



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Maria Carolina de Albuquerque

Efeito in vivo de inibidores do sistema de efluxo na virulência de
***Candida albicans* resistente a fluconazol**

Araraquara
2022



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Maria Carolina de Albuquerque

**Efeito in vivo de inibidores do sistema de efluxo na virulência de
Candida albicans resistente a fluconazol**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do grau de Cirurgião-dentista.

Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

**Araraquara
2022**

A345e

Albuquerque, Maria Carolina de

Efeito in vivo de inibidores do sistema de efluxo na virulência de *Candida albicans* resistente a fluconazol / Maria Carolina de Albuquerque. -- Araraquara, 2022

31 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Odontologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientador: Ewerton Garcia de Oliveira Mima

1. *Candida albicans*. 2. Proteínas de membrana transportadoras. 3. Farmacorresistência fúngica. 4. Invertebrados. I. Título.

Maria Carolina de Albuquerque

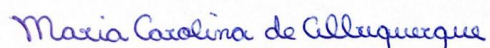
**Efeito in vivo de inibidores do sistema de efluxo na virulência de
Candida albicans resistente a fluconazol**

Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

Assinatura Orientador:

Handwritten signature of Ewerton G. O. Mima in blue ink.

Assinatura Aluna:

Handwritten signature of Maria Carolina de Albuquerque in blue ink.

Araraquara, 31 de maio 2022

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Humberto Amorim de Albuquerque** e **Andréa Fernanda Aiello de Albuquerque**, que me apoiam e me dão todo o suporte que eu preciso. À eles que sempre fizeram o possível e o impossível para me dar o melhor nos estudos, nas experiências ao longo da vida, me ensinaram a ser a mulher integraque eu sou hoje. Agradeço por todo amor, carinho, companheirismo ao longo da vida, por me darem todo suporte principalmente nos momentos mais difíceis e me fazerem chegar aonde cheguei com êxito.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima**, por todo suporte, paciência, dedicação e conhecimento compartilhado ao longo de cinco anos, que contribuíram grandiosamente para minha formação e os levarei comigo por toda minha carreira.

À minha coorientadora **Yuliana Del Pilar Veja Chacón**, por todo companheirismo e aprendizado. Foram momentos de trabalho árduo, mas também de muita amizade.

À minha irmã, **Gabriela de Albuquerque**, que sempre esteve comigo compartilhando momentos bons e ruins por toda a vida, que comemorou comigo meu ingresso à faculdade, me deu apoio durante o percurso e agora vamos comemorar juntas, minha formação.

Às minhas amigas, Daniela Cristina Roque, Victoria Peruchi, Juliana Maria Appoloni, Letícia Montouro Reis, Mariana Segnini Tiberti, Kallen Teodoro Lacerda, Karine Sousa Medeiros, Natalia Tiem Novo, Vitoria Rosato, Laura Regonha Martins e principalmente a minha dupla, da vida, Lais Scabelo, por todo companheirismo, momentos incríveis e por tudo que crescemos juntas, vocês fizeram a diferença na minha formação e evolução pessoal.

Ao meu namorado, **Raphael De Marco**, por todo apoio nos últimos anos da graduação, por me dar forças nos momentos difíceis e por contribuir para a minha formação compartilhando conhecimento.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara**, na pessoa do Diretor, Prof. Dr. Edson Alves de Campos e da Vice-Diretora Prof^a. Dr^a. Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia, por todo apoio e suporte durante os cinco anos nesta instituição.

Aos **funcionários** da faculdade por todo empenho em sempre nos ajudar e estarem à disposição.

Ao **PIBIC** – Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (Processo 2018/46749) pelo apoio para realização desta pesquisa.

À **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2018/02513-9) pelo apoio financeiro essencial para realização desta pesquisa.

As ciências comuns se apoiam nas propriedades da matéria, que podem ser experimentadas e manipuladas a vontade; os fenômenos espíritas se apoiam na ação de inteligências que tem vontade própria e nos provam a todo instante não estarem submetidas aos nossos caprichos.”

Allan Kardec*

* Kardec A. Livro dos Espíritos. São Paulo: IDE Ed.; 2019. p. 37.

Albuquerque MC. Efeito in vivo de inibidores do sistema de efluxo na virulência de *Candida albicans* resistente a fluconazol [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

As bombas ou sistema de efluxo transportam de maneira ativa substâncias tóxicas para fora da célula e são um dos principais mecanismos de resistência microbiana. Determinadas substâncias podem ser usadas para inibir as bombas de efluxo presentes na membrana plasmática do fungo *Candida albicans* (Ca), como a curcumina (CUR) e o verapamil (VER). Os modelos de pesquisa em animais invertebrados têm surgido como um método alternativo. Tem sido demonstrado que a larva da cera maior (*Galleria mellonella*) é um modelo favorável para o estudo de infecções fúngicas. O objetivo deste estudo foi avaliar in vitro a interação entre os inibidores do sistema de efluxo (CUR e VER) com o fluconazol (FLU) e seu efeito in vivo em Ca resistente no modelo de *G. mellonella*. Foram utilizadas duas cepas de Ca, uma susceptível (ATCC 90028, CaS) e outra resistente ao fluconazol (ATCC 96901, CaR). Para determinar as menores concentrações dos inibidores do sistema de efluxo (VER e CUR) que apresentaram interação com o FLU, foi realizado o ensaio de tabuleiro, que foi analisado pelo índice de concentração inibitória fracional (FICI) e pela independência de Bliss. Foram testadas no modelo de *G. mellonella* os fármacos e suas concentrações que demonstraram reversão da resistência de CaR ao FLU previamente. Foram injetados, em cada larva, 10 µL do inóculo de CaS ou CaR e os fármacos (VER, FLU), isoladamente ou em combinação. As larvas foram incubadas e observada diariamente quanto a sobrevivência e recuperação fúngica. A sobrevivência de *G. mellonella* foi analisada por Kaplan-Meier e pelo teste de log-rank e a recuperação fúngica por ANOVA a 3 fatores ($\alpha = 5\%$). A combinação de VER + FLU resultou em ausência de interação FICI para CaS e CaR. Porém, pela análise de Bliss, foi verificado antagonismo para CaS e sinergismo para CaS. Para CUR e FLU, o FICI demonstrou sinergismo para CaS e não possível calcular para CaR. enquanto que a análise de Bliss resultou em sinergismo e antagonismo para CaS, a depender da concentração avaliada, e sinergismo para CaR. No ensaio com *G. mellonella*, não foi observada diferença entre os grupos tratados e não tratados com VER e FLU para CaS ($p \geq 0,235$), enquanto que para CaR o tratamento isolado ou combinado com VER e FLU aumentou ($p \leq 0,012$) a sobrevivência das larvas e reduziu ($p < 0,001$) a recuperação fúngica. Concluiu-se que os inibidores do sistema de efluxo demonstraram sinergismo com FLU e a combinação VER + FLU foi eficaz no combate à infecção por CaR.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Proteínas de membrana transportadoras. Farmacorresistência fúngica. Invertebrados.

