos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provenientes do RE. Estes dados estabelecem um novo *link* entre a integridade da parede celular fúngica, função do RE e aumento de EROs e danos associados (aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causa peroxidação lipídica, como evidenciado pelos autores), demonstrando também um possível novo alvo terapêutico, com especificidade/seletividade para o fungo [24].

Em fungos, o O<sub>2</sub>• formado pode reagir instantaneamente com o •NO, gerando ONOO•. Este fato é comprovado em prévios trabalhos [4, 22, 23], que avaliaram estas ERNs ou a resposta antioxidante do fungo (por exemplo, via aumento na expressão persistente de *YHB1*, ou tardia de *TRR1*) frente à exposição a tais oxidantes [22]. Estes dados destacam a plausibilidade cronológica dos eventos relacionados ao EN na célula fúngica, desde que exposição as ERNs geram uma resposta imediata e persistente via *YHB1*, e uma resposta tardia é verificada via aumento na expressão de tioredoxinas (gene *TRR1*), desde que esta classe de enzimas tenta controlar os danos oxidativos a proteínas (evento seguinte à exposição das biomoléculas as ERNs).

Ainda, segundo Cánovas *et al.* [23], o •NO endógeno de fungos pode ter origem em algumas rotas metabólicas, como a da arginina/poliaminas (mediado por enzimas com atividades similares a do óxido nítrico sintetase [NOS]) ou do NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (ação do nitrato redutase, *niaD*). O •NO é detoxificado pelas rotas das flavohemoglobinas (*hemC*, *fhbA*, *fhbB*), do citocromo P450 NO redutase (*nicA*, *norA*, *norB*) ou da GSNO redutase (genes *GNO1* e *SEAI*). Esta ERN tem variadas funções em fungos, como a regulação do metabolismo do nitrogênio, morfogênese e reprodução.

Complementarmente, Ferreira *et al.* [4] mostraram que, o ONOO• é induzido em *Cryptococcus gattii* pela ação da AnB, em que associação de AnB com concentrações de até 50 µM de porfirinato de ferro III (um *scavenger* de ONOO•), atenuou os danos

associados ao EN. Os autores relataram que, no *C. gattii*, assim como em outros contextos químico-biológicos, o  $\bullet\text{NO}$  compete com a Sod pelo  $\text{O}_2^\bullet$ , tendo cinética favorável, como demonstrado pela marcante formação de  $\text{ONOO}^\bullet$  e pela paralela diminuição na atividade da Per (uma enzima que atua sobre o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , cujas concentrações diminuem como consequência da menor dismutação do  $\text{O}_2^\bullet$  pela Sod).

Associado as fontes de EROs/ERNs na célula fúngica e, dependentes do contexto que permeia e as características físico-químicas dos oxidantes (difusão, meia vida, entre outros), normalmente, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  causa peroxidação lipídica (tem boa difusão, maior meia vida e atravessa membranas), ERNs (principalmente  $\text{ONOO}^\bullet$ ) leva a oxidação proteica e o potente oxidante  $\text{HO}^\bullet$  tem alta capacidade de alcançar o DNA e causar sérios danos oxidativos a esta biomolécula, explicando, em parte, o fato de alguns compostos, que serão adiante discutidos, terem a capacidade de induzir maiores níveis de determinado oxidante e consequentemente maiores danos a uma determinada biomolécula, o que também será diretamente proporcional ao aumento nas concentrações de tal oxidante.

### Sistemas de defesa antioxidante do fungo como marcadores da elevação de ERO/ERN

Seguindo a exposição as EROs e/o ERNs, a ativação de diversos sistemas de defesa antioxidante (tanto os constitutivos como os induzíveis), temporalmente, primeiro, permitem à célula fúngica detoxificar os oxidantes (através da Sod [detoxifica o  $\text{O}_2^\bullet$ ], Cat e GPx [detoxificam o  $\text{H}_2\text{O}_2$ ], entre outras), segundo, caso haja necessidade (em caso de EO ou EN), em reparar os danos oxidativos a biomoléculas (por exemplo, via tioredoxinas, regenerando proteínas oxidadas). A detoxificação e os reparos permitem a prevenção de maiores danos e evita possível morte celular fúngica. Para haver ação antifúngica, a indução de EROs/ERNs deve ser acompanhada de uma ineficiência destes sistemas de defesa antioxidante da célula fúngica. Vários sistemas específicos de defesa antioxidante têm sido destacados para fungos, alguns, controlados em *clusters* gênicos. Cabe salientar que, como ainda será visto nesta revisão, a estratégia de adição de antioxidantes exógenos, visando prevenir o EO/EN e provando o efeito de EROs/ERNs, não é discutido nesta seção.

Cepas mais virulentas de fungos podem apresentar marcante produção de enzimas do sistema antioxidante, como verificado por Lee *et al.* [26], que mostrou que cepas fúngicas que expressam mais o gene para Sod são menos afetadas pelo efeito de EROs induzidas pela radiação. Como implicação, isto foi refletido em uma ineficiência na ação irradiante para induzir um mecanismo fungicida associado. Outro exemplo, bem sucedido, de resposta antioxidante contendo danos oxidativos em fungos, foi demonstrado por Paul *et al.* [27], em que a resistência de *Cryptococcus neoformans* ao FLC foi correlacionada a hiperexpressão do  $\text{YAP1}_{113}$  visto que mutação neste gene causou extrema hipersensibilidade do fungo ao EO e ao FLC, nas mesmas faixas de concen-

tração testadas para as o fungo com o *YAP1* funcional. Como foi demonstrado que *C. albicans* ou *Aspergillus fumigatus* deficientes de *YAP1* também são hipersensíveis ao EO, mas não ao FLC, foi sugerido que este gene apresenta um papel único na resposta de *C. neoformans* a este agente antifúngico.

Ainda, aumento na expressão gênica de enzimas do sistema de detoxificação de oxidantes nem sempre significa efetiva resposta do fungo. Guirao-Abad *et al.* [12] mostraram que a ação indutora de EROs/ERNs por AnB pode ser acompanhada de aumento na expressão dos genes que codificam Cat, glutathiona redutase (GR) e Sod, como parte da resposta antioxidante do fungo. Provavelmente, o desfecho fungicida promovido por AnB mostra que, embora exista aumento, este é ineficaz para o controle redox, prevalecendo os oxidantes no balanço oxidante-antioxidante. Este desequilíbrio redox culmina em danos oxidativos irreversíveis para o fungo, o qual também foi evidenciado por Ferreira *et al.* [4]. Os autores concluíram que o aumento na capacidade de defesa antioxidante (como aumento de Sod) de *C. gattii* pode não ser suficiente para conter os danos oxidativos induzidos por AnB ou ITC.

Rossignol *et al.* [28] demonstraram que cetonas sintetizadas pela reação de Mannich e derivados sintéticos (com CIM de 0, 8 a 6 µg/mL) podem elevar as EROs em espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*), e isto causar ativação do gene *CAP1* (um gene essencial na montagem da resposta antioxidante), em que tal resposta também não foi suficiente para impedir a atividade antifúngica destes compostos.

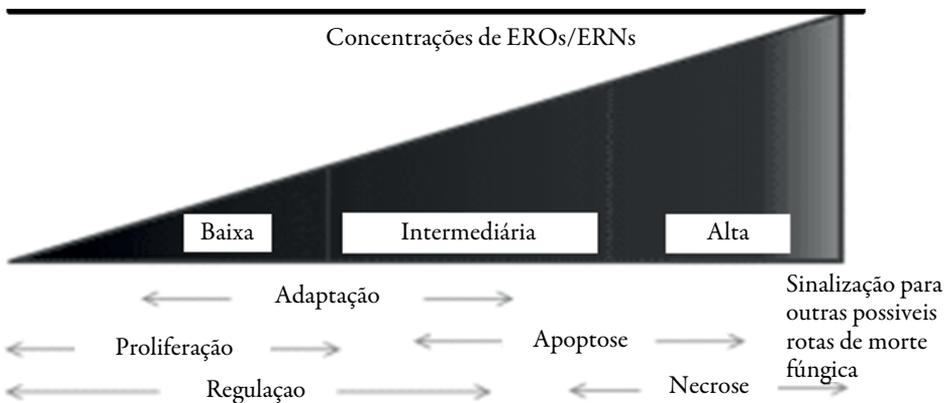
Portanto, os estudos aqui demonstrados, apresentam evidências de estresse oxidativo ou nitrosativo na célula fúngica, avaliadas sobre a luz de medidas indiretas das espécies oxidantes (através de sondas como a DCFH-DA, ou outros métodos/sondas), medidas dos danos induzidos por EROs e ou ERNs (peroxidação lipídica [níveis de MDA], oxidação proteica [avaliação de resíduos oxidados] ou danos ao DNA [avaliação de desoxiguanosina com 8-oxodG]). Além disso, a avaliação dos sistemas de defesa antioxidante do fungo, através de análises do perfil de transcrição ou atividades enzimáticas fornecem uma ferramenta valiosa para estabelecer o quadro de EO ou EN.

De relevância clínica, determinadas cepas fúngicas podem apresentar variados níveis de hiperexpressão dos sistemas de defesa antioxidante. Esta variação pode inclusive determinar o grau de virulência destas cepas *in vivo* bem como o perfil de sensibilidade aos antifúngicos que induzem EO/EN e, extensivamente, ao ataque de fagócitos. A hiperexpressão de genes/proteínas, relacionadas à resposta antioxidante pode favorecer o fungo frente ao ataque de fagócitos, os quais utilizam do EO/EN como mecanismo fungicida. Interessantemente, expressão diferencial para uma determinada enzima antioxidante, independentemente da predileção do oxidante induzido, pode ocorrer,

de modo que a enzima em concentrações excessivas pode detoxificar um determinado oxidante, mas favorecer acúmulo de outro. Por exemplo, hiperexpressão do gene para Sod concomitante a repressão de *CAT* pode favorecer acúmulo de  $H_2O_2$  na célula fúngica, caso contrário, uma repressão do gene *SOD* favoreceria o acúmulo de  $O_2^{\bullet-}$ .

### Indução de EROs/ERNs pode levar a apoptose na célula fúngica

A sutileza do limiar entre o que é fisiológico e o que passa a ser patológico depende de complexos fatores e, a dualidade dos oxidantes é destacada, sendo o contexto redox sempre passível de alterações que podem significar grandes alterações funcionais [29]. A figura 3 mostra o sutil limiar entre o fisiológico e patológico, frente às diferentes concentrações de EROs/ERNs.



**Figura 3.** Limiar entre as concentrações de EROs/ERNs em fungos e a ativação de importantes eventos funcionais sinalizados por estes oxidantes.

Baseado neste contexto, estudos tem demonstrado que ligeira elevação destes oxidantes (a partir de valores intermediários) é importante fator de sinalização e precede a apoptose em fungos, por diferentes rotas (com diferentes mediadores, expressão gênica e danos citolíticos associados) para que este evento ocorra (dependentes dos níveis de determinados oxidantes e interação com componentes chaves que levam a apoptose). Dessa forma, este evento pode fornecer um possível alvo terapêutico, desde que haja especificidade/seletividade para o fungo em questão, uma vez que alguns componentes destas vias são comuns em humanos [30-34]. Assim, em fungos, o aumento de EROs/ERNs tem sido considerado um fidedigno marcador de apoptose e, portanto, um importante alvo farmacológico.

Notoriamente, existem outras vias de acionamento de apoptose em fungos que são independentes de EROs [33]. Excessivas concentrações de EROs podem sinalizar

outros mecanismos de morte, além de apoptose, tais como a necrose na célula fúngica (também referida como necrose programada) [33]. Na necrose programada, são observados danos oxidativos mais acentuados, com marcante aumento de volume das organelas, intensos danos e perda de integridade de biomoléculas e membranas e uma randômica fragmentação do DNA. Estes mecanismos são mostrados na figura 4.

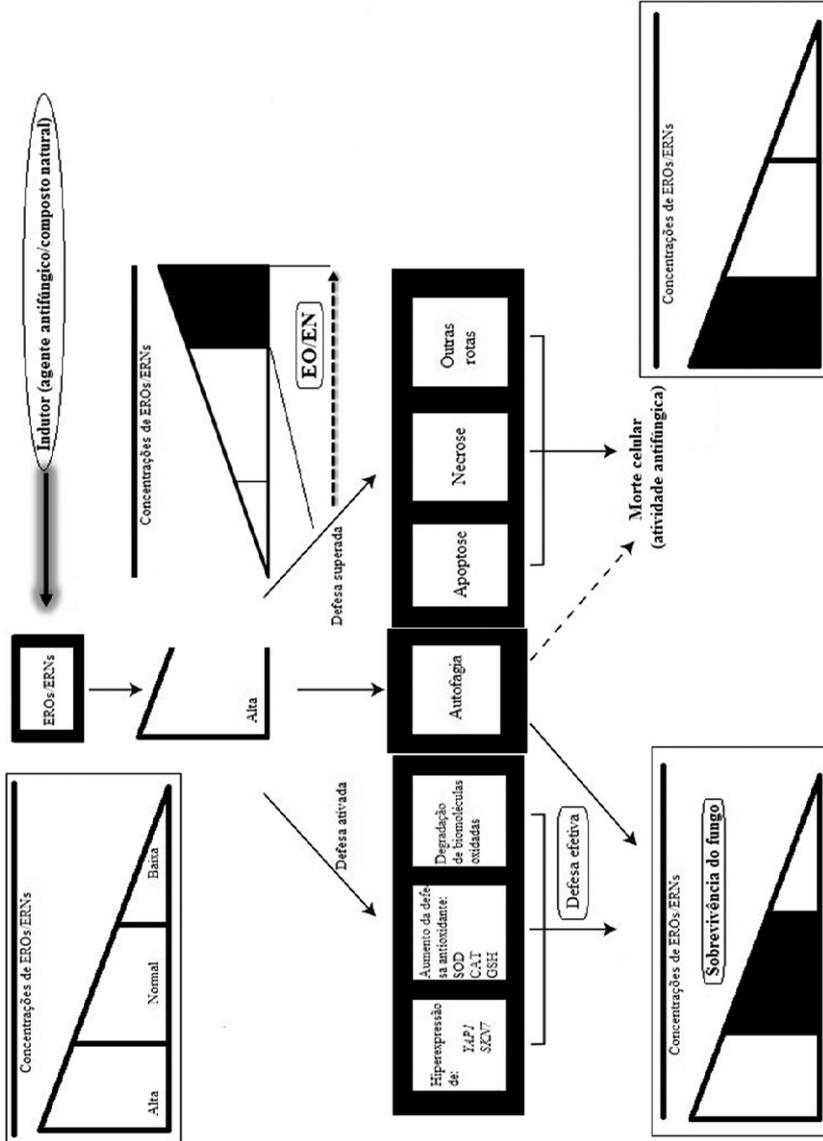
Neste contexto, mecanismos que possam elevar estas concentrações de EROs pró-apoptóticas e causar efeito fungicida contra células planctônicas e biofilmes, são alvos de estudo. Estes estudos não são apenas restritos à busca por novos compostos, mas têm sido descritos para antifúngicos já usados na terapêutica, tais como AnB a baixas doses fungicidas (0.25–1 µg/ml), ITC e equinocandinas, contra fungos de relevância médica (como *C. albicans*).

