

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 06/08/2021.



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



Yuliana Del Pilar Vega Chacón

**Susceptibilidade de *Candida albicans* resistente a fluconazol ao efeito
fotodinâmica e inibidores dos sistemas de efluxo**

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Yuliana Del Pilar Vega Chacón

Susceptibilidade de *Candida albicans* resistente a fluconazol ao efeito fotodinâmica e inibidores dos sistemas de efluxo

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral na área de Prótese.

Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

Araraquara

2018

Vega Chacón, Yuliana del Pilar

Susceptibilidade de *Candida albicans* resistente a fluconazol ao efeito fotodinâmica e inibidores dos sistemas de efluxo / Yuliana del Pilar Vega Chacón. -- Araraquara: [s.n.], 2018

75 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

1. Proteínas de membrana transportadoras 2. Candidíase 3. Resistência microbiana a medicamentos 4. Antifúngicos 5. Fotoquimioterapia I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Jorge, CRB-8/5036
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Yuliana Del Pilar Vega Chacón

**Susceptibilidade de *Candida albicans* resistente a fluconazol ao efeito
fotodinâmica e inibidores dos sistemas de efluxo**

Comissão julgadora

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de mestre em Reabilitação Oral -
área de Prótese

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

2º Examinador: Profa. Dra. Lívia Nordi Dovigo

3º Examinador: Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

Araraquara, 06/08/2018

DADOS CURRICULARES

Yuliana Del Pilar Vega Chacón

NASCIMENTO: 04/02/1989 – Lima, Perú
FILIAÇÃO: Benjamín Vicente Vega Avellaneda
Nidia Fanny Chacón Hinostrosa
2007 a 2013: Curso de Graduação pela Facultad de Odontologia Universidad Alas Peruanas (Perú)
2016 a 2018: Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedico o presente trabalho a Deus por abençoar-me sempre

Aos meus pais, **Benjamín Vega** e **Nidia Chacón**, por todo sacrifício que eles fizeram para dar-me o melhor sempre, me apoiando nos momentos mais difíceis e por todo seu amor mesmo na distância.

Ao meu irmão, **Jaime Vega**, sempre me apoiando e animando para continuar nesta luta do mestrado e por ser sempre um amigo para mim e a pessoa que admiro.

Aos meus cachorros **Saza, Bronco e Pelusa** por todo o amor que eles têm por mim, sempre estão no meu coração.

AGRADECIMENTOS

Ao Brasil e à Faculdade de Odontologia de Araraquara, por me dar a oportunidade de fazer o mestrado.

Ao programa de pós-graduação em Reabilitação Oral, em especial à **Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina**, por me dar a oportunidade de realizar o mestrado aqui no Brasil.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima**, um verdadeiro exemplo de pesquisador e professor e por acreditar em meu potencial como aluno de pós-graduação. Agradeço toda paciência principalmente com o idioma e toda a ajuda que me deu durante este tempo.

Aos meus amigos **Midian Castillo** e **Elkin Florez** por todos os momentos de alegria, paciência, parceria e companhia.

A **Bruna Michelli Novelli**, muito obrigada amiga por toda sua ajuda no laboratório e sobre tudo pela paciência.

Ao grupo de pesquisa, **Jefferson, Vinicius, Thaís e Gabriela**, obrigada por toda a paciência, todos os ensinamentos e disposição em me ajudarem com as pesquisas.

A CAPES, **pela bolsa concedida no** Programa de Pós-graduação de Reabilitação Oral, que apoiou o desenvolvimento dessa pesquisa

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.