Albuquerque MC. In vivo effect of efflux system inhibitors on fluconazole-resistant *Candida albicans* virulence [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Pumps or efflux systems actively transport toxic substances out of the cell and are one of the main mechanisms of microbial resistance. Certain substances can be used to inhibit efflux pumps present in the plasma membrane of the *Candida albicans* (Ca) fungus, such as curcumin (CUR) and verapamil (VER). Research models in invertebrate animals have emerged as an alternative method. The greater wax larva (*Galleria mellonella*) has been shown to be a favourable model for the study of fungal infections. The aim of this study was to evaluate in vitro the interaction between efflux system inhibitors (CUR and VER) with fluconazole (FLU) and their in vivo effect on resistant Ca in the *G. mellonella* model. Two strains of Ca were used, one susceptible (ATCC 90028, CaS) and the other resistant to fluconazole (ATCC 96901, CaR). To determine the lowest concentrations of the efflux system inhibitors (VER and CUR) that interacted with FLU, the tray assay was performed, which was analyzed by the fractional inhibitory concentration index (FICI) and by Bliss independence. Drugs and their concentrations that demonstrated reversion of CaR resistance to FLU previously were tested in the *G. mellonella* model. In each larva, 10 μ L of the inoculum of CaS or CaR and the drugs (VER, FLU) were injected, alone or in combination. Larvae were incubated and observed daily for fungal survival and recovery. *G. mellonella* survival was analyzed by Kaplan-Meier and long-rank test and fungal recovery by 3-way ANOVA ($\alpha = 5\%$). The combination of VER + FLU resulted in the absence of FICI interaction for CaS and CaR. However, by Bliss analysis, antagonism for CaS and synergism for CaS was verified. For CUR and FLU, FICI demonstrated synergism for CaS and not possible to calculate for CaR. While the Bliss analysis resulted in synergism and antagonism for CaS, depending on the concentration evaluated, and synergism for CaR. In the trial with *G. mellonella*, no difference was observed between the groups treated and not treated with VER and FLU for CaS ($p \geq 0,235$), while for CaR, the treatment alone or combined with VER and FLU increased ($p \leq 0,012$) the larvae survival and reduced ($p < 0,001$) fungal recovery. It was concluded that efflux system inhibitors demonstrated synergism was effective in combating CaR infection.

Keywords: *Candida albicans*. Membrane Transport Proteins. Drug Resistance, Fungal. Invertebrates.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 PROPOSIÇÃO	11
3 REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 Resistência Antimicrobiana	12
3.2 Curcumina.....	12
3.3 Sinergismo entre Fármacos Antifúngicos	13
3.4 <i>Galleria mellonella</i>.....	14
4 MATERIAL E METÓDO.....	15
4.1 Enaio do Tabuleiro	15
4.2 Sobrevivência da Larva <i>Galleria mellonella</i>.....	17
4.3 Recuperação Fúngica das Larvas	18
4.4 Análise Estatística.....	18
5 RESULTADO	19
5.1 Ensaio do Tabuleiro	19
5.2 Sobrevivência da Larva <i>Galleria mellonella</i>.....	21
5.3 Recuperação Fúngica de <i>C. albicans</i> em <i>G. mellonella</i>.....	22
6 DISCUSSÃO	24
7 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27
ANEXO A.....	30

1 INTRODUÇÃO

Candida albicans (Ca) é um fungo oportunista humano causador de infecções superficiais, como a candidíase bucal e vaginal, e sistêmicas, como a candidemia¹. A candidemia afeta principalmente pacientes hospitalizados, sendo um problema nosocomial com alta taxa de mortalidade de 25 a 60%².

As infecções microbianas são, muitas vezes, causadas por biofilmes, que são complexas comunidades microbianas anexadas a uma superfície biótica ou abiótica e envoltas por uma matriz polimérica³. As características fenotípicas do biofilme apresentam maior tolerância aos antifúngicos quando comparadas às culturas planctônicas^{4,5}.

A resistência antimicrobiana vem se tornando uma ameaça à saúde pública⁶, devido ao uso indiscriminado de agentes antifúngicos⁷. Em resposta à resistência dos patógenos frente aos fármacos utilizados na prática clínica, as cepas susceptíveis evoluem para cepas resistentes, dificultando a eficácia dos tratamentos. Muitos mecanismos de resistência às drogas da classe dos azóis tem sido relatados: superexpressão de transportadores multidrogas da membrana plasmática⁷ (bombas de efluxo), mutações genéticas e sinalização via vias de resposta ao estresse celular^{4,8}.

As bombas de efluxo são sistemas de transporte celular que se comunicam com o meio externo e transportam de maneira ativa componentes que causam toxicidade à célula para fora desta, bem como atuam como a entrada de nutrientes e íons fundamentais para a vitalidade celular^{7,8}. Duas classes de sistemas de efluxo são importantes para a resistência de Ca: as classes de transportadores dependentes de energia, ou superfamília de transportadores *ATP-binding cassette* (ABC)⁹ e a superfamília facilitadora principal (MFS)¹⁰. Enquanto que a classe ABC são transportadores ativos multicompetentes primários, a super-família MFS são carregadores secundários de polipeptídeos simples. A superexpressão das bombas de efluxo é o principal mecanismo de resistência antifúngica¹¹, e os principais transportadores responsáveis pela resistência aos azóis são *Cdr1p* e *Cdr2p* da classe ABC e *Mdr1p* da classe MFS¹².

Alguns métodos tem sido relatados para combater a resistência aos antifúngicos ocasionada pelas bombas de efluxo, como a inibição farmacológica direta desses sistemas¹³. Estudos demonstraram que alguns fármacos como o verapamil (VER)^{14,15} e a curcumina (CUR)¹⁶ obtiveram sucesso na inibição

das bombas de efluxo presentes na membrana plasmática de *C. albicans*. O VER é um bloqueador dos canais de cálcio, integrante da classe das fenilalquilaminas utilizado no tratamento de hipertensão¹⁷ e angina pectoris¹⁸. O VER apresentou sinergismo com o fluconazol (FLU) e demonstrou inibição da atividade metabólica de biofilmes¹⁶ e da transformação de levedura para sua forma de filamento, além de reduzir a expressão de genes da adesão celular¹⁹. CUR é um composto fenólico (diferulometano) isolado dos tubérculos da *Curcuma longa* L. e apresenta uma série de efeitos terapêuticos, como antiinflamatório, antioxidante, anticâncer e antimicrobiano²⁰.

Num estudo prévio, demonstramos in vitro que tanto a CUR como o VER apresentaram sinergismo com FLU na redução da viabilidade de culturas planctônicas de Ca resistente a fluconazol (CaR)²¹. Na associação dos fármacos, foi utilizada uma concentração abaixo da concentração fungicida mínima (sub-CFM) de cada substância, e uma cepa de Ca susceptível ao fluconazol (CaS) também foi utilizada como controle. A redução da viabilidade de CaR foi maior na associação de VER com FLU quando comparado com as combinações de CUR com FLU e das três substâncias juntas. Além disso, a redução na viabilidade de CaS foi discreta e bem menor do que a observada com CaR. Entretanto, a menor concentração de cada substância que ainda apresentava sinergismo necessitava ser estabelecida.