Dessa forma, AnB pode causar alterações nos níveis de ATP, e outras alterações típicas de apoptose, em sub-populações de *C. albicans*, sustentando o fato que o tratamento de infecções sistêmicas causadas por este microrganismo, com concentrações não ajustadas deste agente antifúngico, diminui a população microbiana via indução de apoptose. *A. fumigatus* tratado com 0.25–1 µg/ml de AnB apresenta coloração positiva com *annexin V*, indicando exposição de fosfatidilserina, um marcador clássico de apoptose, sendo também evidenciado fragmentação do DNA, conforme verificado pelo teste do Túnel [30-35].

Ainda segundo Ramsdale [30], as fenantrolinas podem induzir a morte de *C. albicans* com marcante elevação nos níveis de EROs não acompanhado por danos ao DNA, o que poderia indicar que este aumento dos oxidantes toma parte, preferencialmente e primariamente, na sinalização de apoptose.

Alguns compostos, que serão discutidos mais adiante, demonstraram induzir apoptose em fungos via aumento de EROs, incluindo a metergolina (um alcaloide da classe das ergolinas que apresenta ação antagonista serotoninérgica a nível de receptores do sistema nervoso autônomo) [36] que pode induzir apoptose em *C. krusei*, os esfingóides em *A. nidulans* [37], o (+)-medioresinol [38], a baicaleína [39], o *plagiochin E* [40, 41], a amentoflavona [42] e *styraxjaponoside C* [43] em *C. albicans*. O perilaldeído [PAE], a curcumina e o ácido úsnico serão discutidos mais adiante.

Alguns outros compostos naturais, com estruturas mais complexas, que poderiam levar a apoptose na célula fúngica por incrementar EROs, incluem: proteína osmotina (isolado do tabaco) [30], defensinas de plantas como RsAFP2 (*Heuchera sanguinea*) e PvD1 (*Phaseolus vulgaris*) [44, 45], peptídeos antimicrobianos proveniente de plantas, artrópodes e animais entre outros, como *psacothiasin* (proveniente de *Psacothea hilaris*) [46], arenicina-1 (*Arenicola marina*) [47], *pleurocidin* (*Pleuronectes americanus*)



**Figura 4.** Possíveis respostas do fungo as altas concentrações de EROs/ERNs.

O acúmulo de ERO ou ERNs pode elicitar uma variada gama de defesa endógena do fungo, incluindo os sistemas de defesa antioxidante (para detoxificar oxidantes ou reparar biomoléculas), os de degradação de biomoléculas afetadas (sistema proteossomo dependente de ubiquitina) e finalmente, a autofagia. Contudo, quando tais sistemas de defesa falham, a célula fúngica pode sofrer as consequências do acúmulo de EROs ou ERNs, culminando em EO ou EN e, conseqüentemente, entrando em apoptose, ou sofrendo necrose ou outros tipos de morte (efeito antifúngico pela indução de EROs/ERNs).

[48], papiliocina (*Papilio xuthus*) [49], e melitina (*Apis mellifera*) e [50], fatores salivares de humanos, incluindo as lactoferrinas [51] e as histatinas (apesar das controvérsias sobre este polipeptídeo) [30, 52, 53].

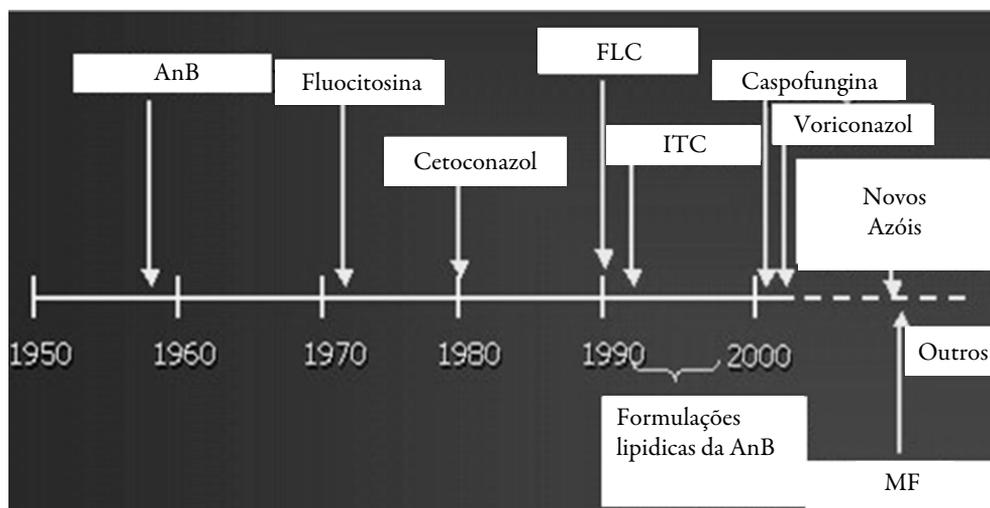
Em estudo demonstrando a intrincada relação entre EROs e apoptose, Silva *et al.* mostraram que, o sinergismo entre o FLC e os compostos antioxidantes naturais: catequina, quercetina ou epigallocatequina, induziu apoptose em *C. tropicalis* resistente ao FLC [54]. Interessantemente, com o uso de um antioxidante a baixas concentrações ou concentrações em que estes compostos se comportem puramente como um “antioxidante” em um meio celular, seria esperado a diminuição de EROs induzida por FLC, e uma não ativação do apoptose, como tem sido reportado na literatura, que evidenciam a capacidade de antioxidantes em abolir o efeito microbicida dependente de EROs/ERNs. Esta situação leva ao desfecho clínico desfavorável ao hospedeiro quando a associação antifúngico + antioxidante é adotada durante o tratamento de infecções fúngicas [14, 15, 18, 19, 24].

Contudo, como é também amplamente destacado na literatura, antioxidantes a altas concentrações ou associados a outros fatores, como o contexto do ciclo redox na célula, podem apresentar um efeito pró-oxidante [25, 55]. O efeito pro-oxidante é visto no estudo de Silva *et al.*, o qual utilizou altas concentrações de flavonoides (128 µg/ml), tendo como desfecho a morte celular programada do fungo. Ainda quanto a ação do FLC, Liu *et al* demonstram que a adição de Farnesol exógeno (um correlato a via de biossíntese do ergosterol) pode elevar as EROs e causar apoptose em *Penicillium expansum*, um fungo patógeno de vegetais [56].

Gaofua *et al.* demonstraram que um lipopeptídeo surfactante, WH1 fungina, proveniente de *Bacillus amyloliquefaciens*, a baixas concentrações de 25-50 µg/mL, pode provocar apoptose em fungos (*C. albicans* e *Rhizoctonia solani*) sinalizada por rotas dependentes da mitocôndria com marcante formação de ERO (em contraste, altas concentrações, 100 µg/mL, leva a formação de poros na membrana e consequente necrose) [57]. Clássicos marcadores de apoptose foram evidenciados após o tratamento com 25-50 µg/mL de WH1 fungina, incluindo desprendimento de citocromo *c* da mitocôndria (um dos fatores da atividade da metacaspase 9 para sinalizar apoptose) e marcante elevação dos níveis pró-apoptóticos de EROs (avaliadas com DCFH-DA que detecta todas as EROs), precedendo a morte celular fúngica. Outros peptídeos sintéticos também têm sido reportados como causadores de apoptose em fungos [58].

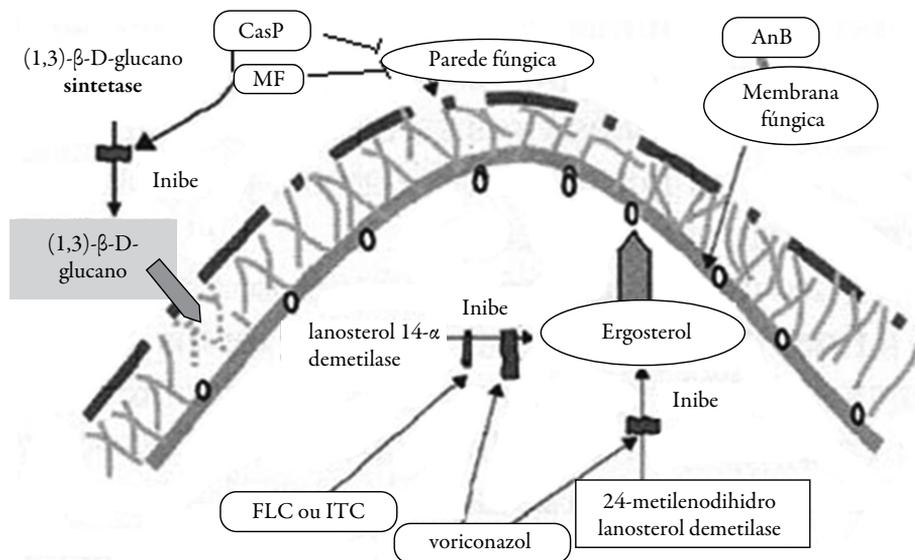
### Indução de EROs/ERNs como parte da ação de fármacos antifúngicos

Diante das atuais altas incidências de doenças infecciosas causadas por fungos, os antifúngicos clássicos, pertencentes às classes dos polienos (principalmente AnB e suas formulações lipídicas), azóis (FLC, MN, voriconazol e ITC) e equinocandinas (MF), continuam sendo rotineiramente utilizados na prática clínica, (figura 5). O espectro de ação destes agentes terapêuticos tem variado significativamente nos últimos anos, por conta das altas taxas de resistência em fungos. Devido à diminuição de cepas sensíveis a estes clássicos antifúngicos, houve aumento no número de estudos e publicações quanto à busca de novas alternativas terapêuticas ou compostos em fontes sintéticas ou naturais, em anos recentes, como visto nas figuras 1 e 2.



**Figura 5.** Histórico da descoberta e introdução de agentes antifúngicos na terapêutica.

As atividades destes agentes antifúngicos clássicos, já utilizados na terapêutica, são reivindicadas como sendo também dependentes da prévia produção de EROs/ERNs, como desfecho oriundo das atividades principais, classicamente descritas e vistas na figura 6 e tabela 3, ou como um novo mecanismo paralelo a tais atividades. O desfecho pode ser um mecanismo de ação “fungicida”, preferivelmente ao “fungistático”, no chamado “mecanismo unificado para a morte microbiana” (como visto na tabela 3). Este fato é comprovado mediante a atenuação de danos oxidativos e prevenção da morte microbiana induzida por EO/EN pela adição de antioxidantes exógenos ou intenso acionamento de sistemas endógenos de defesa antioxidante [59-61].



**Figura 6.** Alvos na célula fúngica para a ação dos polienos, equinocandinas e azóis.

Recentemente, Belenky *et al.* demonstraram através de estudos metabolômicos que, em *C. albicans*, AnB, MN e ciclopirox induziram marcantes alterações da dinâmica mitocondrial e perfil funcional, em parte, pela marcante produção os EROs. O aumento na produção de EROs resultou em danos ao DNA e consequente morte microbiana [19]. Xu *et al.* conduziram estudos proteômicos para a elucidação de possíveis mecanismos indutores de EROs pelo FLC, na argumentação deste agente antifúngico induzir EO e um efeito fungicida [62].

O primeiro artigo reportando dados a respeito da indução de EROs como parte da ação antifúngica foi de 1986 [63], em que Sokol-Anderson *et al.* mostraram que AnB induzia danos oxidativos associado ao afeito fungistático contra *C. albicans*. Sangalli-Leite *et al.* demonstraram que a AnB exerce efeito fungicida contra *C. neoformans* através de forte indução de EROs [64].

Ainda para a AnB, Ferreira *et al.* demonstraram que este agente antifúngico pode levar a produção de EROs e ONOO<sup>-</sup> contra *C. gattii* [4], em um mecanismo paralelo a inibição da biossíntese de ergosterol. Este mesmo efeito também foi demonstrado pelos autores, durante o mecanismo de ação do FLC ou ITC. Interessantemente, apenas ITC e AnB provocaram peroxidação lipídica em *C. gattii*, devido ao prévio EO, induzido pelos antifúngicos (EROs induzidos pelo ITC ou EROs e ERNs [ONOO<sup>-</sup>] pela AnB), com ativação do sistema antioxidante do fungo. Neste caso,

a ativação do sistema antioxidante do fungo, foi ineficaz para conter os danos oxidativos. Os autores concluíram que AnB e ITC causam EO em *C. gattii* como parte de seus mecanismos antifúngicos.

Na sequência, Guirao-Abad *et al.* [12] encontraram que AnB e MF tomam parte na formação de EROs e que este evento é crucial durante suas atividades fungicidas. AnB (Concentração Inibitória Mínima [CIM] de 0, 5-1  $\mu\text{g/ml}$ ) induziu marcante formação de EROs em *C. albicans* SC5314 acompanhada de morte celular. Uma sutil formação de EROs induzida por MF foi observado em *C. albicans*, culminando em uma ação fungicida. Interessantemente, pré-incubação de *C. albicans* com tiouréia (um antioxidante) suprimiu os efeitos tanto de AnB como de MF, demonstrado por marcante viabilidade celular. Ainda, este estudo demonstrou que durante a ação de AnB ou MF, houve uma marcante ativação de três enzimas antioxidantes, a Cat, GR e Sod. Entretanto, a ativação das enzimas antioxidantes foi ineficiente para conter o intenso EO induzido por AnB. Sutis aumentos de trealose e do potencial de membrana mitocondrial foram também evidenciados em *C. albicans*, durante o tratamento com AnB.

Contrastando com estes achados para MF, como aqui já discutido, Yu *et al.* [24] mostraram que EROs (principalmente  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) são induzidos por outro antifúngico da classe das equinocandinas, a CasP, contra *C. albicans*, mas de origem no RE. Estas diferenças entre estudos podem estar relacionadas às diferentes metodologias adotadas para avaliar as EROs, visto que o efeito fungicida associado foi verificado nos dois casos [12, 24]. Estes achados são complementares aos de Hao *et al.* [65], que demonstraram que a CasP pode conduzir a apoptose ou necrose em *C. albicans*, provavelmente, por induzir uma sutil elevação (causando apoptose) ou marcante elevação (causando necrose) nos níveis de EROs.

Em 2002, Kobayashi *et al.* relataram sobre a indução de EROs pelo MN [10]. Este agente antifúngico (com CIM de 0, 125 a 12.5  $\mu\text{g/ml}$ ) induziu intensa formação de EROs em isolados clínicos do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*), em um modo dependente da concentração. Pré-tratamento com 10  $\mu\text{M}$  do antioxidante pirrolidinaditiocarbamato (PDTC) inibiu o mecanismo antifúngico associado à produção de EROs. Os autores também sugeriram que FLC eleva a produção de oxidantes em *Candida* e isto pode estar relacionado à sua ação antifúngica.

Complementando os estudos de Kobayashi *et al* e Ferreira *et al.* [4, 10], Mahl *et al.* [6] mostraram que como parte do mecanismo principal o FLC pode induzir a formação de EROs em *C. glabrata* e consequente danos ao DNA (a peroxidação lipídica e oxidação proteica não foram significativas neste caso, como relatado pelos autores).