RESUMO

Um dos principais mecanismos de resistência microbiana são os sistemas de efluxo, que transportam medicamentos antimicrobiano para fora da célula. A eficácia de alguns agentes de inibição dos sistemas de efluxo tem sido reportada para reverter a resistência microbiana e também para potencializar as terapias antimicrobianas. Além disso, métodos alternativos aos agentes antimicrobianos convencionais têm sido investigados, como a Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). O objetivo desse estudo foi avaliar *in vitro* o efeito da aPDT e de dois inibidores de sistemas de efluxo microbiano (curcumina e verapamil) na resistência à inativação de *C. albicans*. Foram utilizadas duas cepas de *C. albicans*, uma susceptível (CaS) e outra resistente (CaR) a fluconazol. Os parâmetros de inativação fúngica foram determinados submetendo-se culturas planctônicas de ambas as cepas à curcumina, ao verapamil, ao fluconazol e também à aPDT (mediada pela curcumina 40 μM (14,73 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e luz de LED azul de $\cong 455$ nm a 5,28 J/cm^2). As duas cepas foram cultivadas e tratadas associando-se os agentes de inibição do efluxo ao fluconazol em concentrações não letais. Os dados de UFC/mL foram analisados pelos testes paramétricos t de Student, ANOVA/Welch e *post-hoc* de Games-Howell e pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ($\alpha=0,05$; $n=12$). Os resultados demonstraram que aPDT promoveu uma redução significativa ($p<0,001$) de 4,5 e 4,42 \log_{10} para CaS e CaR, respectivamente. Para CaS, os valores de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) de fluconazol, curcumina e verapamil foram de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 μM (7,37 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 4 mg/mL (4.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectivamente; as quais promoveram reduções $\geq 1,4 \log_{10}$ nas concentrações \geq CIM ($p\leq 0,045$). Para CaR, fluconazol e verapamil apresentaram valores de CIM de 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 4 mg/mL (4.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectivamente; a curcumina não reduziu a viabilidade de CaR, ao passo que redução significativa $\geq 1,74 \log_{10}$ foram observadas para verapamil e fluconazol \geq CIM ($p<0,001$). A associação sub-CIM de verapamil + fluconazol de 2 mg/mL (2.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, para CaS e 2 mg/mL (2.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, para CaR mostrou uma redução ($p<0,001$) maior para CaR de 4,08 \log_{10} em comparação com CaS ($p<0,001$, 0,59 \log_{10}). A associação de curcumina + fluconazol de 10 μM (2,68 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, para CaS e 40 μM (14,73 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, para CaR promoveu redução maior para CaR ($p<0,001$) de 2,28 \log_{10} do que para CaS ($p<0,001$) de 1,58 \log_{10} . A associação de curcumina, verapamil e fluconazol nessas mesmas concentrações resultou em uma redução ($p<0,001$) de 0,77 \log_{10} para CaS e de 2,86 \log_{10} e para CaR. Concluiu-se que a aPDT reduziu tanto a viabilidade de CaS como a de CaR. O verapamil e a curcumina revertem a resistência de *C. albicans* ao fluconazol em culturas planctônicas, tendo um efeito inibitório maior para CaR do que para CaS.

Palavras chaves: Proteínas de membrana transportadoras. Candidíase. Resistência microbiana á medicamentos. Antifúngicos. Fotoquimioterapia.

Vega Chacón YDPV. Susceptibility of fluconazole-resistant *Candida albicans* to photodynamic effect and inhibitors of efflux systems [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

One of the major mechanisms of microbial resistance is the efflux systems, or efflux pumps, present in the plasma membrane of microorganisms that carry an antimicrobial drug out of the cell. The efficacy of some inhibitors of efflux systems has been reported to reverse microbial resistance, including *C. albicans*, and also to potentiate antimicrobial therapies. In addition, alternative methods to conventional antimicrobial agents have been investigated, such as antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT). The objective of this study was to evaluate in vitro the effect of aPDT and two inhibitors of microbial efflux systems (curcumina and verapamil) on the resistance to inactivation of *C. albicans*. For this, two strains of *C. albicans*, one susceptible (CaS) and another resistant (CaR) to fluconazol were used. Fungal inactivation parameters were determined by subjecting planktonic cultures of both strains to curcumina, verapamil, fluconazol, and also aPDT (mediated by curcumin at 40 μM (14.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and blue LED light of $\cong 455$ nm and 5.28 J/cm^2). These strains were then cultured and treated associating one of the efflux inhibitors with fluconazole using non-lethal concentrations. For the statistical analysis, the normality and the homogeneity of variances were evaluated by the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Data were analyzed by Student's t-tests, Welch-corrected ANOVA and Games-Howell post-hoc and Mann-Whitney non-parametric test ($\alpha = 0.05$) ($n = 12$). aPDT promoted a significant reduction ($p < 0.001$) of 4.5 \log_{10} for CaS and 4.42 \log_{10} for CaR. For CaS, the values of Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of fluconazole, curcumin and verapamil were 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 μM (7.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 4 mg/mL (4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectively; which promoted reductions of $\geq 1.4 \log_{10}$ at concentrations $\geq \text{MIC}$ ($p \leq 0,045$). For CaR, fluconazole and verapamil showed MIC values of 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 4 mg/mL (4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectively; curcumin did not reduce the viability of CaR, whereas significant reduction $\geq 1.74 \log_{10}$ were observed for verapamil and fluconazole at $\geq \text{MIC}$ ($p < 0.001$). The association of verapamil + fluconazole at sub-MIC of 2 mg/mL (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, for CaS, and 2 mg/mL (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, for CaR showed higher reduction ($p < 0.001$) for CaR of 4.08 \log_{10} compared to CaS ($p < 0.001$; 0.59 \log_{10}). The association of curcumin + fluconazole at 10 μM (3.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, for CaS and at 40 μM (14.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, for CaR promoted higher reduction for CaR ($p < 0.001$) of 2.28 \log_{10} than for CaS ($p < 0.001$) of 1.58 \log_{10} . The association of curcumin, verapamil, and fluconazole at the same concentrations showed reduction ($p < 0.001$) of 0.77 \log_{10} for CaS and 2.86 \log_{10} for CaR. In conclusion, aPDT significantly reduced the viability of CaS and CaR. Verapamil and curcumin reversed the resistance of *C. albicans* to fluconazole in planktonic cultures, having a higher inhibitory effect for CaR than CaS.