Estudos in vivo em animais são uma etapa importante em pesquisas previamente à avaliação clínica em humanos. Os modelos de pesquisa em animais invertebrados têm surgido como um método alternativo e ganhado destaque devido às vantagens em relação aos modelos vertebrados que utilizam, principalmente, roedores (ratos e camundongos). Dentre essas vantagens, pode-se citar: baixo custo, facilidade de manipulação, rapidez e ausência de preocupações éticas. Dentre esses modelos, tem sido demonstrado que a traça da cera maior (*Galleria mellonella*) é um modelo favorável para o estudo de infecções fúngicas^{22,23}, por apresentar uma imunidade inata semelhante aos dos mamíferos²⁴, além da virulência da infecção por Ca nesse modelo ser semelhante ao observado em camundongos²⁵.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar *in vitro* e *in vivo* o uso de inibidores do sistema de efluxo em CaR. Os objetivos específicos foram:

- Avaliar *in vitro* a interação entre os inibidores do sistema de efluxo (CUR e VER) com o FLU.
- Verificar o efeito *in vivo* da interação entre os inibidores das bombas de efluxo (CUR e VER) com FLU, na virulência de CaR no modelo de *G. mellonella*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Apresentam-se as revisões da literatura obtidas para a formação deste trabalho.

3.1 Resistência Antimicrobiana

A resistência aos medicamentos antifúngicos é uma importante questão de saúde pública, em especial para aqueles que estão em tratamento pós transplante de órgãos e imunossuprimidos, como pacientes no último estágio da AIDS que possuem CaR⁸. Em nível celular, a resistência aos antifúngicos ocasiona a evolução de uma cepa susceptível para uma cepa mais resistente, e está relacionado a compostos triazólicos e derivados de polieno¹². Os fatores moleculares de *C. albicans* que colaboram para a resistência fúngica envolvem a superexpressão de duas bombas de efluxo e superexpressão e mutação da enzima alvo dos antifúngicos⁸.

Em *C. albicans*, os genes⁸ que codificam as bombas de efluxo são divididos em duas classes, a superfamílias ABC (Cdr1p, Cdr2p)⁸ e os transportadores MFS (Mdr1p)¹². As mutações genéticas tem tornado as cepas mais resistentes aos antifúngicos e pode ser chamada de resistência epigenética⁸. Ocorre uma alteração no fenótipo da célula quando esta entra em contato com o fármaco. Através da expressão genética transitória, uma cepa susceptível torna-se resistente. Porém, assim que o fármaco é eliminado da célula, esta retorna a sua forma susceptível⁸.

Para se determinar a resistência antifúngica, é utilizada a Concentração Inibitória Mínima (CIM), no qual o crescimento do micro-organismo é verificado através de aumento da concentração do fármaco por um intervalo de tempo⁸. Com isso, é importante considerar os aspectos estruturais e funcionais de tais proteínas que podem contribuir para melhores estratégias para projetar moduladores / inibidores de bombas de efluxo para o desenvolvimento de fármacos que possam bloquear a expressão desses genes¹².

3.2 Curcumina

A CUR é um composto fenólico, localizado nos rizomas de *Curcuma longa* L. e possui a ação de reverter fenótipos de resistência a fármacos que causam a superexpressão de transportadores¹⁶. Estudos avaliaram a capacidade da CUR em modular transportadores de leveduras da família ABC ou MFS. O efeito da CUR foi

demonstrado examinando o efluxo do marcador fluorescente Rodamina 6G (R6G) em células de *Saccharomyces cerevisiae* superexpressando os transportadores de Ca ABC Cdr1p e Cdr2p e os transportadores MFS CaMdr1p e Pdr5p de *S. cerevisiae*. Ao utilizar 100 μM , a CUR inibiu o efluxo de R6G na presença de glicose. Porém não foi observada inibição do efluxo nas células de *S. cerevisiae* com superexpressão do transportador MFS Mdr1p quando tratadas com concentrações quatro vezes maiores de CUR. A CUR foi novamente efetiva em inibir o efluxo de R6G quando outros transportadores ABC foram superexpressos (Cdr2p e Pdr5p), demonstrando assim a seletividade da CUR pelos transportadores ABC. A CUR age como inibidor competitivo direto do transportador Cdr1p, pois inibiu a marcação de fotoafinidade do receptor Cdr1p e não apresentou efeito na atividade ATPase e na expressão de Cdr1p. CUR foi seletivamente sinérgica com R6G, cetoconazol, itraconazol e miconazol, apresentando um Índice de Concentração Inibitória Fracional (FICI) $\leq 0,5$. No entanto, esse sinergismo não foi verificado com o FLU, voriconazol, cicloheximidina, anisomicina e FK520¹⁶. Com isso, a CUR modulou apenas transportadores da família ABC, além de poder ser utilizada em combinação com antifúngicos para reverter a resistência em células de *Candida* spp.

3.3 Sinergismo entre Fármacos Antifúngicos

As classes de antifúngicos utilizadas clinicamente no combate às infecções fúngicas, são: polienos, azóis e equinocandinas²³. A resistência a esses fármacos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos¹⁰. Com isso, estudos tem sido realizados para verificar a eficácia de fármacos que potencializam o efeito de antifúngicos. Foi demonstrado que concentrações de VER superiores a 20 mg/L inibiram o metabolismo tanto do biofilme em formação como do biofilme pré-formado de Ca. Foi observado sinergismo do VER com o FLU e com a tunicamicina (TUN). A associação de VER com FLU reduziu a CIM de 320 para 80 mg/L e de 256 para 0,5 mg/L, respectivamente. Quando o VER foi utilizado em combinação com a TUN, a CIM reduziu de 320 para 40 mg/L e de 8 para 2 mg/L, respectivamente. Além disso, foi verificado que o tratamento de VER ou TUN e a combinação do VER com o FLU ou TUN reduziram significativamente a expressão do gene de adesão ALS3. Com isso, o VER foi um agente favorável para potencializar a ação dos fármacos antifúngicos contra a formação do biofilme de Ca¹⁴.

Um outro estudo²³ verificou o efeito antifúngico sinérgico da licofelone (LIC),

que é um inibidor da prostaglandina E2 sintase/ lipoxigenase em combinação com o FLU contra Ca. A CIM em cultura planctônica do LIC foi de 128 µg/mL, e do FLU variou de 1 a 512 µg/mL. A combinação dos fármacos apresentou efeito antifúngico sinérgico contra CaR. A CIM de FLU foi reduzida para 1 e 0,5. Para CaR e CaS, a CIM de FLU e LIC em biofilme foi 512 µg/mL e 128 µg/mL, respectivamente. A associação do LIC a 16 µg/mL com FLU a 1 µg/mL teve efeito sinérgico contra Ca (FICI ≤ 0,5) ao longo de 12 h. Além disso, a associação dos fármacos inibiu a transição da levedura para a forma de hifas. Foi avaliada o efeito in vivo do FLU 160 µg/mL, LIC a 80 µg/mL e sua combinação em *G. mellonella*. Verificou-se que houve maior sobrevivência das larvas tratadas com FLU + LIC, que diminuiu o número de UFC/mL em quase 4 vezes em comparação com seu controle. Verificou-se um efeito sinérgico contra Ca quando combinadas as substâncias FLU e LIC, podendo ser uma terapêutica promissora no tratamento da resistência antifúngica²³.