**Tabela 3.** Clássicos antifúngicos que geram EROs/ERNs como parte de seus mecanismos de ação.

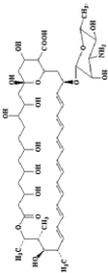
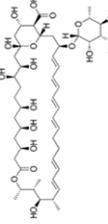
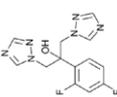
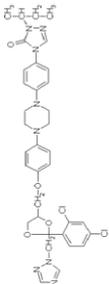
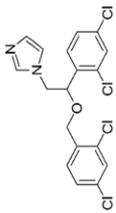
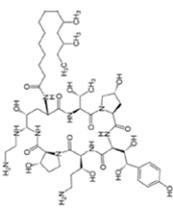
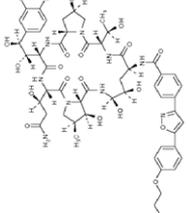
Antifúngico/ Classe	Estrutura	Alvo primário*	Ação	Indução de EROs/ERNs	Desfecho	Refs.
AnB/ Polienos		Membranas	Liga-se ao ergosterol	Indução de EROs (avaliadas com DCFH-DA <sup>A</sup> ) e ERNs (avaliadas com dihidrorodamina) em: <i>C. gattii</i> ; Indução de EROs em: <i>C. albicans</i> <i>A. fumigatus</i> <i>C. neoformans</i> Indução de EROs e apoptose em biofilmes de: <i>C. albicans</i>	Em baixas doses, indução de apoptose sinalizada por EROs; marcante indução de EROs/ERNs que pode desencadear o efeito fungicida via um incremento de peroxidação lipídica em <i>C. gattii</i> . Provável fonte mitocondrial das EROs.	[4, 12, 30, 62, 63, 64]
Nistatina		Membranas	Liga-se ao ergosterol	Indução de EROs contra: <i>C. albicans</i>	Indução de EROs pode desencadear o apoptose e o efeito fungicida associado.	[4, 30]
FLC/ Azóis		Membranas	Impede a biossíntese do ergosterol	Indução de EROs (avaliadas com DCFH-DA) em: <i>C. gattii</i> <i>C. neoformans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i>	Danos ao DNA <sup>B</sup> induzido por EROs; Efeito fungicida associado (dependente de tempo e concentração) <sup>(6),70</sup> ; Indução de apoptose. <sup>35</sup> A elevação de EROs em <i>C. neoformans</i> é controlado pelo sistema antioxidante do fungo.	[4, 27, 54, 62, 66]
ITC/ Azóis		Membranas	Impede a biossíntese do ergosterol	Indução de EROs em: <i>C. gattii</i> ,	Ligeira disfunção mitocondrial, indicando a possível fonte das EROs.	[4]

Tabela 3. (Continuação.)

Antifúngico/ Classe	Estrutura	Alvo primário*	Ação	Indução de EROs/ERNs	Desfecho	Refs.
MN/ Azóis		Membranas	Impede a biossíntese do ergosterol	Indução de EROs (avaliadas com DCFH-DA) em: <i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i> Contra biofilmes de <i>C. albicans</i> , altas doses (>1 mM) de MN induz um padrão funcional bifásico, provavelmente devido à resistência induzida por aumento de defesas antioxidantes.	Indução de EROs com alteração da dinâmica mitocondrial, demonstrando ser esta organela a provável fonte dos oxidantes. Evidências de danos oxidativos ao DNA associados ao efeito antifúngico. Efeito sobre o estresse oxidativo via aumento de $O_2^{\bullet -}$ contra biofilmes de <i>C. albicans</i> .	[10, 19, 67]
Casp/ Equinocandinas		Parede celular	Inibe a síntese de glucano	Indução de EROs em: <i>C. albicans</i> Atividade contra biofilmes a altas concentrações.	EROs originárias no RE. Gera peroxidação lipídica; Intensificação dos danos associados à perda de parede.	[24]
MF/ Equinocandinas		Parede celular	Inibe a síntese de glucano	Indução de EROs em: <i>C. albicans</i>	Sutil elevação de EROs acompanhada de um efeito antifúngico.	[12]

\*DCFH-DA: Não apresenta especificidade, avaliando todas as EROs ( $O_2^{\bullet -}$ ,  $H_2O_2$ , e  $HO^{\bullet}$ ) com variados graus de seletividade; <sup>B</sup>Os danos ao DNA encontrados pode também se correlacionar a uma maior formação de  $HO^{\bullet}$  (como já discutido), desde que os estudos têm encontrado menores concentrações de outras EROs.  
Refs.: Referências. As estruturas químicas representadas foram retiradas do CAS, ou dos artigos aqui referenciados (entre parêntesis) ou desenhadas com auxílio do ACD/Labs (*Advanced Chemistry Development Inc., version 6.0*)

Paralelamente, foi encontrado um aumento na atividade de GPx, Sod e glutathione-S transferase (GST), demonstrando a plausibilidade do incremento de EROs correlacionada ao efeito deste agente antifúngico.

Ainda para o FLC, Yan *et al.* mostraram que existe uma via mitocondrial com uma oxidase alternativa em *C. albicans*, cuja ativação visa a defesa do microrganismo contra os danos oxidativos induzidos por este agente antifúngico, portanto, diminuindo a susceptibilidade de *C. albicans* ao FLC [66]. Em relação aos outros azóis, Thevissen *et al.* [67] mostraram a participação de EROs na ação do MN. Rubio *et al.* relataram possível efeito fungicida do voriconazol associado ao EO [68].

Cabe ressaltar que é atribuído ao FLC, a princípio, uma ação fungistática *in vivo*, contribuindo com diminuição parcial da carga microbiana e consequentemente facilitando a erradicação do foco infeccioso pelo sistema imune do hospedeiro [69, 70]. Contudo, diferentes estudos têm demonstrado que prolongados tratamentos ou altas concentrações ou doses com este azól conduz à atividade fungicida. *In vitro*, foi demonstrado que a diminuição no número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *C. albicans* a partir de 24 horas é crescente e, atinge um ápice em torno de 7 dias de exposição a 1 µg/mL de FLC [69]. *In vivo*, uma dose deste azól de 10 mg/kg/dia por 12 semanas pode erradicar a carga microbiana, comparada ao controle não tratado com FLC [70]. Estes achados são condizentes com danos oxidativos requerendo um mais longo prazo, promovidos por EROs/ERNs, o que, ao menos em parte, poderia explicar este efeito fungicida a longo prazo do FLC.

### **Novos candidatos a agentes antifúngicos com mecanismos de ação que induzem o acúmulo de EROs/ERNs na célula fúngica**

Como observado por Zida *et al.* [71], as pesquisas por novos antifúngicos, principalmente para substâncias com atividade anti-*C. albicans*, cresceram substancialmente desde 1966, pois a resistência fúngica vem crescendo cada vez mais e, se torna um desafio para o tratamento. Em hospitais é vista a necessidade de administração de doses elevadas de antifúngicos, o que aumenta o risco de toxicidade por estes fármacos. Diferentes estudos abordam a problemática que permeia a busca por novos antifúngicos e possíveis soluções para o problema, como a associação sinérgica entre os antifúngicos atuais e novos compostos, principalmente aqueles provenientes de fontes naturais [72-74].

Os compostos de fonte natural (resumidos na tabela 4), inclusive aqueles que já apresentam algum uso na medicina popular, são potenciais candidatos como agente antifúngico (baixas CIMs ou CFMs). Estes compostos apresentam mecanismo de ação, ao menos em parte, relacionados à indução de um EO na célula fúngica, que demonstra ser um novo alvo terapêutico com menores propensões à resistência microbiana.

Como exemplos, o ácido úsnico é um composto de ocorrência natural que tem sido utilizado para uma variedade de finalidades terapêuticas, sendo que, recentemente, seu potencial antifúngico foi reportado (como será discutido na seção perspectivas) [75]. Como outro exemplo, Tian *et al.* [7] demonstraram que um perilaldeído (PAE), proveniente de *Perilla frutescens*, apresentou CIM de 0,4  $\mu\text{L}/\text{mL}$  contra *C. albicans*. O mecanismo de ação antifúngico foi demonstrado ser dependente de uma elevação intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e um acúmulo de EROs, de provável origem mitocondrial. Eventos característicos de apoptose foram observados, como disrupção do potencial de membrana mitocondrial, externalização de fosfatidilserina e desprendimento de citocromo *c*. Ainda, um padrão característico de fragmentação nuclear e danos ao DNA confirmou a indução de apoptose mediada por EO induzido por PAE.

Khan *et al.* [5] demonstraram que o eugenol (CIM<sub>90</sub> = 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), metil eugenol (CIM<sub>90</sub> = 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e estragol (CIM<sub>90</sub> = 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), três fenilpropanóides provenientes de óleos essenciais, causam EO em *C. albicans* (ATCC 90028) culminando em peroxidação lipídica e consequente desarranjo da membrana fúngica com desfecho em morte celular. A peroxidação lipídica aumentou até 4 vezes na presença de concentrações que variaram de 10–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  destes compostos, sendo que a sequência da capacidade oxidante foi: metil eugenol > eugenol > estragol. O incremento nos sistemas de defesa antioxidante de *C. albicans*, como demonstrado pelos autores, foi ineficiente para controlar os danos oxidativos.

De acordo com Wang & Shen [8], o honokiol, um composto isolado de algumas plantas do gênero *Magnolia*, provou exercer ação antifúngica contra *Schizosaccharomyces pombe*, com atividade dependente da concentração (0–8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) e relacionada à produção de EROs. Este estudo também demonstrou que 512 genes são hiperexpressos e 42 hipoexpressos, sendo que, entre os hiperexpressos, 45% pertencem aos sistemas de defesa antioxidante do fungo.

Interessantemente, Liou *et al.* [76] demonstraram que, *in vitro*, concentrações de 0,1–10  $\mu\text{M}$  de honokiol inibiram o *burst* oxidativo de neutrófilos de rato, causando marcante diminuição de EROs induzidas por acetato miristato de forbol (PMA, 20 nM) ou N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP, 1  $\mu\text{M}$ ). Este é um exemplo de efeito contrário a elevação dos níveis de EROs em fagócitos que é atribuído ao honokiol, contrastando com o efeito pró-oxidante (aumentando os níveis de EROs) exercidos na célula fúngica. Esta dualidade na ação deste composto, independente do seu *status* redox, pode ser atribuída, ao menos em parte, as diferentes concentrações usadas nestes estudos. Além disso, foi demonstrado no mesmo estudo que o honokiol (0,1–10  $\mu\text{M}$ ) impede o influxo de cálcio induzido por tapsigargina (um composto que acelera a montagem dos componentes de Nox2), portanto, também se constituindo como uma

**Tabela 4.** Compostos de ocorrência natural com atividade antifúngica e mecanismo de ação dependente do acúmulo de EROs ou ERNs endógenos.

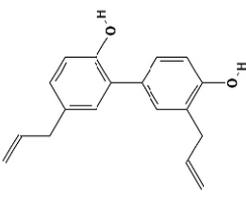
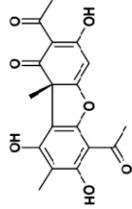
Composto/ Referências	Estrutura	Classe	Fonte	Atividade Antifúngica	Conc. / CIM ou CFMA	Mecanismo de ação	Relevância clínica/ Uso popular ou comércio
Honokiol [8]		Bifenil Neolig- nano	Gênero <i>Magnolia</i>	<i>S. pombe</i>	8 µg/ml	Evidências <i>in vitro</i> para uma dependência de EROs. Evidência de um estresse oxidativo como avaliado por um amplo perfil de expressão gênica dos sistemas antioxidantes no fungo.	Aprovado pelo FDA; Utilizado em xampus, cremes dentais e desodorantes; alta biodisponibilidade; amplo uso na medicina popular, com várias bioatividades descritas (incluindo a antioxidante), com uma complexidade de mecanismos associados, dependentes do modelo experimental de doença; pode ser hepatotóxico (acima de 100 µM)
Ácido úsnico [75]		Derivado Dibenzo- furano	Espécies de <i>Lichens*</i> ; Gênero <i>Usnea</i>	<i>C. albicans</i>	4 µg/ml	Dependente de EROs (avaliadas com NBT ou DCFH-DA) / ERNs (avaliadas com reagente de Griess e NaNO <sub>2</sub> ). Modelo <i>in vitro</i>	Comercializado nos EU como suplemento alimentar (Formulações aprovadas pelo FDA); pode ser hepatotóxico (Ingestão diária de 300–1350 mg por semanas); Gênero <i>Usnea</i> amplamente utilizado na medicina tradicional; Ação do Ácido úsnico sobre biofilmes de <i>C. albicans</i> pré-formado. O ácido úsnico apresenta as atividades antimicrobiana, antiviral, antiprotzoária e antioxidante.

Tabela 4. (Continuação)

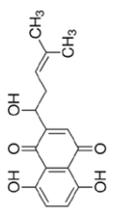
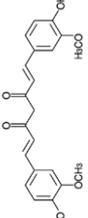
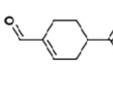
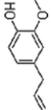
Composto/ Referências	Estrutura	Classe	Fonte	Atividade Antifúngica	Conc. / CIM ou CFMA	Mecanismo de ação	Relevância clínica/ Uso popular ou comércio
Shikonina (SK) [79]		Derivado Naftoquinonico	<i>Alkanna tinctoria</i> ; <i>Lithospermum erythrorhizon</i> Sieb. et Zucc	<i>C. albicans</i>	CIM <sub>80</sub> 4 µg/ml	Evidências <i>in vitro</i> para uma dependência de ERNs (avaliadas com 5 µM da sonda DAF-FM DA); Acúmulo de •NO na célula fúngica correlaciona-se com o efeito antifúngico.	Aprovado pelo FDA. SK induz apoptose via aumento de EROs. Apresenta ação anti-inflamatória (via inibição de proteassomas) e antioxidante; SK pode ser até 16 vezes mais efetivo que o FLC contra isolados de <i>C. albicans</i> resistentes.
Curcumina [9]		Polifenol	<i>Curcuma longa</i> Linn	Espécies de <i>Candida</i> (incluindo isolados clínicos resistentes)	37-370 mg/l	Dependente de EROs totais (avaliadas com DCFH-DA); conduz a apoptose (ação fungicida). Modelo <i>in vivo</i> . Sinergismo com políenos ou azóis promove um efeito fungicida mais intenso via acúmulo de EROs.	Embora haja consumo de <i>C. longa</i> , existem controvérsias sobre o uso deste composto <i>in vivo</i> . Também atua sobre TUP1, paralelamente, inibindo o desenvolvimento de hifas. Diversos estudos em modelos animais. A curcumina é conhecida pelo seu efeito antioxidante.
Perilaldeído [7]		Perilaldeído	Perilla**	<i>C. albicans</i>	0, 4 µl/ml	Dependente de EROs total (avaliados com DCFH-DA); Eleva o Ca <sup>2+</sup> intracelular; Gera apoptose (ação fungicida)	Aprovado pelo FDA; Utilizado em perfumes, adoçante.
Eugenol [5]		Fenilpropanóides	Óleos essenciais de cravo, canela.	<i>C. albicans</i>	500 µg/ml	Dependente de EROs, que gera peroxidação lipídica e morte microbiana (ação fungicida)	Aprovado pelo FDA; composto vastamente usado em odontologia em associação com materiais reparadores. É um antipolimerizante e antioxidante.