Keywords: Membrane transport proteins. Candidiasis. Drug resistance, microbial. Antifungal agents. Photochemotherapy.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Graus Célsius
µg	<i>Microgramas</i>
µL	Microlitro
aPDT	Terapia Fotodinâmica antimicrobiana
CaR	<i>Candida albicans</i> resistente
CaS	<i>Candida albicans</i> susceptível
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
cm ²	Centímetro quadrado
CUR	Curcumina
DMSO	Dimetilsulfóxido
FLU	Fluconazol
FS	Fotossensibilizador
h	Horas
J	Joules
LED	Luz emitida por Diodo
M	Molar
mg	miligramas
mL	mililitros
mW	miliWatts
nm	Nanômetro
Rpm	Rotações por minuto
u.a.	unidades arbitrárias
UFC	Unidades Formadora de Colônias
VER	Verapamil
Log	logarítmico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 Candidíase	18
3.2 Sistema de Efluxo – Inibidores de Sistema de Efluxo.....	21
3.3 Curcumina e Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)	31
4 MATERIAL E MÉTODO	37
4.1 Material	37
4.1.1 Material de consumo.....	37
4.1.2 Instrumentais.....	38
4.1.3 Equipamentos.....	38
4.2 Métodos.....	39
4.2.1 Preparo dos fármacos.....	39
4.2.2 Fonte de luz	40
4.2.3 Micro-organismos, Condições de Cultivo e Desenvolvimento de Culturas Planctônicas.....	41
4.2.4 Toxicidade de DMSO	43
4.2.5 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)	43
4.2.6 Contagem do número de colônias viáveis	44
4.2.7 Teste de susceptibilidade.....	45
4.2.8 Inibição de sistemas de efluxo.....	47
4.3 Análise Estatística	49
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Toxicidade de DMSO.....	50
5.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	50

5.3 CIM e CFM de Fluconazol, Verapamil e Curcumina.....	51
5.4 Inibição de sistemas de efluxo.....	54
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICE.....	69

1 INTRODUÇÃO

A candidíase bucal é a infecção fúngica mais comum que acomete os humanos e cujo principal fator etiológico são os fungos do gênero *Candida*, sendo *Candida albicans* a espécie mais prevalente¹. Os fatores de risco para essa infecção incluem o uso de próteses dentárias, antibióticos, medicamentos imunossupressores e também condições sistêmicas, como diabetes, deficiências nutricionais e câncer². *C. albicans* é um fungo oportunista que tem como fator de virulência a capacidade de alterar sua morfologia de levedura (forma inerte) para forma filamentosa de hifas ou pseudohifas (invasiva, infecciosa), conhecida como polimorfismo³. Além disso, antes do surgimento dos antiretrovirais, a candidíase bucal já foi considerada uma indicadora do desenvolvimento de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), por afetar cerca de 90% dessa população⁴. Tem sido demonstrado que acima de 90% dos casos de fungemia são atribuídos às espécies de *Candida*, e que o número de mortes como resultado dessa infecção varia de 40% a quase 80% em pacientes imunossuprimidos^{5,6,7}.

O tratamento convencional da candidíase bucal envolve a utilização de medicamentos tópicos ou sistêmicos. Os medicamentos mais utilizados são os polienos (nistatina, anfotericina B), que alteram a permeabilidade da membrana fúngica, e os azóis que inibem a biossíntese de ergosterol, os quais podem ser divididos em imidazólicos (clotrimazol, miconazol e cetoconazol) e triazólicos (fluconazol e itraconazol)⁸⁻¹¹. Existe também a classe de antifúngicos equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina), os quais inibem a síntese do β -1,3 glucano da parede celular fúngica¹¹. Os agentes tópicos, apesar de serem muitas vezes efetivos, têm sua concentração reduzida a valores subterapêuticos devido aos efeitos diluentes da saliva e à ação de limpeza da musculatura bucal. Já os medicamentos sistêmicos podem promover efeitos colaterais hepatotóxicos e/ou nefrotóxicos^{12,13}, o que requer muita cautela em sua prescrição. Além disso, o uso indiscriminado dos agentes antifúngicos tem levado ao desenvolvimento de cepas resistentes.