3.4 *Galleria mellonella*

Ca é um patógeno com a capacidade de alteração de sua forma de levedura para hifa, fazendo com que essa transformação aumente sua virulência em mamíferos²⁵. Estudos recentes mostraram que Ca, quando injetada na hemocele de *G. mellonella*, possui potencial para matar tais larvas. Um estudo²⁵ analisou como as mutações de Ca previamente determinadas influenciaram a transformação de levedura para hifas na virulência da *G. mellonella*. Há uma correlação entre a virulência de Ca com mutações nas larvas hospedeiras e a virulência em camundongos, adquiridas através de infecção sistêmica. A cepa parental SC5314 inibiu 85% das larvas infectadas após 24h, e após 48h de incubação todas as larvas estavam mortas. Já para a cepa CR216, com a mutante *cla4*, apenas 10% morreram após 24h. As larvas infectadas com a mutante da ciclase permaneceram vivas após 48h. As cepas que sofreram alteração nos genes *RAS1*, *CPPI*, *CEK1* e *EFG1* demonstraram maior eficácia em matar as larvas de *G. mellonella*. Para a cepa mutante *RAS1*, 50% das larvas foram mortas em 24h e 90% foram mortas após 48h. Através da correlação com a virulência verificada no modelo de infecção de rato, pôde-se sugerir que *G. mellonella* se comporta como um modelo apropriado e barato para a triagem in vivo de Ca com genes modificados²⁵.

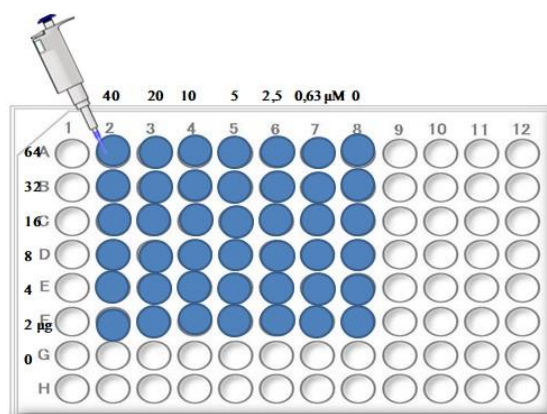
4 MATERIAL E MÉTODO

Apresenta-se o material e método utilizado para a formação deste trabalho.

4.1 Ensaio do Tabuleiro

Foram utilizadas duas cepas de *Ca*, uma susceptível (ATCC 90028) e outra resistente ao fluconazol (ATCC 96901). Para reativação fúngica, cada cepa foi descongelada, plaqueada por esgotamento em Agar Sabouraud Dextrose com 0,5 mg/mL de cloranfenicol (SDA), e incubada a 37 °C por 48 h. Em seguida, cinco colônias foram transferidas para o meio *Yeast Nitrogen Broth* com 100 mM de glicose (YNB) e incubadas a 37°C *overnight*. Após incubação, cada suspensão fúngica foi diluída na razão 1:20 em meio YNB fresco, o qual foi incubado a 37°C até a fase *mid-log* de crescimento para realização dos experimentos. A concentração do inóculo fúngico foi padronizada em 1×10^6 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) por meio da densidade óptica em espectrofotômetro (540 nm) e plaqueamento em Sabouraud Dextrose Águar (SDA).

Para se determinar as menores concentrações dos inibidores do sistema de efluxo (verapamil e curcumina) que apresentarem sinergismo com o fluconazol, foi realizado o ensaio de tabuleiro²⁶ (Figura 1), na qual diluições seriadas (1:1) de um dos inibidores do sistema efluxo (VER ou CUR) foram distribuídas nas colunas das placas de 96 poços e diluições seriadas (1:1) de FLU foram distribuídas nas linhas da placa. Em seguida, foi adicionada em cada poço uma das suspensões fúngicas (CaS ou CaR) na concentração de $0,5-2,5 \times 10^3$ UFC/mL, e as placas foram incubadas, conforme as normas do *Clinical and Laboratory Standard Institute*²⁷. Para se avaliar a interação entre as substâncias, o índice de concentração inibitória fracional (FICI)²⁶ foi determinado pela somatória do FICI de cada agente ($FICI = FICI_{VER \text{ ou } CUR} + FICI_{FLU}$). O FICI de cada agente foi calculado pela divisão da CIM do agente em combinação pela CIM do agente sozinho ($FICI_A = CIM_A \text{ na presença de B} / CIM_A \text{ sozinho}$). Para isso, a CIM e a CFM de VER e CUR foram determinadas previamente²¹. A interpretação do valor de FICI foi realizada da seguinte forma: $FICI < 0,5$: sinergismo; $0,5 \leq FICI \leq 4,0$, ausência de interação; e $FICI > 4,0$, antagonismo²⁸.

Figura 1 - Esquema ensaio do tabuleiro

Diluições seriadas (1:1) de um dos inibidores do sistema efluxo (VER ou CUR) foram distribuídas nas colunas das placas de 96 poços e diluições seriadas (1:1) de FLU foram distribuídas nas linhas da placa.

Fonte: Elaboração do autor.

Devido às deficiências do método FICI, foi utilizado o modelo de independência de interação de fármacos de Bliss²⁹⁻³¹, o qual tem como princípio que cada droga atua independentemente. calculado através da equação: $E_{IND} = E_A + E_B - E_A \times E_B$ para uma combinação da substância A na concentração a , e substância B na concentração b . E_A e E_B são as porcentagens de inibição do crescimento observadas para o fármaco A ou B sozinho na concentração a ou b , respectivamente, e E_{IND} é a porcentagem esperada de inibição do crescimento de uma combinação não interativa do fármaco A em a com o fármaco B em b . A diferença ($\Delta E = E_{OBS} - E_{IND}$) entre a porcentagem de inibição de crescimento observada (E_{OBS}) e a porcentagem esperada (E_{IND}) descreve a interação medicamentosa para cada concentração da seguinte maneira: quando ΔE e seu intervalo de confiança de 95% (IC) foram > 0 , tem-se sinergismo. Se o ΔE e o IC de 95% fossem < 0 , tem-se o antagonismo para essa combinação e a independência de Bliss ocorre quando o IC de 95% do ΔE se sobrepõe a 0^{29,30}. Os experimentos foram realizados três vezes, e as análises FICI e de independência de Bliss foram realizadas para cada combinação de substâncias usando valores de absorbância em 450 nm. Os valores médios de ΔE foram usados para construir um gráfico de superfície tridimensional, onde os picos acima do plano 0 corresponderam ao sinergismo, os vales abaixo de 0 corresponderam ao antagonismo e o plano 0 indicou ausência de interação estatisticamente significativa.

4.2 Sobrevivência da larva *Galleria mellonella*

Determinadas as menores concentrações sinérgicas, estas foram testadas in vivo no modelo da larva *G. mellonella*. Para isso, larvas na fase final de desenvolvimento (*instar*) de tamanho padronizado (150 a 200 mg) e coloração homogênea, sem marcas acinzentadas, foram selecionadas. A microseringa foi higienizada por 10 min com alvejante 10%, etanol 100%, água destilada e PBS estéreis²³, e a região ventral e as patas de cada larva foram higienizadas com algodão embebido em álcool 70%.

Para inoculação fúngica (Figura 2), cada larva foi manipulada com leve pressão e 10 µL do inóculo de uma das suspensões de *C. albicans* (1×10^7 UFC/mL) foi injetado na última pata esquerda^{23,24}. As larvas foram incubadas a 37 °C e após 2h da inoculação fúngica, os fármacos (VER e FLU) foram injetados, isoladamente ou em combinação, no mesmo volume na última pata direita. Um grupo de larvas recebeu somente inoculação fúngica, enquanto que outro grupo recebeu injeção na última pata esquerda com solução salina para se avaliar o efeito do trauma da injeção, e esses dois grupos receberam injeção de solução salina na última pata direita em substituição aos fármacos. Portanto, além do grupo controle negativo (salina), para cada cepa de Ca foram avaliados os seguintes grupos (n = 10): controle (inoculação de Ca e salina); FLU (Ca e FLU); VER (Ca e VER); VER+FLU (Ca e VER associado a FLU).