Tabela 4. (Continuação)

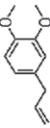
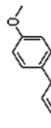
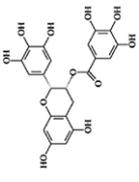
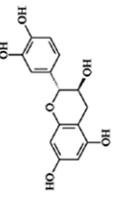
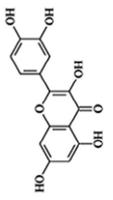
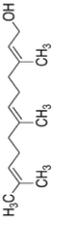
Composto/ Referências	Estrutura	Classe	Fonte	Atividade Antifúngica	Conc. / CIM ou CFMA	Mecanismo de ação	Relevância clínica/ Uso popular ou comércio
Metil-eugenol [5]		Fenilpropanóides	Óleos essenciais de cravo, canela.	<i>C. albicans</i>	350 µg/ml	Dependente de EROs, que gera peroxidação lipídica e morte microbiana (ação fungicida)	Aprovado pelo FDA; composto correlato ao eugenol. É um antipolimerizante e antioxidante.
Estragol [5]		Fenilpropanóides	Óleos essenciais de cravo, canela.	<i>C. albicans</i>	200 µg/ml	Dependente de EROs, que gera peroxidação lipídica e morte microbiana (ação fungicida)	Aprovado pelo FDA; composto correlato ao eugenol. É um antipolimerizante e antioxidante.
Epigallocatequina [54]		Flavonoides	Chás, soja, uva.	<i>C. tropicalis</i>	128 µg/ml	Dependente de EROs (Avaliadas com CM-H2 DCFDA); Ação sinérgica com o FLC e indução de apoptose. Efeito fungicida.	Presente em uma variedade de frutas; amplo uso popular com finalidades medicinais; várias bioatividades (incluindo a antioxidante).
Catequina [54]		Flavonoides	<i>Camellia sinensis</i> , chás, soja, uva.	<i>C. tropicalis</i>	128 µg/ml	Dependente de EROs (Avaliadas com CM-H2 DCFDA); Ação sinérgica com o FLC e indução de apoptose. Efeito fungicida.	Presente em uma variedade de frutas; amplo uso popular com finalidades medicinais; várias bioatividades (incluindo a antioxidante).
Quercetina [54]		Flavonoides	Chás, soja, uva.	<i>C. tropicalis</i>	128 µg/ml	Dependente de EROs (Avaliadas com CM-H2 DCFDA); Ação sinérgica com o FLC e indução de apoptose. Efeito fungicida.	Presente em uma variedade de frutas; amplo uso popular com finalidades medicinais; várias bioatividades (incluindo a antioxidante).
Farnesol [56]		Alcool sesquiterpênico	Óleos essenciais ***	<i>P. expansum</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>A. nidulans</i>	10 – 100 µM	Ação fungicida dependente de EROs; Apoptose devido à interrupção da homeostase redox no fungo.	Importante composto em fungos. Possui ação de geração de antioxidantes (e.g., GSH).

Tabela 4. (Continuação)

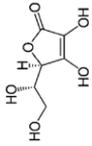
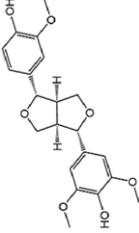
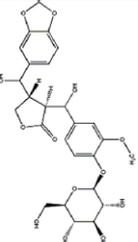
Composto/ Referências	Estrutura	Classe	Fonte	Atividade Antifúngica	Conc./ CIM ou CFMA	Mecanismo de ação	Relevância clínica/ Uso popular ou comércio
Ácido ascórbico [25]			Frutas cítricas (Limão, laranja)	<i>C. albicans</i>	90 mM	EROs (HO• gerados na reação de Fenton e avaliados pela sonda HPF, e <i>status</i> redox verificado por autofluorescência de flavoproteínas e NADH)	A Vitamina C tem amplo uso medicinal. Presente em vários alimentos.
(+)-Medioresinol [38]		Lignano-furofurano	Caula de <i>Sambucus williamsii</i> ; Sementes de abóbora; Famílias: Acanthaceae, Actinidiaceae, Apocynaceae, Celastraceae, Lauraceae, Magnoliaceae, entre outras.	<i>C. albicans</i>	CIM = 25 µg/ml	Aumento de EROs (avaliadas com DHR-123), que é um dos principais fatores de apoptose em fungos, foi também relacionado à ativação da via com marcadores clássicos deste desfecho bioquímico conduzindo ao efeito fungicida associado. EROs associado a danos ao DNA (método do Tunnel) e possível efeito fungicida (apesar de apenas a CIM ter sido investigado). Mitocôndria é a possível fonte de EROs.	<i>S. williamsii</i> é amplamente usada na medicina tradicional.
<i>Styraxjaponoside C</i> [43]		Neolignano glicosídico	Caula de <i>Styrax japonica</i>	<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	CIM = 40 µg/ml	Aumento de EROs (avaliadas com DHR-123) sinaliza para apoptose associado ao efeito fungicida.	Composto identificado recentemente com promissoras bioatividades. É formado enzimaticamente pela dimerização de dois fenilpropanóides.

Tabela 4. (Continuação)

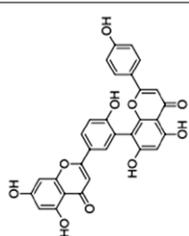
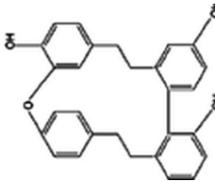
Composto/Referências	Estrutura	Classe	Fonte	Atividade Antifúngica	Conc./CIM ou CFMA	Mecanismo de ação	Relevância clínica/ Uso popular ou comércio
Amentoflavona [42]		Biflavonoides	<i>Selaginella tamariscina</i>	<i>C. albicans</i>	10 µM	A disfunção mitocondrial indica ser esta organela a fonte de EROs totais (avaliadas com DHR-123), que acumulados sinalizam a apoptose via mitocôndrias (com ativação de metacaspase, acúmulo de EROs, externalização de fosfatidilserina e danos ao DNA e fragmentação nuclear). Especificamente, um aumento de radicais hidroxilas (avaliados com a sonda HPF) foi observado, sendo prevenido com toureia.	Normalmente é um antioxidante.
<i>Plagiobin E</i> [40, 41]		Bis (bibenzil) macroclicico	<i>Marchantia polymorpha</i> L. (Marchantiaceae)	<i>C. albicans</i>	CFM = 64 µg/ml CIM = 16 µg/ml (Efeito fungistático)	A disfunção mitocondrial indica ser esta organela a fonte de EROs (avaliadas usando DCFHDA), que acumulados sinalizam a apoptose por uma rota dependente de metacaspase. EROs estavam elevadas em um modo dependente da concentração (8-64 µg/ml).	Diferentes bioatividades são atribuídas ao <i>Plagiobin E</i> , incluindo antioxidante, antibacteriana, antiviral e citotóxica.

Tabela 4. (Continuação)

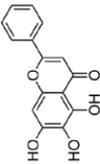
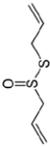
Composto/ Referências	Estrutura	Classe	Fonte	Atividade Antifúngica	Conc. / CIM ou CFMA	Mecanismo de ação	Relevância clínica/ Uso popular ou comércio
Baicaleína [39]		Flavonas	<i>Scutellaria baicalensis</i>	<i>C. albicans</i>	4 µg/ml	Aumento de EROs (avaliadas com DCFH-DA) sinaliza para apoptose associado ao efeito fungicida. Via acionada é independente de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e dependente de outras EROs, visto que baicaleína inibe a apoptose induzida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Disfunção mitocondrial com elevação de EROs.	Amplio uso de <i>S. baicalensis</i> na Medicina tradicional. A classe das flavonas apresenta reconhecidas propriedades antioxidantes.
D-eritro Dihidro- fingosina [37]		Esfingóides (Esfingolipídios)	Espécies de fungos	<i>A. nidulans</i> (incluindo cepas mutantes)	2, 5 µg/ml	Aumento de EROs foi evidenciado pelo tratamento com este esfingóide, mas os oxidantes não sinalizam para apoptose.	Molécula altamente bioativa.
Fitoesfingosina [37]		Esfingóides (Esfingolipídios)	Espécies de fungos	<i>A. nidulans</i> (incluindo cepas mutantes)	2, 5 µg/ml	Aumento de EROs foi evidenciado pelo tratamento com este esfingóide, mas os oxidantes não sinalizam para apoptose.	Molécula altamente bioativa.
Alicina [81]		Dialil tio-sulfinato	Família Alliaceae (Ex. <i>Allium sativum</i> )	<i>C. albicans</i>		Sinergismo com AnB aumenta EROs sinalizando para apoptose associado ao efeito fungicida.	Uso medicinal com diversas propostas.

Tabela 4. (Continuação)

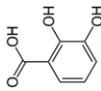
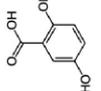
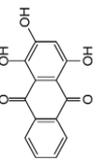
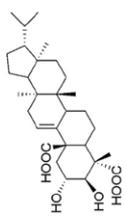
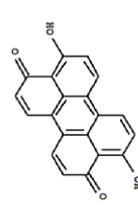
Composto/ Referências	Estrutura	Classe	Fonte	Atividade Antifúngica	Conc. / CIM ou CFMA	Mecanismo de ação	Relevância clínica/ Uso popular ou comércio
2, 3 DHBA [82]		Dihidro-xibenzaldeídos	Óleos voláteis de baunilha e amêndoas.	<i>Candida</i> spp. e <i>C. neoformans</i>	CFM = 6, 4	Depleção dos sistemas de defesa antioxidante conduziu ao ERO, sinalizando para apoptose associado ao efeito fungicida.	Sinergismo com AnB depleta os sistemas de defesa antioxidante, incluindo o tripeptídeo GSH, além de afetar a transcrição de alguns genes: <i>GLR1</i> [GR], <i>YCF1</i> [Glutratona S-conjugado a bomba], <i>TRX2</i> [Tioredoxina], <i>GSH1</i> [g-glutamilmilcisteína sintetase], <i>SOD1D</i> [Sod citosólica], <i>SOD2D</i> [Sod mitocondrial, Mn-Sod], <i>GLR1D</i> [Glutratona reductase].
2, 5 DHBA [82]		Dihidro-xibenzaldeídos	Óleos voláteis de baunilha e amêndoas.	<i>Candida</i> spp. e <i>C. neoformans</i>	CFM <sup>C</sup> = 3, 4 e 6, 4 mM	Depleção dos sistemas de defesa antioxidante conduziu ao ERO, sinalizando para apoptose associado ao efeito fungicida.	
Purpurina [31]		Antraquinonas	<i>Rubia tinctorum</i> L	<i>C. dubliniensis</i> (Biofilmes)	1-10 µg/ml	Aumento de EROs (avaliadas com DCFDA) dependente da concentração e sinaliza para apoptose via acionamento de metacaspases, associado ao efeito antibiofilmes (sobre a formação [preventivo] e sobre biofilmes maduros).	Biofilmes de <i>C. dubliniensis</i> tem sido identificado em fungemias e na superfície de diferentes biomateriais.

Tabela 4. (Continuação)

Composto/ Referências	Estrutura	Classe	Fonte	Atividade Antifúngica	Conc. / CIM ou CFMA	Mecanismo de ação	Relevância clínica/ Uso popular ou comércio
Ácido Retigerico B [72]		Ácido triterpê- nico	Espécies de <i>Lichens</i>	<i>C. albicans</i>	CIM = 8 µg/ml	Acúmulo de EROs (ava- liadas com DCFHDA) na célula fúngica e depen- dente do tempo e concen- tração (4-64 µg/ml), com disfunção mitocondrial (provável fonte das EROs) e diminuição intracelular de cAMP. Danos oxidati- vos atenuados pelo trata- mento com NAC.	
Perilenequi- nonas [74]		Perilene- quinonas	Metabólito secundário de bactérias, fungos endofíticos.	Diferentes fungos		Composto induz EROs, e este aumento é incremen- tado na presença de luz (composto fotossensibili- zante). EROs conduz ao efeito fungicida associado.	

\*Também observado em outras poucas espécies não *Lichens* de ascomicetos

\*\*Família *Lamiaceae*, também encontrado em uma variedade de outras plantas (incluindo óleos essenciais);

\*\*\*Da flor de tília, óleo de grãos de almiscar, óleo de neroli e óleo de petigrain, entre outros.

<sup>A</sup>Na maior parte dos casos, esta é a concentração que induziu EROs/ERNs mais intensamente, em raros casos, os valores foram bem próximos.

<sup>A</sup>Avaliação de um intermediário reativo, o nitrito, uma estimativa da produção de ERNs.  
<sup>C</sup>Composto puro (não na associação).

**Observação:** Notar que alguns indutores de EROs/ERNs na célula fúngica são, na verdade, antioxidantes, sendo que o paradoxo efeito pró-oxidante destes com-  
postos podem estar associados a uma possível pleiotropia (mecanismos de ação paralelos que gerem oxidantes) ou metabolismo/sistemas de regeneração (balanço  
entre as formas oxidadas e reduzidas, *status redox* do sistema biológico) ou uso de altas concentrações (revisado em [25, 55]).  
As estruturas químicas representadas foram retiradas do CAS, ou dos artigos aqui referenciados (entre parêntesis) ou desenhadas com auxílio do ACD/Labs  
(*Advanced Chemistry Development Inc., version 6.0*).

proteção contra o aumento de EROs. Outras bioatividades, para o honokiol, têm sido descritas em concentrações de até 10  $\mu\text{M}$  [77].

Sharma *et al.* [9] demonstraram que curcumina (37-370 mg/L), um polifenol presente em uma variedade de vegetais, apresenta significativa atividade antifúngica (CIMs variando na faixa testada de acordo com o microrganismo) contra espécies do gênero *Candida* (incluindo *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. utilis* e uma variedade de isolados resistentes a alguns antifúngicos e mutantes), cujo o mecanismo de ação dependente de EROs conduz a apoptose. Elevação na expressão dos sistemas de defesa antioxidante foram observados (*CAP1-1*, *CaIPF7817*, *SOD2*, *GRP2* e *CAT1*), embora não efetivos. Os autores concluíram que a curcumina pode gerar EO e causar apoptose na célula fúngica, além de inibir o desenvolvimento de hifas por paralelamente e, independente dos níveis de EROs, atuar sobre TUP1. Cabe ressaltar que, como um antioxidante, o efeito esperado para ação da curcumina seria o oposto, ou seja, a prevenção no aumento de EROs. Contudo, as altas concentrações usadas (efeito dependente da concentração) ou os mecanismos redox e de regeneração (ciclo catalítico) durante a atividade do composto em um contexto biológico, podem gerar um quadro pró-oxidativo, como já discutido anteriormente [55].