Figura 2 - Inoculação fúngica de *C. albicans* na larva *G. mellonella*, na última pata esquerda



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Após as injeções, as larvas foram mantidas em placas de Petri distintas de

acordo com cada grupo, incubadas a 33 °C e observadas diariamente quanto a sobrevivência até não restar nenhuma larva ou a larva se transformar em pupa. Para se avaliar a sobrevivência dos animais, estes foram levemente tocados para se verificar a ausência de resposta do animal ao estímulo, além da alteração de cor. As larvas mortas foram autoclavadas e descartadas em cada dia de observação^{23,24}.

4.3 Recuperação Fúngica das Larvas

Além da sobrevivência, foi avaliada também a recuperação fúngica das larvas (UFC/mL). Os animais foram divididos nos mesmos grupos descritos acima (n = 10) e as larvas viáveis de cada grupo foram diariamente (n = 2) homogeneizadas em PBS²⁴. Diluições seriadas foram plaqueadas em SDA e incubadas a 37 °C por 48 h para contagem de colônias (UFC/mL).

4.4 Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em três ocasiões distintas. O ensaio do tabuleiro foi analisado conforme descrito previamente (FICI e Bliss). A curva de sobrevivência de *G. mellonella* foi analisada pelo método de Kaplan-Meier e teste de log-rank. Os valores de UFC/mL recuperados das larvas foram analisados quanto a normalidade e a homocedasticidade; como esses pressupostos foram atendidos, uma análise de variância (ANOVA) a três fatores (cepa fúngica X grupos de tratamento X dia de recuperação) foi realizada. O nível de significância foi de 5% ($\alpha = 0,05$).

5 RESULTADO

Apresenta-se os resultados obtidos neste trabalho.

5.1 Ensaio do Tabuleiro

Os valores de CIM de VER, CUR e FLU foram determinados em um estudo prévio²¹ (Quadro 1) e utilizados neste estudo como valores de partida para o ensaio do tabuleiro. Este, por sua vez, foi realizado com o intuito de se encontrar as menores concentrações sinérgicas para serem inoculadas nas larvas. Com base nesses valores, os ensaios do tabuleiro foram realizados com as concentrações sub-CIM apresentadas no Quadro 2.

Quadro 1 - Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de fluconazol (FLU), curcumina (CUR) e verapamil (VER) obtidos para ambas as cepas de *C.albicans*

<i>C. albicans</i>	FLU	CUR	VER
CaS (ATCC 90028)	0,5 µg/mL (0,8 log ₁₀)	20 µM (1,40 log ₁₀)	4 mg/mL (4,05 log ₁₀)
CaR (ATCC 96901)	128 µg/mL (2,27 log ₁₀)	-	4 mg/mL (1,74 log ₁₀)

Os valores entre parênteses mostram a redução em log obtida em relação ao controle (sem fármaco).

CaS: *C. albicans* susceptível a fluconazol; CaR: *C. albicans* resistente a fluconazol. -: Valor não encontrado.

Fonte: Elaboração própria.

Quadro 2 - Concentrações de VER, CUR e FLU utilizadas no ensaio do tabuleiro para as cepas CaS e CaR

cepas	VER (mg/mL)	CUR (µM)	FLU (µg/mL)
CaS	-	10; 5; 2,5; 1,25; 0,62	0,25; 0,125; 0,06; 0,03
	4; 2; 1; 0,5	-	0,5; 0,25; 0,125; 0,063
CaR	4; 2; 1; 0,5	-	128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5
	-	40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,63	64; 32; 16; 8; 4; 2

CaS: *C. albicans* susceptível a fluconazol; CaR: *C. albicans* resistente a fluconazol. -: substância não testada.

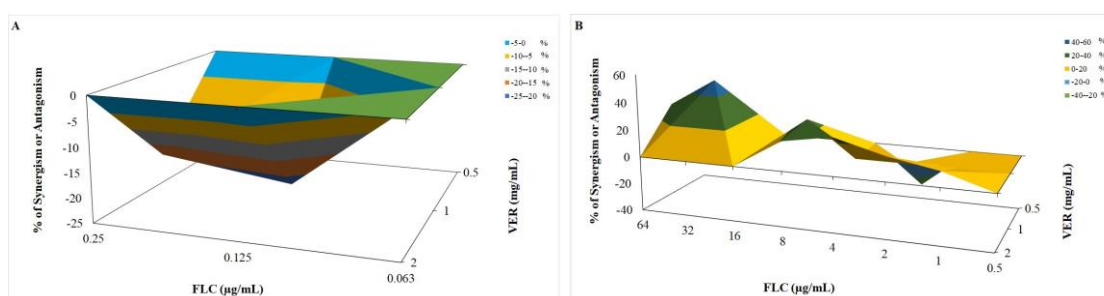
Fonte: Elaboração própria.

Os resultados do tabuleiro com VER e FLU para CaS apresentaram ausência de interação entre as drogas, podendo ser comprovado pelos valores de FICI variando de

0,625 a 1,000 e valores médios elevados para UFC/mL (entre 10^5 e 10^7 UFC/mL). Para CaR também foi demonstrada ausência de interação, os valores de FICI variaram de 0,508 a 1,000, sem redução em nenhuma das combinações de concentrações testadas quando comparadas com o grupo controle (sem VER nem FLU), com valores médios variando de $4,47 \times 10^3$ a $4,92 \times 10^6$ UFC/mL.

Porém, através da análise de independência Bliss, foi verificado antagonismo para CaS entre VER a 1 mg/mL e FLU a 0,25 e 0,125 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3A; IC de -0,096 a -0,280 e -0,073 a -0,378, respectivamente). No caso de CaR, ocorreu sinergismo entre VER a 2 e 1 mg/mL e FLU a 64, 32, 8, 4, 2 e 1 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3B; IC de 0,166 a 0,055 e 0,943 a 0,061, respectivamente).

Figura 3 - Gráfico de superfície tridimensional representando a análise de independência de Bliss da interação entre VER e FLU para CaS (A) e CaR (B)



São mostradas nos eixos X e Z as concentrações de FLU e VER, respectivamente, enquanto que o eixo Y mostra o ΔE em %. Os picos acima do plano 0 representam sinergismo (%), os vales abaixo do plano 0 representam antagonismo (%), e o plano 0 representa ausência de interação (IC 95% sobreposto a 0). FLC: fluconazol; VER: verapamil; CaS: *C. albicans* suscetível a FLC; CaR: *C. albicans* resistente a FLC.

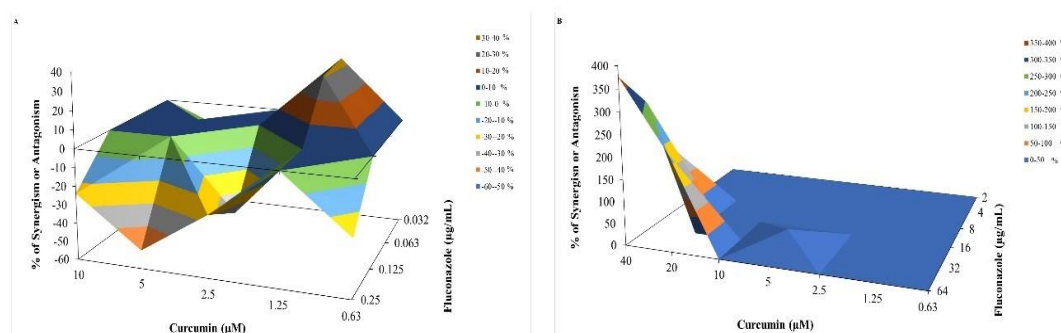
Fonte: Vega-Chacón et al.³² (2021).

No ensaio de tabuleiro de CUR com FLU para CaS nas combinações de concentrações 0,63 μM de CUR e 0,03 $\mu\text{g/mL}$ de FLU, houve sinergismo com um FICI de 0,0915, porém na contagem de UFC/mL não foi observada redução para essas mesmas concentrações das substâncias (10^6 a 10^7 UFC/mL). Para CaR, como não foi detectada CIM de CUR²¹, não foi possível calcular o FICI, porém os valores médios de colônias variaram de $8,20 \times 10^3$ a $8,81 \times 10^6$ UFC/mL.

Pela análise de independência Bliss, para CaS entre 1,25 μM de CUR e 0,063 e 0,032 $\mu\text{g/mL}$ de FLU (Figura 4A, IC de 0,4252 a 0,1864 e 0,5021 a 0,1643) houve sinergismo, enquanto que as combinações das concentrações de 5 μM CUR com 0,032 $\mu\text{g/mL}$ de FLU (IC de -0,0041 a -0,2893) e 2,5 μM de CUR com 0,125 $\mu\text{g/mL}$ de FLU

(IC de -0,0256 a -0,7467) demonstraram antagonismo. Já para CaR, as associações de 40 μM de CUR e 64, 32 e 16 $\mu\text{g/mL}$ de FLU (Figura 4B, IC de 5,8895 a 1,6359, 4,0285 a 1,8768, 2,8671 a 0,2593, respectivamente), 64 $\mu\text{g/mL}$ FLU e 20 μM CUR (IC de 4,2880 a 0,0817) e 5 μM de CUR com 32 $\mu\text{g/mL}$ de FLU (IC de 0,6902 a 0,1034) mostraram sinergismo.

Figura 4 - Gráfico de superfície tridimensional representando a análise de independência de Bliss da interação entre CUR e FLU para CaS (A) e CaR (B)



São mostradas nos eixos X e Z as concentrações de CUR e FLU, respectivamente, enquanto que o eixo Y mostra o ΔE em %. Os picos acima do plano 0 representam sinergismo (%), os vales abaixo do plano 0 representam antagonismo (%), e o plano 0 representa ausência de interação (IC 95% sobreposto a 0). FLC: fluconazol; CUR: curcumina; CaS: *C. albicans* suscetível a FLC; CaR: *C. albicans* resistente a FLC.

Fonte: Vega-Chacón et al.³²(2021).

5.2 Sobrevivência da Larva *Galleria mellonella*

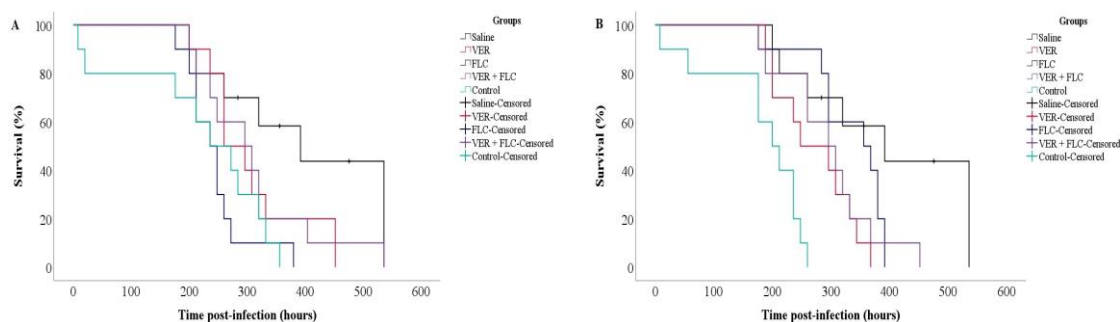
Nas curvas de sobrevivência da *G. mellonella* infectadas com CaS e CaR, foi observado redução na sobrevivência larval ($p \leq 0,010$), quando comparado aos grupos controle injetados com solução salina. A associação de CUR com FLU não foi utilizada, pois nosso estudo prévio demonstrou maior redução fúngica com VER e FLU comparado com CUR e FLU²¹.

Na curva de sobrevivência da *G. mellonella* para CaS (Figura 5A), não houve diferença significativa ($p \geq 0,235$) na sobrevivência das larvas do grupo controle em comparação com as larvas infectadas com CaS e tratadas com fármacos. Foi verificado que os grupos VER e VER+FLU ($p \leq 0,043$) não apresentaram diferença significativa ($p \geq 0,071$) em relação ao grupo salina.

A análise de sobrevivência para CaR demonstrou que os grupos de larvas infectados com CaR e tratados com VER, FLU e VER + FLU obtiveram um aumento

no tempo de sobrevivência, enquanto o grupo controle mostrou o menor tempo de sobrevivência ($p \leq 0,012$). Porém não houve diferença significativa ($p = 0,137$) entre os grupos de larvas tratadas com FLU e com solução salina (Figura 5B).

Figura 5 - Análise de sobrevivência de *G. mellonella* infectada com CaS (A) e CaR (B) e tratadas com VER e FLU



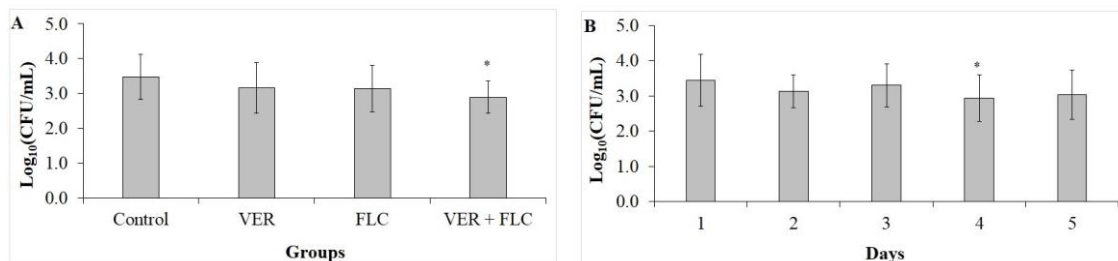
Observações censuradas estão marcadas com sinal de (+) (coleta de dados finalizada quando a larva se tornou pupa).

Fonte: Vega-Chacón et al. ³² (2021).

5.3 Recuperação Fúngica de *C. albicans* em *G. mellonella*

A recuperação fúngica das cepas de CaS e CaR foi realizada diariamente até o quinto dia após as larvas receberem ou não tratamento com VER e FLU, para se determinar a carga fúngica da *G. mellonella*. Através da ANOVA a três fatores, verificou-se que cada fator (cepa, tratamento e dia de recuperação) considerado separadamente apresentou efeito significativo ($p \leq 0,004$), porém, quando em conjunto, não houve interação significativa entre os fatores ($p \geq 0,091$). Não ocorreu a recuperação de *C. albicans* no grupo controle (salina). Ao comparar as cepas, CaR apresentou maior recuperação em relação a CaS, $3,41 \pm 0,70 \log_{10}(\text{UFC/mL})$ e $2,94 \pm 0,53 \log_{10}(\text{UFC/mL})$, respectivamente. Em relação grupo controle, VER e FLU em combinação reduziram significativamente ($p < 0,001$) a recuperação fúngica em $0,58 \log_{10}$ (Figura 6A). No quarto dia houve uma redução significativa ($p = 0,016$) da recuperação fúngica, em relação ao primeiro dia após infecção (Figura 6B).