Como aqui já discutido, o  $\text{HO}^\bullet$  pode ser formado em fungos via reação de Fenton. Recentemente, Avci *et al.* demonstraram que o tratamento de *C. albicans* com 90 mM de ascorbato pode diminuir a viabilidade celular, através de um efeito pró-oxidante originário exclusivamente na reação de Fenton (promovendo a regeneração do  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , gerando o radical ascorbato, e prorrogando o ciclo, favorecendo a formação de  $\text{HO}^\bullet$  a partir do  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Este efeito é dependente da temperatura, oxigenação, disponibilidade de fontes de energia e condições do meio e fase de crescimento do fungo [25]. O aumento intracelular de  $\text{HO}^\bullet$  causado pelo ascorbato foi correlacionado a atividade fungicida e, não houve influência de um inibidor mitocondrial, a antimicina A (10  $\mu\text{M}$ ), mas sim pelo tratamento com 500  $\mu\text{M}$  de BIP, demonstrando que, neste caso específico, o EO via mitocôndria foi considerado irrelevante para tal atividade. Quanto a este efeito, os autores comentam que, embora a vitamina C seja um antioxidante existe evidências de um provável efeito pró-oxidante nas concentrações farmacológicas (como a usada, 90 mM), fruto da formação de  $\text{HO}^\bullet$ , efeito este referido como de “rebote”, sendo amplamente relatado para as altas doses. Além disso, atuando sobre tal via, o ascorbato pode regenerar o ferro e intensificar a formação de outras EROs (mecanismos de reciclagens que favorecem um efeito pró-oxidativo).

Por outro lado, Goswami *et al.* [60] demonstraram que 10 mM de ácido ascórbico apresenta efeito antioxidante protegendo *Escherichia coli* da ação de oxidantes (EROs totais) induzidos pelo ciprofloxacino, um antibiótico conhecido por gerar quadro de EO no microrganismo como parte de sua letalidade. Além disso, Khalil *et al.* [78] reportaram que em concentrações de no máximo 250 µg/ml, o ácido ascórbico não apresenta atividade antifúngica frente *C. albicans*, mas pode incrementar as atividades antifúngica e antioxidante da curcumina.

Liao *et al.* [79] mostraram que o shikonina (SK), um composto natural que pode ser isolado de *Lithospermum erythrorhizon*, promove intensa formação endógena de •NO em *C. albicans*, de maneira dependente do tempo e concentração, e isto é associado ao efeito antifúngico. A adição de doadores de •NO, como a S-nitrosoglutationa (GSNO) ou L-arginina, pode incrementar a atividade do SK contra *C. albicans*, enquanto, a adição de um inibidor da produção de •NO, o L-NAME, atenuou a ação antifúngica. Como esperado, uma hiperexpressão do gene *YHB1* foi evidenciado em células fúngicas tratadas com SK. Complementando este achado, o mutante nulo *YHB1* (*yhb1Δ/Δ*) exibiu alta sensibilidade ao SK. Os autores sugerem que a ação de SK *in vivo* poderia impulsionar também a ação de fagócitos frente ao fungo, desde que tais células usam a produção de •NO para combater patógenos. Ainda, a utilização de compostos que possam induzir •NO em focos infecciosos demonstra ser uma estratégia promissora na terapêutica, desde que este composto apresenta atividade antimicrobiana também contra o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* spp. [79].

Outros compostos naturais são destacados na tabela 4, como o ácido retigérico B [72] e perilenequinonas [74], que também conduzem ao acúmulo de EROs associado ao efeito fungicida. O (+)-medioresinol [38], o *styraxjaponoside* C [43], a amentoflavona [42], o *plagiochin* E [40, 41], e a purpurina [31] (com destaque para a sua ação anti-biofilme) elevam as concentrações de EROs e sinalizam para apoptose, culminando na atividade antifúngica com marcantes CIMs, sendo que pode ocorrer disfunção mitocondrial em alguns casos.

Com relação à associação sinérgica entre produto natural e antifúngico tradicional, estudos têm demonstrado que a curcumina (composto já discutido aqui [80]), allicina [81] e a baicaleína [39] frente à *C. albicans*, e alguns dihidroxibenzaldeídos (2, 3 DHBA e 2, 5 DHBA) contra *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. [82], podem incrementar o efeito fungicida da AnB via um acúmulo de EROs na célula fúngica. Como aqui já discutido, alguns flavonoides podem incrementar a ação antifúngica do FLC dependente de EROs.

### **Imunomodulação como uma possível ação potencializadora do efeito antifúngico *in vivo***

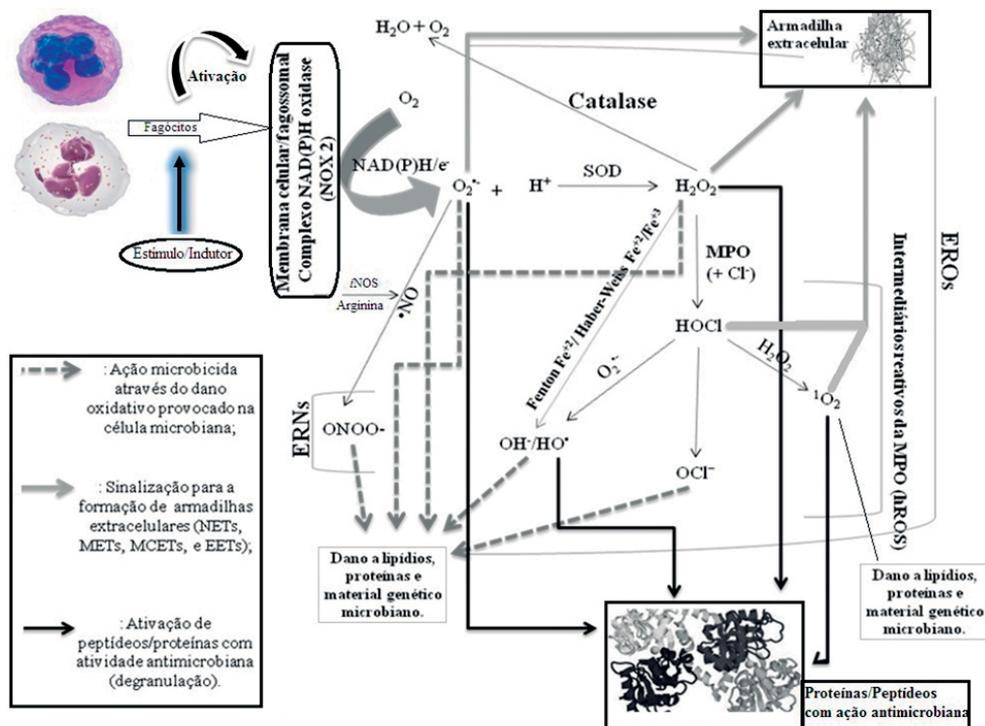
A esta altura, cabe aqui fazer uma clara distinção entre a indução por alguns compostos, da produção exacerbada de EROs/ERNs diretamente na célula fúngica, de uma possível modulação de fagócitos ou outras células, *in vitro* ou *in vivo*, para gerar EROs/ERNs e, conseqüentemente, facilitar a ação fungicida. Neutrófilos, monócitos/macrófagos (MΦ) e outras células fagocíticas geram EROs/ERNs que, em altas concentrações, podem ser tóxicas para maioria dos patógenos fúngicos, causando danos às proteínas, DNA e lipídeos, sendo o complexo enzimático NADPH oxidase (isoforma Nox2) responsável pela produção inicial de  $O_2^{\bullet}$  a partir do  $O_2$  [19, 21, 83].

Diferentes células, incluindo as provenientes de humanos, plantas e fungos, podem aumentar a produção de EROs/ERNs, sob certas circunstâncias, mas o termo *burst* oxidativo (explosão respiratória) é mais bem definido e aplicável ao aumento repentino do consumo de  $O_2$  principalmente por fagócitos (principalmente os neutrófilos, com aumento de até 20 vezes na captação de  $O_2$ ) que não é refletido em produção energética, mas sim na rápida e alta produção de  $O_2^{\bullet}$  pelo sistema Nox 2, quando este complexo enzimático é acionado por estímulos adequados (como os microbianos, químicos ou físicos) e na sequência montado para produzir tal oxidante (figura 7) [84, 85]. Até aqui, nós destacamos que a produção excessiva de EROs/ERNs por indutores, não se relaciona, exceto quando notado, ao *burst* oxidativo, mas sim a específicos contextos que também dependem do balanço entre os oxidantes induzidos e os sistemas de defesa antioxidante na célula fúngica.

Ainda em fagócitos, a partir do  $O_2^{\bullet}$ , são formados intermediários mais reativos, tais como o  $H_2O_2$  e, através da ação da enzima mieloperoxidase (MPO), o  $HO^{\bullet}$ , o ácido hipocloroso (HOCl, gera o ânion hipoclorito [ $OCl^-$ ]) e o oxigênio molecular singleto ( $^1\Delta_g O_2$ ), que, são altamente reativos e potentes antimicrobianos. Ainda, com ativação da enzima óxido nítrico sintetase induzida (*i*NOS) que utiliza a arginina como substrato (e NADPH e  $O_2$ ), o  $\bullet NO$  formado reage rapidamente com  $O_2^{\bullet}$ , originando o ONOO $^-$ , um potente antimicrobiano [86, 87]. A importância do complexo NADPH oxidase e formação de EROs/ERNs na defesa contra fungos é notória, visto que, em pacientes com doença granulomatosa crônica (DGC), uma condição genética que conduz a perda de funcionalidade deste complexo, as infecções por fungos oportunistas são recorrentes e as taxas de mortalidade elevadas [87].

Dante disto, é notório que compostos/outros agentes que possam induzir EROs/ERNs em fagócitos, para uma ação antifúngica, sob certas circunstâncias, também são desejáveis, como visto em prévios estudos. Assim, os agentes indutores de EO devem

ser planejados considerando-se também as ações *in vivo*, com possível acionamento da produção de oxidantes em outras células/alvos, podendo até mesmo, sob algumas circunstâncias, ser considerado um co-efeito desejável para a ação antifúngica.



**Figura 7.** Efeitos da ativação do sistema Nox2 de fagócitos por indutores/estímulos.

**Legenda:** Após ser ativado por um estímulo/indutor apropriado, o sistema Nox2 do fagócito, seja na membrana plasmática (forma oxidantes extracelulares) ou fagossomal (forma oxidantes intracelulares), é montado e gera  $O_2^{\bullet-}$  a partir  $O_2$ . Em seguida, o  $O_2^{\bullet-}$  pode por ação enzimática (via SOD) ou espontaneamente gerar  $H_2O_2$ . Reações subsequentes envolvendo o  $H_2O_2$  conduzem a formação de outras EROs mais potentes ( $HO^{\bullet}$ ,  $OCl^-$ ,  $^1O_2$ ) seja pela ação da MPO ou na reação de Fenton. Ainda, o  $O_2^{\bullet-}$  pode interagir com o  $\bullet NO$  para gerar  $ONOO^{\bullet}$ . Como mostrado na figura, alguns destes oxidantes, formados pelos fagócitos, podem causar danos diretos ao microrganismo (normalmente os mais potentes:  $ONOO^{\bullet}$ ,  $HO^{\bullet}$ ,  $OCl^-$ ,  $^1O_2$ ), acionar proteínas ou peptídeos com ação antimicrobiana (como exemplo, o  $H_2O_2$  que modula alostericamente proteínas ou  $O_2^{\bullet-}$  que promove uma ativação redox de proteínas), ou sinalizar ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OCl^-$ ,  $^1O_2$ ) para o desprendimento de armadilhas extracelulares que podem capturar e matar o microrganismo (estruturas compostas por cromatina condensada e grânulos proteicos com ação antimicrobiana, que são nomeadas de acordo com o fagócito que as formam: armadilhas extracelulares de neutrófilos [NETs], de monócitos/macrófagos [METs], de eosinófilos [EETs] ou de mastócitos [MCETs]).

Como exemplos, não apenas restrito a agentes químicos, além da conhecida direta ação antifúngica da inativação fotodinâmica contra células planctônicas e biofilmes fúngicos gerando EO/EM [26, 88-91], para uma imunomodulação, nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que, sob influência do LASER de baixa potência (laserterapia [LT], comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 660 e 780 nm), neutrófilos aumentam o *burst* oxidativo contra *C. albicans* ou *P. brasiliensis*, conseqüentemente, aumentando a atividade fungicida, sendo a LT considerada uma viável alternativa terapêutica contra as infecções fúngicas superficiais [92]. De relevância clínica, a LT também poderia ser utilizada *in vivo* para a eliminação de biofilmes fúngicos superficiais e, principalmente, em superfícies de dispositivos médicos, tais como cateteres, desde que esta alternativa também é capaz de induzir o aumento de EROs diretamente em fungos.

Quanto aos clássicos agentes antifúngicos, Roilides *et al.* demonstraram que a AnB pode induzir o *burst* oxidativo de neutrófilos, aumentando ainda mais a sua efetividade fungicida *in vivo* contra conídios de *A. fumigatus* [93]. Também, Tohyama *et al.* demonstraram que M $\Phi$  murinos podem aumentar a produção de  $\bullet$ NO, TNF- $\alpha$  e IL-1 sob influência da AnB, dessa forma, incrementando a ação anti-*Cryptococcus* spp. [94]. A combinação de AnB e IFN- $\gamma$  conduz a uma marcante ação anti-*Candida* spp. de M $\Phi$ , mas que pode ser independente de EROs/ERNs, indicando que este agente antifúngico pode também agir através de diferentes vias como um imunomodulador [95]. Estes achados são confirmados pelos estudos de Chapman e Hibbs [96]; Wilson *et al.* [97], que mostraram que a AnB pode se ligar a membrana de fagócitos e provocar mudanças conformacionais do complexo NADPH oxidase e, conseqüente acionamento, por exemplo, reforçando o *burst* oxidativo induzido por PMA, um clássico agente químico ativador deste evento.

Interessantemente, Arana *et al.* [59] encontraram que concentrações subliminares do FLC pode elevar a defesa antioxidante de *C. albicans* (incremento na expressão gênica de *TRR1*, *GRE2* e *YHB1* como uma resposta adaptativa) e, conseqüentemente, favorecer a sobrevivência do fungo (proteção *in vitro*), tendo uma repercussão funcional na interação deste microrganismo frente a fagócitos do hospedeiro humano (provável proteção *in vivo*), no que diz respeito à detoxificação de oxidantes gerados durante o *burst* oxidativo e conseqüente proteção quanto à ação antifúngica destas células. Esta prévia sensibilização, pode gerar um *priming* de mecanismos de defesa antioxidante no fungo.

Contudo, conforme um estudo conduzido por Kos *et al.* [98], *in vivo*, provavelmente, o estresse catiônico promovido por fagócitos pode atuar sinergicamente com o *burst* oxidativo para promover o *killing* de *C. albicans*, como confirmado por análises do perfil de resposta antioxidante deste fungo. Estas análises mostraram que a expressão e acú-

mulo do gene *CAP1* pode ser alterada sob tais condições, portanto, não protegendo o fungo da ação microbicida de EROs. O autor comenta que este mecanismo microbicida combinatório de fagócitos (EO somado ao estresse catiônico), pode ser um efetivo mecanismo de contra-ataque dos fagócitos aos achados de Arana *et al.* [59], que demonstraram a chamada “proteção cruzada contra o EO”, onde uma prévia exposição ao EO (exposição subinibitória) leva a proteção do fungo. Além disso, também evidenciado as diferenças entre *in vitro* e *in vivo*, Hazen *et al.* [99] já haviam relatado que concentrações subinibitórias do FLC, administradas em um longo prazo, podem contribuir com a resistência a candidemia, em que foi avaliada a fagocitose e atividade fungicida (*in vitro*) de neutrófilos isolados de pacientes imunocompetentes e previamente tratados com FLC. Estas divergências entre estudos, quanto ao desfecho clínico, talvez, em parte, possam explicar a controvérsia quanto ao uso profilático de baixas doses do FLC.

### **Resistência frente aos antifúngicos e aumentos em virulência e patogenicidade relacionadas a uma prévia resistência ao estresse oxidativo**

Mundialmente, a resistência aos antifúngicos, somado a um inadequado diagnóstico do agente causal de infecções, são os maiores problemas no tratamento de IFIs, sendo as taxas de mortalidade nestes casos reportadas entre 20 e 90% para patógenos fúngicos oportunistas, incluindo *C. albicans*, *C. neoformans* e *A. fumigatus* [31, 100]. Resistência aos azóis (principalmente FLC) tem sido relatado em cepas de fungos expressando consideráveis concentrações de oxidoredutases, como visto em perfis genômicos, transcriptômicos e metabolômicos (bioquímicos/funcionais), principalmente associados aos genes *GPX1* e *CDR*. Isto reforça que, como parte de seu mecanismo de ação, esta classe de antifúngicos conduz a formação de EROs/ERNs e consequente efeito fungicida. Além disso, cepas resistentes aos antifúngicos expressando altas taxas dos genes *IPF10565*, *ALD5*, *SOD* e *CAT* tem sido reportada [59, 61]. Como já discutido nesta revisão, Paul *et al.* mostraram que resistência em *C. neoformans* ao FLC é correlacionada a hiperexpressão do gene *YAPI* e consequente resistência ao EO promovido por este antifúngico [27].

Como visto aqui, exposição de *C. albicans* a concentrações sub-inibitórias de FLC pode proteger este microrganismo de uma subsequente ação de fagócitos. Este fato relaciona-se ao fato que, FLC a baixas concentrações, induz quadro de EO mais brando na célula fúngica, com posterior sobrevida e montagem adequada de uma resposta antioxidante, primando o fungo e o favorecendo frente à ação de oxidantes gerados pelos fagócitos.

Diante deste contexto, é plausível que cepas de fungos que expressem naturalmente altas concentrações de enzimas com atividade antioxidante possam favorecer o microrganismo

em ambos os contextos, frente à ação de antifúngicos que possam induzir EROs ou ERNs ou frente à resposta microbicida de fagócitos, tendo um notório impacto na virulência e patogenicidade da cepa em questão. Além disso, Navarathna *et al.* demonstraram que concentrações subinibitórias de FLC aumentam a patogenicidade de *C. albicans* em um modelo animal de candidíase disseminada, também evidenciando que os efeitos do FLC são estritamente dependentes da concentração [101].

Em linha com os achados de Arana *et al.* [59], que demonstram que uma proteção cruzada contra o EO, previamente induzido por concentrações subinibitórias de FLC, desfavorecendo o hospedeiro, Kohanski *et al.* [102] já haviam demonstrado que concentrações sub-letais de alguns antibióticos podem elevar os oxidantes em bactérias e dessa forma induzir mutagênese, tendo como consequência, uma resistência a múltiplos antimicrobianos.

Segundo Brown *et al.* [20], em *C. albicans*, a proteína Cta4p é requerida para resistência a ERN, Hog1p, Ssk1p, Sho1p, Capp e Skn7p a ERO e, Pde2p a ERO/ERN. Em *C. neoformans*, Yap4p é relacionada à resistência ao EN, Hog1p, Ssk1p, Tco2p e Atf1p ao EO e, Pkc1p, a ambos EO/EN. Resistência ao EO em *A. fumigatus* é via aumento de Sho1p, SakAp, Skn7p e Yap1p (contra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Alguns mecanismos podem ser considerados paralelos para a defesa do fungo contra EROs/ERNs. Como exemplos, na presença de aumentados níveis de EROs/ERNs, além dos sistemas de defesa antioxidante enzimáticos serem acionados, a autofagia é uma forma do fungo preservar biomoléculas e organelas danificadas pela oxidação, de modo que os lisossomos promovem uma intensa recuperação celular. Aproximadamente 33 genes são relacionados à autofagia (GRAs) em fungos, em resposta ao EO/EN. Este mecanismo de defesa em fungos é semelhante aqueles observados em patologias humanas envolvendo resposta ao EO/EN, como ocorre nas doenças neurodegenerativas [33]. A mitofagia é uma autofagia envolvendo a mitocôndria e tem sido observada em casos de EO com disfunção mitocondrial (em que esta organela é a provável maior fonte de EROs) [33]. Ainda, o fungo pode acionar a via proteolítica do sistema ubiquitina-proteassoma (UPS), visando degradar e remover proteínas oxidadas. Embora este mecanismo seja restrito a proteínas dispersas no citoplasma fúngico, proteínas oxidadas ou desdobradas de origem no RE, podem migrar e sofrer este processo de degradação, inclusive naqueles casos de EO relacionado a esta organela [33].

## Perspectivas

Diante do exposto, é notório que, a indução do EO ou EN, seja diretamente na célula fúngica ou em fagócitos, pode representar um potencial novo alvo terapêutico. Além

disso, este novo mecanismo seria de grande utilidade para conter doenças infecciosas que estão relacionadas à formação de biofilmes, uma vez que a formação de biofilmes por fungos é um sério agravante que dificulta a ação dos antifúngicos, e eleva as taxas de morbimortalidade associadas à doença.

Delattin *et al.* reportaram sobre o mecanismo de ação dos clássicos antifúngicos MN e AnB contra biofilmes por espécies de *Candida* [100]. De nota, a formação de biofilmes por cepas mais virulentas de *C. albicans*, normalmente envolve aumento na capacidade de defesa antioxidante pelo microrganismo. Como revelado por estudos proteômicos conduzidos por Seneviratne *et al.* [102-103] e por Bink *et al.* [104]. Linhares *et al.* [61] encontraram um aumento na defesa antioxidante de *C. albicans* e *C. dubliniensis* resistentes a dois antifúngicos, FLC e AnB. Células destas cepas, em biofilme, demonstraram expressar diferencialmente SOD e catalase em resposta ao EO [61].

Existem diversas variáveis a serem consideradas quando o alvo indução de EO ou EN são levados em conta, além do já mencionado elaborado arsenal de defesa antioxidante lançado pelo fungo. Para Brown *et al.* [20], maior resistência ao EO em espécies de *Candida spp.* (principalmente *C. albicans* e *C. glabrata*) é mais comum *in vitro* na fase estacionária, demonstrando que durante o crescimento o fungo apresenta expressão diferencial de proteínas chave na defesa frente ao EO. Assim, a resistência ao EO é associada à diminuição nas taxas de multiplicação das células fúngicas.

Mesmo neste contexto, as perspectivas são enormes para estes mecanismos. Sendo assim, não apenas restrito a atividade sobre células planctônicas, Peralta *et al.* [75] demonstraram que o ácido úsnico (4 µg/mL), um composto natural que foi obtido de *Usnea amblyoclada*, apresenta ação sobre biofilmes maduros de *C. albicans* resistente aos azóis, diminuindo em até 71% a massa e espessura desta estrutura. Os autores reportaram que este efeito foi relacionado a um prévio EO e EN induzidos pelo ácido úsnico, apresentou aumento de EROs/ERNs até 30 vezes maior que os controles. A respeito do aumento de EROs/ERNs, os autores demonstram que EROs são formados tanto no ambiente extracelular do biofilme (avaliados no sobrenadante com o teste do NBT), quanto intracelularmente em *C. albicans* (avaliados por uma sonda que permeia a membrana e detecta todos os tipos de oxidantes, a DCFH-DA), cogitando que os danos associados aos EO e EN podem comprometer a integridade celular, bem como promover danos a componentes extracelulares essenciais ao biofilme, como os polissacarídeos.

Além disso, Peralta *et al.* [75] demonstraram que os sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos (como exemplo, Sodp) e não enzimáticos de *C. albicans* estavam aumentados em resposta ao tratamento com ácido úsnico, confirmando que houve aumento

de EROs/ERNs. Os autores propõem o ácido úsnico como uma alternativa para o tratamento de infecções as quais ocorrem à formação de biofilmes de *C. albicans*.

Através de estudos transcriptômicos, Cremer *et al.* [105] mostraram os perfis de vários genes relacionados a sistemas antioxidantes em *C. albicans* que são alterados a longo prazo (até 24h) durante a atividade antibiofilme do MN, posteriormente, confirmando que houve um marcante e essencial aumento de  $O_2^{\bullet-}$  correlacionado com a atividade (demonstrado com o uso de compostos sinérgicos para induzir  $O_2^{\bullet-}$ , usando também um mutante triplo para Sodp, ou o inibidor desta enzima, o N-N'-dietilditiocarbamato). Elevados níveis de expressão de genes para mediadores de rotas da biossíntese do ergosterol (*ERG6*, *ERG251*, *ERG3* e *ERG2*) e bombas de efluxo (*CDR2* e *orf19.4531*) foram verificados (expressões gênicas reguladas desde um curto prazo de exposição ao MN, ou seja, a partir de 4 horas). Interessantemente, contrastando com outros achados, após 4 ou 24 horas, a maioria dos genes relacionados ao sistema de defesa antioxidante de *C. albicans* não foram induzidos significativamente (repressão de *CAT1*), o que pode ser explicado por um efeito pleiotrópico deste antifúngico em elevar os níveis de EROs e regular a expressão gênica, culminando em níveis elevados dos oxidantes e reforçando o efeito fungicida (o sistema de defesa antioxidante do fungo também seria um alvo). De nota, apenas *SOD5* foi induzido em *C. albicans*, após 24 horas de exposição ao MN, provavelmente, para conter o marcante acúmulo de  $O_2^{\bullet-}$ .

Como mostrado nesta revisão, o campo de estudo englobando a indução de EO ou EN como um novo alvo na busca por novos antifúngicos tem sido explorado, não apenas restrito a busca de novos compostos de variadas fontes naturais ou sintéticos (estes últimos, fugindo do escopo desta revisão, mas destacado na literatura), mas também tentando elucidar o mecanismo de ação de tradicionais antifúngicos [100, 106, 107]. Desde que a resistência ao EO/EN em fungos também pode ocorrer (vias sistemas de defesa antioxidante), elucidar os mecanismos subjacentes torna-se também essencial. Das aproximadamente 400 espécies fúngicas patogênicas para humanos [20], as dos gêneros *Candida spp.* e *Cryptococcus spp.* foram as mais reportadas nesta revisão.

Como limitações dos estudos avaliados, grande parte destes não avaliaram as específicas fontes de EROs/ERNs dentro da célula fúngica (com exceções) bem como os específicos oxidantes produzidos, discriminando se, estes oxidantes, são gerados pela ação direta dos indutores em tradicionais vias (fontes) endógenas de EROs ou ERNs estão criando fontes, como parte do mecanismo de ação ou metabolismo do composto pelo fungo. Além disso, nós entendemos as limitações metodológicas que permeiam a identificação de oxidantes relacionados aos EO e EN, bem como a ava-

liação de eventos relacionados, como os danos a biomoléculas e o desfecho associado, a ação antifúngica.

Cabe ressaltar que, muitas substâncias naturais reportadas aqui apresenta, normalmente, atividade antioxidante e, o paradoxal efeito pró-oxidante promovido por estes compostos, são frutos de seus ciclos redox ou concentrações no ambiente biológico/celular fúngico, fugindo de o escopo desta revisão acentuar os mecanismos mais detalhados deste efeito pró-oxidante, mas que podem ser revistos em prévios estudos [25, 55, 108]. Existem inúmeras barreiras a serem transpostas entre os estudos *in vitro* e em determinados modelos experimentais *in vivo* e a implementação destes “antioxidantes” na terapêutica de infecções fúngicas em humanos, para que o mecanismo antifúngico em doses compatíveis com os estudos preliminares seja alcançado sem danos ao hospedeiro. Notoriamente, embora seja destacado o efeito pró-oxidante destes compostos para induzir EO/EN na célula fúngica, com concentrações/doses e mecanismos específicos, em humanos, estes compostos poderiam exercer efeito dual de acordo com a especificidade da célula alvo, desde que o ciclo redox destes antioxidantes sofra grandes influências do contexto de cada meio, em que diferentes tipos celulares reagiriam com um dos dois possíveis desfechos: efeito pró-oxidante ou antioxidante. Ainda, um efeito destes antioxidantes a altas concentrações, por si só, poderia levar a um quadro de estresse redutivo, ou induzir uma resposta antioxidante exacerbada do hospedeiro, via o fator de transcrição Nrf2, como tem sido descrito em pacientes com predisposição genética ou sob certas condições [108-111].

Também, a aplicabilidade clínica de certos compostos depende de complexos fatores *in vivo*, como os fatores farmacocinéticos, e de outros fatores que envolvem co-resposta dos fungos aos outros tipos de estresses *in vivo* (perfil funcional de resistência cruzada), como as alterações de pH, temperatura, osmolaridade, pressão e, principalmente, disponibilidade de fontes de O<sub>2</sub> e de nitrogênio. Estudos destes compostos em modelos experimentais mais fidedignos, *in vivo*, podem lançar luz sobre a possível ação antifúngica envolvendo um EO ou EN neste contexto, desde que não haja extensão dos danos ao hospedeiro. Além disso, os desafios que normalmente são encontrados para a implementação na terapêutica de um novo composto de fonte natural devem ser superados [112].

A literatura é divergente sobre os efeitos de EROs/ERNs e os EO/EN associados serem microbiostáticos ou microbicidas [113]. Independente do efeito, a participação de oxidantes no mecanismo de ação de determinado antifúngico não é descartada, e efeito clínico associado, fungistático ou fungicida, parece ser mais bem entendido tendo como base os dados apresentados na figura 4. Desde que um EO/EN com sutis aumentos de EROs/ERNs induzem uma morte celular mais branda (como exemplo, a apoptose),

o efeito *in vivo*, em curtos intervalos de administração do antifúngico, mais provavelmente seria fungistático. Por outro lado, na indução de um EO/EN mais intenso, com elevados níveis de oxidantes, o desfecho clínico mais provável seria uma ação fungicida, mesmo nas primeiras horas de administração do agente terapêutico.

Por fim, para aqueles antimicrobianos que utilizam a produção de EROs/ERNs durante seu mecanismo de ação, destaca-se que doses subinibitórias (sub-letais) de antimicrobianos podem elevar, paralelamente a outros efeitos, a resposta antioxidante do microrganismo previamente exposto. Isto poderia diminuir ou tornar ineficaz a atividade antimicrobiana em uma utilização futura do antimicrobiano (mesmo que em doses recomendadas), uma vez que o prévio *priming* (causado pela dose sub-letal) elevaria a resposta antioxidante do microrganismo para a detoxificação das ERO/ERN [114-119].