Figura 6 - Valores médios de \log_{10} (UFC/mL) de Ca recuperados durante 5 dias após infecção com CaS e CaR e tratamento com VER, FLU ou combinação de ambas



A: grupos de tratamentos independentemente das cepas e dos dias de tratamento. B: Dias de recuperação independentemente das cepas e dos grupos de tratamento. Demonstra diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (A) ou ao 1 dia pós-infecção (B).

Fonte: Vega-Chacón et al. ³² (2021).

6 DISCUSSÃO

Os resultados *in vitro* do nosso estudo demonstraram sinergismo entre os inibidores dos sistemas de efluxo de CaR e FLU, o que sugere que CUR e VER podem ser potenciais substâncias para a reversão da resistência de Ca. O antagonismo observado entre os inibidores do sistema de efluxo e FLU em CaS pode ser justificado pela ausência de superexpressão desse sistema nessa cepa. Porém, esta investigação não avaliou a expressão dos transportadores de membrana para confirmar essa hipótese, o que pode ser considerado uma limitação deste estudo. Porém, no estudo prévio²¹, foi realizada microscopia confocal que verificou o efluxo do marcador fluorescente rodamina em CaR, porém não em CaS, o que fortalece a hipótese de que as bombas de efluxo estavam expressas somente na cepa resistente.

Também utilizando a análise de independência de Bliss, outro estudo verificou sinergismo entre FLU e outros bloqueadores dos canais de cálcio (*amlodipine, nifedipine, benidipine e flunarizine*)³³. Também já foi demonstrado que CUR a 11 μ M apresentou sinergismo com FLU 4 mg/L numa cepa resistente de Ca³⁴. Entretanto, os resultados da nossa investigação não concordam com os achados de Sharma et al.¹⁶, que demonstraram ausência de interação entre CUR e FLU pelo método FICI. Este método também demonstrou sinergismo entre CUR e antifúngicos azóis e polienos em isolados clínicos e cepa parental de Ca³⁵.

Os resultados *in vivo* mostraram aumento da sobrevivência das larvas infectadas com CaR e tratadas com VER e FLU, além de menor recuperação fúngica, o que demonstra que a combinação desses fármacos foi efetiva no tratamento da infecção pela cepa resistente. Em outro estudo, inibidores das bombas de prótons (*omeprazole, lansoprazole, pantoprazole, rabeprazole, esomeprazole e ilaprazole*) bloquearam o sistema de efluxo e, juntamente com FLU, aumentaram a sobrevivência de *G. mellonella* infectada com uma cepa resistente de Ca, além de diminuir as alterações histológicas visualizadas nas larvas infectadas e não tratadas³⁶. Maior sobrevivência das larvas infectadas por CaR foi verificada também com a combinação de *licofelone* e FLU, que também reduziu a quantidade de fungos recuperados das larvas e observados nos cortes histológicos²³.

Adicionalmente, na presente investigação não foi verificada diferença entre a combinação de VER e FLU e a ação dos fármacos sozinhos na sobrevivência de *G. mellonella*. Essa ausência de diferença pode ser explicada pela maior concentração dos fármacos utilizados (CIM) ao invés de doses subletais, já que foi necessário aumentar a concentração de Ca de 10^6 para 10^7 para reduzir a sobrevivência das larvas (dado do estudo piloto não apresentado).

7 CONCLUSÃO

Os inibidores do sistema de efluxo, VER e CUR, demonstraram sinergismo com FLU contra CaR. A combinação de VER e FLU foi eficaz no tratamento da infecção por CaR, aumentando a sobrevivência das larvas e diminuindo a recuperação fúngica.

REFERÊNCIAS*

1. Rautemaa R, Ramage G. Oral candidosis: clinical challenges of a biofilmdisease. *Crit Rev Microbiol*. 2011; 37(4): 328-36.
2. Kaur H, Chakrabarti A. Strategies to reduce mortality in adult and neonatal candidemia in developing countries. *J Fungi (Basel)*. 2017; 3(3): 41.
3. Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol*. 2011;3. doi: 10.3402/jom.v3i0.5771.
4. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M et al. *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiol*. 2007; 153: (Pte. 10): 3211–17.
5. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *J Dent Res*. 2001;80:903–908..
6. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva, Switzerland: WHO; 2014.
7. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011;75:213–267.
8. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva, Switzerland: WHO; 2014.
9. Gaur M, Choudhury D, Prasad R. Complete inventory of ABC proteins in human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2005;9(1):3-15.
10. Gaur M, Puri N, Manoharlal R, Rai V, Mukhopadhyay G, Choudhury D, Prasad R. MFS transportome of the human pathogenic yeast *Candida albicans*. *BMC Genomics*. 2008 Dec 3;9:579.
11. Bae YS, Rhee MS. Short-term antifungal treatments of caprylic acid with carvacrol or thymol induce synergistic 6-log reduction of pathogenic *Candida albicans* by cell membrane disruption and efflux pump inhibition. *Cell Physiol Biochem*. 2019;53:285–300.
12. Prasad R, Gaur NA, Gaur M, et al. Efflux pumps in drug resistance of *Candida*. *Infect Disord Drug Targets*. 2006;6:69–83.
13. Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Costa-de-Oliveira S, Ricardo E, Mårdh PA. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Oct;56(4):678-85.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>.

14. Yu Q, Ding X, Xu N, Cheng X, Qian K, Zhang B, Xing L, Li M. In vitro activity of verapamil alone and in combination with fluconazole or tunicamycin against *Candida albicans* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Feb;41(2):179-82.
15. Yu Q, Xiao C, Zhang K, Jia C, Ding X, Zhang B, Wang Y, Li M. The calcium channel blocker verapamil inhibits oxidative stress response in *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 2014 Apr;177(3-4):167-77.
16. Sharma M, Manoharlal R, Shukla S, Puri N, Prasad T, Ambudkar SV, Prasad R. Curcumin modulates efflux mediated by yeast ABC multidrug transporters and is synergistic with antifungals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Aug;53(8):3256-65.
17. Kaplan NM. Calcium entry blockers in the treatment of hypertension. Current status and future prospects. *JAMA*. 1989 Aug 11;262(6):817-23. Review. Erratum in: *JAMA* 1990 Feb 2;263(5):662.
18. Brogden RN, Benfield P. Verapamil: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in coronary artery disease. *Drugs*. 1996 May;51(5):792-819.
19. Yu Q, Ding X, Zhang B, et al. Inhibitory effect of verapamil on *Candida albicans* hyphal development, adhesion and gastrointestinal colonization. *FEMS Yeast Res*. 2014;14:633–641. Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, Tharakan ST, Misra K, Priyadarsini IK, Rajasekharan KN, Aggarwal BB. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem Pharmacol*. 2008 Dec 1;76(11):1590-611.
20. Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, Tharakan ST, Misra K, Priyadarsini IK, Rajasekharan KN, Aggarwal BB. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem Pharmacol*. 2008 Dec 1;76(11):1590-611.
21. Vega Chacón YDP. Susceptibilidade de *Candida albicans* resistente a fluconazol ao efeito fotodinâmica e inibidores dos sistemas de efluxo [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018 [acesso em 28 março 2022]. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/166350/vegachacon_yulianadelpilar_me_arafor_par.sub.pdf?sequence=13&isAllowed=y.
22. Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*. 2010 Nov-Dec;1(6):475-82.
23. Liu X, Li T, Wang D, Yang Y, Sun W, Liu J, Sun S. Synergistic Antifungal Effect of Fluconazole Combined with Licofelone against Resistant *Candida albicans*. *Front Microbiol*. 2017 Nov 7;8:2101.
24. Vilcinskas A. Insects emerge as valuable model hosts to explore virulence. *Virulence*. 2011 Sep-Oct;2(5):376-8.

25. Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002 Oct 11;34(2):153-7.
26. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Jul;52(1):1.
27. Rex JH, Alexander BD, Andes D, Arthington-Skaggs B, Brown SD, Chaturvedi V, Ghannoum MA, et al. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved Standard-Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
28. Bachmann SP, Ramage G, VandeWalle K, Patterson TF, Wickes BL, López-Ribot JL. Antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 2003;65:3657–9.
29. Meletiadis J, Verweij PE, TeDorsthorst DT, et al. Assessing *in vitro* combinations of antifungal drugs against yeasts and filamentous fungi: comparison of different drug interaction models. *Med Mycol*. 2005;43:133– 152.
30. Petraitis V, Petraitiene R, Hope WW, et al. Combination therapy in treatment of experimental pulmonary aspergillosis: *in vitro* and *in vivo* correlations of the concentration- and dose-dependent interactions between anidulafungin and voriconazole by Bliss independence drug interaction analysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:2382–2391.
31. Roell KR, Reif DM, Motsinger-Reif AA. An introduction to terminology and methodology of chemical synergy—perspectives from across disciplines. *Front Pharmacol*. 2017;8:158.
32. Yuliana Vega-Chacón, Maria Carolina de Albuquerque, Ana Cláudia Pavarina, Gustavo Henrique Goldman & Ewerton Garcia de Oliveira Mima (2021) Verapamil inhibits efflux pumps in *Candida albicans*, exhibits synergism with fluconazole, and increases survival of *Galleria mellonella*, *Virulence*, 12:1, 231-243.
33. Liu S, Yue L, Gu W, et al. Synergistic effect of fluconazole and calcium channel blockers against resistant *Candida albicans*. *Plos One*. 2016;11:e0150859.
34. Garcia-Gomes AS, Curvelo JAR, Soares RMA, Ferreira-Pereira A. Curcumin acts synergistically with fluconazole to sensitize a clinical isolate of *Candida albicans* showing a MDR phenotype. *Med. Mycol*. 2012; 50: 26-32. doi:10.3109/13693786.2011.578156
35. Sharma M, Manoharlal R, Negi AS, Prasad R. Synergistic anticandidal activity of pure polyphenol curcumin I in combination with azoles and polyenes generates reactive oxygen species leading to apoptosis. *FEMS Yeast Res*. 2010; 10: 570-578. doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00637.x.
36. Lu M, Yan H, Yu C, et al. Proton pump inhibitors act synergistically with fluconazole against resistant *Candida albicans*. *Sci Rep*. 2020;10:498.

ANEXO A – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO RELATÓRIO FINAL

Iniciação Científica

28/03/2022 22:33

UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA*JÚLIO DE MESQUITA
FILHO*
Sistema PIBIC

Início | Acesso
Restrito

Iniciação Científica

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

Orientador Envio do relatório final dos projetos

 **Orientador**
EWERTON
GARCIA DE
OLIVEIRA MIMA

Lista de pedidos

[Início](#)

[Trocar](#)

[Senha](#)

[Editar](#)

[dados](#)

[Meus](#)

[Pedidos](#)

[Criar](#)

[Pedido](#)

[Envio do relatório
final](#)

[Formulário
de
Avaliação
do Relatório
Parcial](#)

[Substituição](#)

[ões](#)

[Cancelame](#)

[ntosSair](#)

Não existe pedidos para entrega do Relatório.

Status dos Pedidos após envio do Relatório Final

53031 - Validação de um Modelo in vivo de Estomatite Protética causado por Candida spp. (**LETICIA MATHEUS ROSA**)(07/05/2019 - Nova)

Status: Aprovado

53009 - Efeito in vivo da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana na virulência de Candida albicans resistente a fluconazol (**MARIA CAROLINA DE ALBUQUERQUE**) (07/05/2019 - Nova)

Status: Aprovado

47434 - Efeitos Fotodinâmicos da Curcumina associada ao Verapamil em culturas planctônicas e biofilmes de Candidaalbicans susceptível e resistente ao Fluconazol (**LETICIA MATHEUS ROSA**) (23/05/2018 - Nova)

Status: Aprovado

- Análise: Relatório bem elaborado. Resultados relevantes e discutidos frente a revisão bibliográfica atualizada. Pode-se perceber pelo relatório que a Iniciação científica atingiu seus objetivos de introduzir o aluno na pesquisa.
Verificação: Atividades foram realizadas.

42936 - Susceptibilidade de Candida albicans resistente a fluconazol à Terapia Fotodinâmica mediada pela curcumina (**GABRIELA CRISTINA ZANATTA**) (27/04/2017 - Nova)

46749 - Efeito in vivo de inibidores do sistema de efluxo na virulência de *Candida albicans* resistente a fluconazol (**MARIA CAROLINA DE ALBUQUERQUE**) (16/05/2018 - Nova)

Status: **Aprovado**

- Análise: **Relatório muito bem elaborado. Resultados relevantes e discutidos frente a bibliografia atualizada. Cumpridos todos os aspectos de um iniciação científica preparatória para o aluno de graduação, se inserir na pesquisa.**
Verificação: Todas as etapas foram cumpridas.

Status: **Aprovado**

- Análise: **O relatório esta completo e todos os itens foram redigidos satisfatoriamente. Resultados e discussão foram devidamente descritos e comparados com a literatura. A conclusao esta de acordo com os objetivos propostos.**
Verificação: Todas as atividades previstas foram executadas, conforme previamente planejado.

38324 - Síntese, Caracterização e Efeitos Fotodinâmicos de Curcumina encapsulada em Nanopartículas Poliméricas em Biofilme de *Candida albicans* (**GABRIELA CRISTINA ZANATTA**) (27/04/2016 - Renovação)

Status: **Aprovado**

- Análise: **O relatório esta bem redigido com resultados, discussao e e conclusoes pertinentes. Assim, considero o relatório aprovado.**
Verificação: Sim, com alteracoes justificadas.

37252 - Efetividade da Terapia Fotodinâmica Mediada por Curcumina encapsulada em Nanopartículas Poliméricas em Biofilme Misto de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* (**MARIA ISABELLA CUBA BALASTEGUI**) (12/04/2016 - Renovação)

Status: **Aprovado**

- Análise: **O relatório esta bem redigido com interpretacao dos resultados, discussao e conclusao. Apresenta lindas imagens dos resultados. Assim, considero o relatório aprovado.**
Verificação: Sim

34848 - Síntese, Caracterização e Efeitos Fotodinâmicos de Curcumina encapsulada em Nanopartículas Poliméricas em Biofilme de *Candida albicans* (**GABRIELA CRISTINA ZANATTA**) (13/05/2015 - Renovação)

Status: **Aprovado**