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após estabelecer um claro conceito de estresse oxidativo e nitrosativo, bem como examinar as metodologias quanto à adequação para avaliar tal evento bioquímico, foi demonstrado nesta revisão sistemática que um considerável número de publicações aborda os temas “indução de EO ou EN como parte do mecanismo antifúngico”. Os argumentos para comprovar a participação de EROs ou ERNs na atividade antifúngica incluem: quantificação destes oxidantes, análises de sistemas de defesa antioxidante do fungo, aferições dos danos a biomoléculas causadas por EROs/ERNs, além do uso de antioxidantes exógenos atuando como *scavengers* de oxidantes para impedir o EO/EN e danos oxidativos associados.

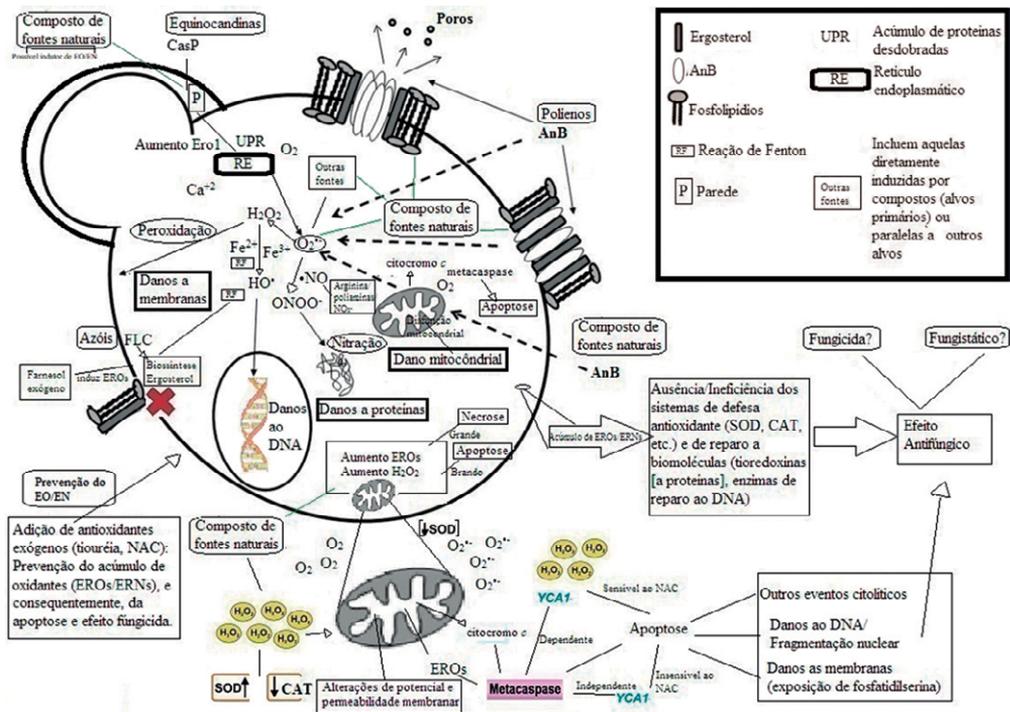
A questão se EROs/ERNs geram efeito fungicida preferencialmente que o fungistático ainda está aberta, em um contexto em que estes oxidantes também podem paralelamente sinalizar eventos apoptóticos por diferentes vias (dependentes ou não de caspases). A sinalização de apoptose pode estar também relacionada à específica fonte de EROs estimulada pelo indutor, que determinara o acionamento de vias paralelas devido a um ou mais oxidantes específicos serem produzidos e, em concentrações apropriadas (como exemplo, o  $H_2O_2$  é um bom indutor de apoptose). O *link* entre indução de EROs mitocondrial e o controle do balanço redox para a produção de  $H_2O_2$  parece ser fundamental para a ativação do apoptose via mitocondrial (interação citocromo *c* e metacaspase).

Um claro *link* entre estresse oxidativo ou nitrosativo e a atividade antifúngica (com marcantes e promissoras CIMs ou CFMs) tem sido firmado na literatura recente, tanto para aqueles agentes antifúngicos já utilizados na prática clínica para o tratamento de infecções fúngicas em humanos, quanto para possíveis candidatos a fármaco (resumido na figura 8). Portanto, a indução do EO ou EN como parte do mecanismo de ação demonstra ser importante alvo terapêutico, com perspectivas favoráveis sobre os desfechos na prática clínica. Contudo novos estudos (incluindo os metabolômicos) devem ser conduzidos para um melhor entendimento a nível molecular do efeito global deste evento na célula fúngica, bem como as possíveis repercussões para o hospedeiro.

Muitas publicações (22 artigos) encontradas nesta revisão destacaram o *link* entre o aumento de EROs/ERNs associado ao efeito de clássicos antifúngicos, o que demonstra uma preocupação em elucidar o completo mecanismo de ação destes agentes terapêuticos, na tentativa de também entender melhor como a resistência a estes antifúngicos são alcançadas por parte dos fungos. Assim, a possível associação sinérgica entre compostos de origem natural e clássicos antifúngicos tem sido avaliada.

Quanto aos compostos de fontes naturais induzindo EROs/ERNs como parte de seus mecanismos antifúngicos (32 artigos encontrados) contra células planctônicas ou biofilmes, aqueles provenientes de plantas foram os mais frequentes. Normalmente, a maiorias deles são antioxidantes (principalmente os flavonoides), mas por conta das concentrações utilizadas ou o ciclo redox dentro da célula fúngica, estes compostos demonstraram exercer também, um efeito majoritariamente pró-oxidante, elevando as concentrações de EROs ou ERNs e causando o efeito antifúngico. Ainda, muitos indutores de EO é da classe dos lignanos (incluindo neolignanos) e correlatos (os fenilpropanóides), demonstrando um papel importante desta classe na sinalização de um acúmulo de EROs em fungos.

Novos estudos na busca de agentes antifúngicos explorando o *status* redox devem também focar sobre a especificidade da indução de um EO ou EN contra o fungo e os possíveis efeitos tóxicos para humanos, advindos deste evento bioquímico. Neste contexto, a busca por compostos provenientes de fontes naturais parece plausível, visto que metabólitos secundários são naturais mecanismos de defesa, apresentando, normalmente, uma ação antifúngica, que pode ser via aumento de EROs/ERNs, mas sem causar danos ao hospedeiro e, entender os mecanismos dos EO e EN em fungos pode também ser útil para a formulação de novas combinações terapêuticas entre produtos naturais e antifúngicos clássicos, atuando de maneira sinérgica.



**Figura 8.** Representação esquemática das possíveis rotas de formação das EROs/ERNs na célula fúngica induzidas por clássicos agentes antifúngicos ou novos compostos.

**Legenda:** Após as EROs/ERNs serem formadas, os sistemas de defesa antioxidante serão acionados. Uma ausência ou ineficiência desta defesa promoverá o quadro de EO ou EN, que pode acionar diferentes rotas de ativação de apoptose ou levar a danos oxidativos a biomoléculas, incluindo os danos oxidativos do DNA (especialmente por HO<sup>•</sup>), nitração proteica (por ONOO<sup>-</sup>) e a peroxidação lipídica (induzida principalmente pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). As interações entre os oxidantes com geração de produtos, podem não aparecer balanceadas nesta figura.

## AGRADECIMENTOS

CDC gostaria de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## CONFLITO DE INTERESSES

Os autores não relatam nenhum conflito de interesse com indústrias, empresas ou órgãos de fomentos.

## REFERÊNCIAS

1. R. Santamaría, L. Rizzetto, M. Bromley, *et al.*, Systems biology of infectious diseases: a focus on fungal infections, *Immunobiology*, **216**, 1212 (2011).
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), *Antibiotic Resistant Threats in the United States*, 2013, p. 114 p., 2013.
3. P. Vandeputte, S. Ferrari, A.T. Coste, Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections, *Int. J. Microbiol.*, **2012**, 26 (2012).
4. G.F. Ferreira, L.M. Baltazar, J.R.A. Santos, *et al.*, The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*, *J. Antimicrob. Chemother.*, **68**, 1801 (2013).
5. A. Khan, A. Ahmad, F. Akhtar, *et al.*, Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids, *FEMS Yeast Res.*, **11**, 114 (2011).
6. C.D. Mahl, C.S. Behling, F.S. Hackenhaar, *et al.*, Induction of ROS generation by fluconazole in *Candida glabrata*: activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **82**, 203 (2015).
7. H. Tian, S. Qu, Y. Wang, *et al.*, Calcium and oxidative stress mediate perillaldehyde-induced apoptosis in *Candida albicans*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **101**, 3335 (2017).
8. Z. Wang, Y. Shen, Antifungal compound honokiol triggers oxidative stress responsive signalling pathway and modulates central carbon metabolism, *Mycology*, **7**, 124 (2016).
9. M. Sharma, R. Manoharlal, N. Puri, *et al.*, Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in *Candida albicans*, *Biosci. Rep.*, **30**, 391 (2010).

10. D. Kobayashi, K. Kondo, N. Uehara, *et al.*, Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 3113 (2002).
11. A.C. Mesa-Arango, L. Scorzoni, O. Zaragoza, It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug, *Front. Microbiol.*, **3**, 1 (2012).
12. J.P. Guirao-Abad, R. Sánchez-Fresneda, B. Albuquerque, *et al.*, ROS formation is a differential contributory factor to the fungicidal action of Amphotericin B and Micafungin in *Candida albicans*, *Int. J. Med. Microbiol.*, **307**, 241 (2017).
13. A.J. Philips, I. Sudbery, M. Ramsdale, Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14327 (2003).
14. M.P. Brynildsen, J.A. Winkler, C.S. Spina, *et al.*, Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production, *Nature Biotechnol.*, **31**, 160 (2013).
15. I. Albesa, M.C. Becerra, P.C. Battan, *et al.*, Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, 605 (2004).
16. I. Keren, Y. Wu, J. Inocencio, *et al.*, Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species, *Science*, **339**, 1213 (2013).
17. Y. Liu, J.A. Imlay, Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species, *Science*, **339**, 1210 (2013).
18. D.J. Dwyer, P.A. Belenky, J.H. Yang, *et al.*, Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E2100 (2014).
19. P. Belenky, D. Camacho, J. J. Collins, Fungicidal drugs induce a common oxidative damage cellular death pathway, *Cell Reports*, **3**, 350 (2013).
20. A.J.P. Brown, K. Haynes, J. Quinn, Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity, *Curr. Opin. Microbiol.*, **12**, 384 (2009).
21. H. Sies, Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine, *Redox Biol.*, **4**, 180 (2015).

22. B.S. Hromatka, S.M. Noble, A.D. Johnson, Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence, *Mol. Biol. Cell*, **16**, 4814 (2005).
23. D. Cánovas, J.F. Marcos, J. Strauss. Nitric oxide in fungi: is there NO light at the end of the tunnel?, *Curr. Genet.*, **62**, 513 (2016).
24. Q. Yu, B. Zhang, J. Li, *et al.*, Endoplasmic reticulum-derived reactive oxygen species (ROS) is involved in toxicity of cell wall stress to *Candida albicans*, *Free Rad. Biol. Med.*, **99**, 572 (2016).
25. P. Avci, F. Freire, A. Banvolgyi, *et al.*, Sodium ascorbate kills *Candida albicans in vitro* via iron-catalyzed Fenton reaction: importance of oxygenation and metabolism, *Future Microbiol.*, **11**, 1535 (2016).
26. J. H. Lee, I. Y. Choi, I. S. Kil, *et al.*, Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast, *Biochim. Biophys. Acta*, **1526**, 191 (2001).
27. S. Paul, T.L. Doering, W.S. Moye-Rowley, *Cryptococcus neoformans* Yap1 is required for normal fluconazole and oxidative stress resistance, *Fungal Genet. Biol.*, **74**, 1 (2015).
28. T. Rossignol, B. Kocsis, O. Bouquet, *et al.*, Antifungal activity of fused Mannich ketones triggers an oxidative stress response and is Cap1-dependent in *Candida albicans*, *PLoS ONE*, **8**, e62142 (2013).
29. G. Bartosz, Reactive oxygen species: destroyers or messengers?, *Biochem. Pharmacol.*, **77**, 1303 (2009).
30. M. Ramsdale. Programmed cell death in pathogenic fungi, *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 1369 (2008).
31. P.W-K. Tsang, A.P-K. Wong, H-P. Yang, *et al.*, Purpurin triggers caspase-independent apoptosis in *Candida dubliniensis* biofilms, *PLoS ONE*, **8**, e86032 (2013).
32. A. Hamann, D. Brust, H.D. Osiewacz, Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing, *Trends Microbiol.*, **6**, 276 (2008).
33. G. Farrugia, R. Balzan, Oxidative stress and programmed cell death in yeast, *Frontiers*, **2**, 1 (2012).
34. A. Sharon, A. Finkelstein, N. Shlezinger, *et al.*, Fungal apoptosis: function, genes and gene function, *FEMS Microbiol. Rev.*, **33**, 833 (2009).

35. S.A. Mousavi, G.D. Robson, Oxidative and amphotericin B-mediated cell death in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* is associated with an apoptotic-like phenotype, *Microbiology*, **150**, 1937 (2004).
36. K. Kang, K.S. Wong, W.P. Fong, *et al.*, Metergoline-induced cell death in *Candida krusei*, *Fungal Biol.*, **115**, 302 (2011).
37. J. Cheng, T.S. Park, L.C. Chio, *et al.*, Induction of apoptosis by sphingoid long-chain bases in *Aspergillus nidulans*, *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 163 (2003).
38. J.H. Hwang, I.S. Hwang, Q.H. Liu, *et al.*, (+)-medioresinol leads to intracellular ROS accumulation and mitochondria-mediated apoptotic cell death in *Candida albicans*, *Biochimie*, **94**, 1784 (2012).
39. B.D. Dai, Y.Y. Cao, S. Huang, *et al.*, Baicalein induces programmed cell death in *Candida albicans*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 803 (2009).
40. X.Z. Wu, W.Q. Chang, A.X. Cheng, *et al.*, Plagiochin E, an antifungal active macrocyclic bis(bibenzyl), induced apoptosis in *Candida albicans* through a metacaspase-dependent apoptotic pathway, *Biochim. Biophys. Acta*, **1800**, 439 (2010).
41. X.Z. Wu, A.X. Cheng, L.M. Sun, *et al.*, Plagiochin E, an antifungal bis(bibenzyl), exerts its antifungal activity through mitochondrial dysfunction-induced reactive oxygen species accumulation in *Candida albicans*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1790**, 770 (2009).
42. I.S. Hwang, J. Lee, H.G. Jin, *et al.*, Amentoflavone stimulates mitochondrial dysfunction and induces apoptotic cell death in *Candida albicans*, *Mycopathologia*, **173**, 207 (2012).
43. C. Park, E.R. Woo, D.G. Lee, Antifungal effect with apoptotic mechanism(s) of Styraejasponoside C, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 1255 (2009).
44. A.M. Aerts, D. Carmona-Gutierrez, S. Lefevre, *et al.*, The antifungal plant defensin RsAFP2 from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*, *FEBS Lett.*, **583**, 2513 (2009).
45. E.O. Mello, S.F. Ribeiro, A.O. Carvalho *et al.*, Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells, *Curr. Microbiol.*, **62**, 1209 (2011).

46. B. Hwang, J.S. Hwang, J. Lee, *et al.*, The antimicrobial peptide, psacothasin induces reactive oxygen species and triggers apoptosis in *Candida albicans*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **405**, 267 (2011).
47. J. Cho, D.G. Lee. The antimicrobial peptide arenicin-1 promotes generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1810**, 1246 (2011).
48. J. Cho, D.G. Lee. Oxidative stress by antimicrobial peptide pleurocidin triggers apoptosis in *Candida albicans*, *Biochimie*, **93**, 1873 (2011).
49. B. Hwang, J.S. Hwang, J. Lee, *et al.*, Induction of yeast apoptosis by an antimicrobial peptide, Papiliocin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **408**, 89 (2011).
50. C. Park, D.G. Lee, Melittin induces apoptotic features in *Candida albicans*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **394**, 170 (2010).
51. A. Lupetti, A. Paulusma-Annema, S. Senesi, *et al.*, Internal thiols and reactive oxygen species in candidacidal activity exerted by an N-terminal peptide of human lactoferrin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 1634 (2002).
52. E.J. Helmerhorst, R.F. Troxler, F.G. Oppenheim, The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14637 (2001).
53. D. Wunder, J. Dong, D. Baev, *et al.*, Human salivary histatin 5 fungicidal action does not induce programmed cell death pathways in *Candida albicans*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 110 (2004).
54. C.R. Silva, J.B.A. Neto, R.S. Campos, *et al.*, Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**, 1468 (2015).
55. I.D. Podmore, H. R. Griffiths, K.E. Herbert, *et al.*, Vitamin C exhibits pro-oxidant properties, *Nature*, **392**, 559 (1998).
56. P. Liu, L. Luo, J. Guo, *et al.*, Farnesol induces apoptosis and oxidative stress in the fungal pathogen *Penicillium expansum*, *Mycologia*, **102**, 311 (2010).
57. Q. Gaofua, Z. Fayin, D. Peng, *et al.*, Lipopeptide induces apoptosis in fungal cells by a mitochondria-dependent pathway, *Peptides*, **31**, 1978 (2010).

58. I.K. Maurya, S. Pathak, M. Sharma, *et al.*, Antifungal activity of novel synthetic peptides by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of cell wall against *Candida albicans*, *Peptides*, **32**, 1732 (2011).
59. D.M. Arana, C. Nombela, J. Pla, Fluconazole at subinhibitory concentrations induces the oxidative- and nitrosative-responsive genes TRR1, GRE2 and YHB1, and enhances the resistance of *Candida albicans* to phagocytes, *J. Antimicrob. Chemother.*, **65**, 54 (2010).
60. M. Goswami, S.H. Mangoli, N. Jawali, Antibiotics and antioxidants: Friends or foes during therapy?, *Barc. Newsletter*, **323**, 42 (2011).
61. C.E.B. Linhares, S.R. Giacomelli, D. Altenhofen, *et al.*, Fluconazole and amphotericin-B resistance are associated with increased catalase and superoxide dismutase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **46**, 752 (2013).
62. Y. Xu, Y. Wang, L. Yan, *et al.*, Proteomic analysis reveals a synergistic mechanism of fluconazole and berberine against fluconazole-resistant *Candida albicans*, *J. Proteome Res.*, **8**, 5296 (2009).
63. M.L. Sokol-Anderson, J. Brajtburg, G. Medoff, Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*, *J. Infect. Dis.*, **154**, 76 (1986).
64. F. Sangalli-Leite, L. Scorzoni, A.C. Mesa-Arango, *et al.*, Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst, *Microbes Infect.*, **13**, 457 (2011).
65. B. Hao, S. Cheng, C.J. Clancy, *et al.*, Caspofungin kills *Candida albicans* by causing both cellular apoptosis and necrosis, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 326 (2013).
66. L. Yan, M. Li, Y. Cao, *et al.*, The alternative oxidase of *Candida albicans* causes reduced fluconazole susceptibility, *J. Antimicrob. Chemother.*, **64**, 764 (2009).
67. K. Thevissen, K.R. Ayscough, A.M. Aerts, *et al.*, Miconazole induces changes in actin cytoskeleton prior to reactive oxygen species induction in yeast, *J. Biol. Chem.*, **282**, 21592 (2007).
68. M.C. Rubio, I.R. de Ocariz, J. Gil, *et al.*, Potential fungicidal effect of voriconazole against *Candida* spp., *Int. J. Antimicrob. Agents*, **25**, 264 (2005).

69. P.G. Sohnle, B.L. Hahn, M.D. Erdmann, Effect of fluconazole on viability of *Candida albicans* over extended periods of time, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 2622 (1996).
70. P.G. Sohnle, B.L. Hahn, Effect of prolonged fluconazole treatment on *Candida albicans* in diffusion chambers implanted into mice, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 3175 (2002).
71. A. Zida, S. Bamba, A. Yacouba, *et al.*, Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review, *J. Med. Mycology*, **27**, 1 (2017).
72. W-Q. Chang, X-Z. Wu, A-X. Cheng, *et al.*, Retigeric acid B exerts antifungal effect through enhanced reactive oxygen species and decreased cAMP, *Biochim. Biophys. Acta*, **1810**, 569 (2011).
73. A. Ostrosky-Zeichner, A. Casadevall, J.N. Galgiani, *et al.*, An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond, *Nature Rev. Drug Discovery*, **9**, 719 (2010).
74. M-Z. Xing, X-Z. Zhang, Z-L. Sun, *et al.*, Perylenequinones act as broad-spectrum fungicides by generation reactive oxygen species both in the dark and in the light, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7722 (2003).
75. M.A. Peralta, M.A. da Silva, M.A. Ortega, *et al.*, Usnic acid activity on oxidative and nitrosative stress of azole-resistant *Candida albicans* Biofilm, *Planta Med.*, **83**, 326 (2017).
76. K-T. Liou, Y-C. Shen, C-F. Chen, *et al.*, Honokiol protects rat brain from focal cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting neutrophil infiltration and reactive oxygen species production, *Brain Res.*, **992**, 159 (2003).
77. Y. Fukuyama, K. Nakade, Y. Minoshima, *et al.*, Neurotrophic activity of honokiol on the cultures of fetal rat cortical neurons, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 1163 (2002).
78. O.A.K. Khalil, O.M.M. de Faria Oliveira, J.C.R. Velloso, *et al.*, Curcumin antifungal and antioxidant activities are increased in the presence of ascorbic acid, *Food Chem.*, **133**, 1001 (2012).
79. Z. Liao, Y. Yan, H. Dong, *et al.*, Endogenous nitric oxide accumulation is involved in the antifungal activity of Shikonin against *Candida albicans*, *Emerg. Microb. Infections*, **5**, e88 (2016).

80. M. Sharma, R. Manoharlal, A.S. Negi, *et al.*, Synergistic anticandidal activity of pure polyphenol curcumin I in combination with azoles and polyenes generates reactive oxygen species leading to apoptosis, *FEMS Yeast Res.*, **10**, 570 (2010).
81. M. An, H. Shen, Y. Cao, *et al.*, Allicin enhances the oxidative damage effect of amphotericin B against *Candida albicans*, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **33**, 258 (2009).
82. J.H. Kim, N.C. Faria, M.L. Martins, *et al.*, Enhancement of antimycotic activity of amphotericin B by targeting the oxidative stress response of *Candida* and *Cryptococcus* with natural dihydroxybenzaldehydes, *Front. Microbiol.*, **3**, 261 (2012).
83. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, 4th edition, Oxford University Press Inc., New York (NY), 2007.
84. P. Wojtaszek, Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection, *Biochem. J.*, **322**, 681 (1997).
85. C. Bogdan, M. Röllinghoff, A. Diefenbach, Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity, *Curr. Opin. Immunol.*, **12**, 64 (2000).
86. K-W. Wong, Jr W. R. Jacobs, *Mycobacterium tuberculosis* exploits human interferon  $\gamma$  to stimulate macrophage extracellular trap formation and necrosis, *J. Infect. Dis.*, **208**, 109 (2013).
87. M.S. Cohen, R.E. Isturiz, H.L. Malech, *et al.*, Fungal infection in chronic granulomatous disease. The importance of the phagocyte in defense against fungi, *Am. J. Med.*, **71**, 59 (1981).
88. Y. Sun, S. Yu, P. Sun, *et al.*, Inactivation of *Candida* biofilms by nonthermal plasma and its enhancement for fungistatic effect of antifungal drugs, *PLoS ONE*, **7**, e40629 (2012).
89. K. Fricke, I. Koban, H. Tresp, *et al.*, Atmospheric pressure plasma. a high-performance tool for the efficient removal of biofilms, *PLoS ONE*, **7**, e42539 (2012).
90. M.C. Andrade, A.P. Ribeiro, L.N. Dovigo, *et al.*, Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp., *Arch. Oral Biol.*, **58**, 200 (2013).

91. L.N. Dovigo, A.C. Pavarina, J.C. Carmello, *et al.*, Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin, *Lasers Surg. Med.*, **43**, 927 (2011).
92. C.D. Cerdeira, M.R.P.L. Brigagão, M.L. Carli, *et al.*, Low-level laser therapy stimulates the oxidative burst in human neutrophils and increases their fungicidal capacity, *J. Biophotonics*, **9**, 1180 (2016).
93. E. Roilides, C.A. Lyman, J. Filioti, *et al.*, Amphotericin B formulations exert additive antifungal activity in combination with pulmonary alveolar macrophages and poly-morphonuclear leukocytes against *Aspergillus fumigatus*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 1974 (2002).
94. M. Tohyama, K. Kawakami, A. Saito, Anticryptococcal effect of amphotericin B is mediated through macrophage production of nitric oxide, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 1919 (1996).
95. A. Coste, M.D. Linas, S. Cassaing, *et al.*, A sub-inhibitory concentration of amphotericin B enhances candidastatic activity of interferon-gamma- and interleukin-13-treated murine peritoneal macrophages, *J. Antimicrob. Chemother.*, **49**, 731 (2002).
96. H.A. Chapman, Jr., J.B. Hibbs, Jr., Modulation of macrophage tumoricidal capability by polyene antibiotics: support for membrane lipid as a regulatory determinant of macrophage function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4349 (1978).
97. E. Wilson, L. Thorson, D.P. Speert, Enhancement of macrophage superoxide anion production by amphotericin B, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 796 (1991).
98. I. Kos, M.J. Patterson, S. Znaidi, *et al.*, Mechanisms underlying the delayed activation of the Cap1 transcription factor in *Candida albicans* following combinatorial oxidative and cationic stress important for phagocytic potency, *mBio.*, **7**, e00331-16 (2016).
99. K.C. Hazen, G. Mandell, E. Coleman, *et al.*, Influence of fuconazole at subinhibitory concentrations on cell surface hydrophobicity and phagocytosis of *Candida albicans*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **183**, 89 (2000).
100. N. Delattin, B. Cammue, K. Thevissen, Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms, *Future Med. Chem.*, **6**, 77 (2014).

101. D.H. Navarathna, J.M. Hornby, N. Hoerrmann, *et al.*, Enhanced pathogenicity of *Candida albicans* pre-treated with subinhibitory concentrations of fluconazole in a mouse model of disseminated candidiasis, *J. Antimicrob. Chemother.*, **56**, 1156 (2005).
102. M.A. Kohanski, M.A. DePristo, J.J. Collins, Sub-lethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis, *Mol. Cell*, **37**, 311 (2010).
103. C.J. Seneviratne, Y. Wang, L. Jin, *et al.*, *Candida albicans* biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities, *Proteomics*, **8**, 2936 (2008).
104. A. Bink, G. Govaert, D. Vandenbosch, *et al.*, Transcription factor Efg1 contributes to the tolerance of *Candida albicans* biofilms against antifungal agents *in vitro* and *in vivo*, *J. Med. Microbiol.*, **61**, 813 (2012).
105. K. Cremer, K. Brucker, I. Staes, *et al.*, Stimulation of superoxide production increases fungicidal action of miconazole against *Candida albicans* biofilms, *Sci. Reports*, **6**, 27463 (2016).
106. I. E. François, K. Thevissen, K. Pellens, *et al.*, Design and synthesis of a series of piperazine-1-carboxamide derivatives with antifungal activity resulting from accumulation of endogenous reactive oxygen species, *Chem. Med. Chem.*, **4**, 1714 (2009).
107. A. Shirai, S. Ueta, H. Maseda, *et al.*, Action of reactive oxygen species in the antifungal mechanism of Gemini-pyridinium salts against yeast, *Biocontrol Sci.*, **17**, 77 (2012).
108. J.D. Lambert, R.J. Elias, The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention, *Arch. Biochem. Biophys.*, **501**, 65 (2010).
109. A.J. León-González, C. Auger, V.B. Schini-Kerth, Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy, *Biochem. Pharmacol.*, **98**, 371 (2015).
110. M. Narasimhan, N.S. Rajasekaran, Reductive potential—A savior turns stressor in protein aggregation cardiomyopathy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1852**, 53 (2015).
111. A.C. Brewer, S.B. Mustafi, T.V.A. Murray, *et al.*, Reductive Stress Linked to Small HSPs, G6PD, and Nrf2 Pathways in Heart Disease, *Antioxid. Redox Signal.*, **18**, 1114 (2013).

112. T. Roemer, D. Xu, S.B. Singh, *et al.*, Confronting the challenges of natural product-based antifungal discovery, *Chem. Biol.*, **18**, 148 (2011).
113. J.A. Imlay. Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think, *Curr. Opin. Microbiol.*, **24**, 124 (2015).
114. G.Q. Li, F. Quan, T. Qu, *et al.*, Sublethal vancomycin-induced ROS mediating antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*, *Biosci. Rep.*, **35**, e00279 (2015).
115. K. Poole, Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria, *Trends Microbiol.*, **20**, 227 (2012).
116. Y. Wu, M. Vulic, I. Keren, *et al.*, Role of oxidative stress in persister tolerance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**, 4922 (2012).
117. M.A. Kohanski, M.A. DePristo, J.J. Collins, Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis, *Mol. Cell*, **37**, 311 (2010).
118. J. Jee, A. Rasouly, I. Shamovsky, *et al.*, Rates and mechanisms of bacterial mutagenesis from maximum-depth sequencing, *Nature*, **534**, 693 (2016).
119. W.L. Neeley, J.M. Essigmann, Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products, *Chem. Res. Toxicol.*, **19**, 491 (2006).

## COMO CITAR ESTE ARTIGO

C.D. Cerdeira, M. Pereira de Araújo, C.B.R. Jorge-Ferreira, A.L. Tranches-Dias, M.R.P. Lima-Brigagão, explorando os estresses oxidativo e nitrosativo contra fungos: um mecanismo subjacente à ação de tradicionais antifúngicos e um potencial novo alvo terapêutico na busca por indutores oriundos de fontes naturais, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(1), 100-157 (2021).