Clinicamente, a resistência aos antifúngicos é um conceito que descreve a falha de uma terapia antifúngica que resulta na persistência ou progressão da infecção¹³. Em termos laboratoriais, a resistência antifúngica é determinada pela Concentração

Inibitória Mínima (CIM), em que o crescimento do micro-organismo é mensurado por uma série de concentrações do agente antimicrobiano ao longo de um período de tempo definido de acordo com protocolos padrões¹⁴. A menor concentração do medicamento que inibe o crescimento microbiano, geralmente em 50% ou 90%, é definido como CIM. Atualmente, a resistência microbiana é uma ameaça mundial e uma das maiores preocupações da área da saúde⁸.

Embora a resistência de *C. albicans* aos agentes polienos seja rara³ muitos mecanismos de resistência aos azóis têm sido reportados, como mutações genéticas que promovem alterações no alvo da droga, superexpressão de transportadores multidrogas da membrana plasmática (também denominada bombas de efluxo) e sinalização de vias de respostas ao estresse celular^{3,13,15}. As bombas de efluxo ou sistemas de efluxo microbiano transportam de maneira ativa substâncias tóxicas para fora da célula e têm sido amplamente reconhecidos como os principais mecanismos de resistência microbiana a muitas classes de antimicrobianos^{3,16}. Esses sistemas de efluxo são, na verdade, sistemas de transporte celulares responsáveis pela comunicação da célula com o meio ambiente, permitindo a captação de nutrientes e íons essenciais à célula como também a excreção de produtos finais do metabolismo e substâncias tóxicas à célula¹⁷. Existem duas principais classes de sistemas de efluxo microbiano da membrana plasmática que são clinicamente importantes: as classes de transportadores dependentes de energia, ou super-família de transportadores ABC (do inglês *ATP-binding cassette*), e a classe de transportadores ou super-família de maiores facilitadores (do inglês *MFS, major facilitator superfamily*)¹⁸. Foram identificados 28 genes associados a 28 proteínas pertencentes à classe de transportadores ABC, e 95 genes e proteínas dos transportadores MFS dos quais somente 2 (dois) estão relacionados ao efluxo de drogas^{19,20}. Entretanto somente os transportadores ABC Cdr1p e Cdr2p e o transportador MFS Mdr1p são os principais responsáveis pela resistência aos azóis^{18,21}. Apesar da importância desses sistemas de transportes para a viabilidade celular, a superexpressão desses sistemas acarreta em resistência microbiana.

Devido aos problemas apresentados pelos tratamentos atualmente disponíveis, alternativas antimicrobianas têm sido pesquisadas, como a Terapia Fotodinâmica (do inglês, *Photodynamic Therapy* ou PDT)^{22,23} que utiliza a associação de um agente

fotossensibilizador (FS) a uma fonte de luz de comprimento de onda adequado. A interação entre o FS e a luz na presença do oxigênio resulta na produção de espécies reativas tóxicas, principalmente o oxigênio singlete, e radicais livres que promovem dano e morte celulares^{23,24,25}. Historicamente, a associação de substâncias químicas e luz foi relatada no final do século XIX por Oscar Raab, o qual investigou o efeito antimicrobiano dos corantes eosina e acridina, na presença de luz, sobre *Paramecium caudatu*²⁵, e hoje a PDT tem sido utilizada no tratamento de câncer como um método de inativação de células neoplásicas²⁶. Os primeiros FS utilizados (derivados da porfirina e corantes fenotiazínicos, como azul de toluidina e azul de metileno) são conhecidos como FS de primeira geração. Com intuito de se aumentar a eficácia da aPDT, FS mais recentes, conhecidos como de segunda e terceira geração, têm sido investigados, como as ftalocianinas²⁷ e clorinas²⁸. Além disso, compostos naturais como a curcumina tem mostrado um grande potencial de aplicação para fotoinativação fúngica, inclusive de *C. albicans*^{29,30}. A curcumina é um composto fenólico (diferulometano) de baixo peso molecular isolado dos tubérculos da *Curcuma longa L.* e um dos componentes presente no açafrão. Tem sido demonstrado que, isoladamente, a curcumina já apresenta efeito antifúngico contra *C. albicans*³¹, e estudos recentes verificaram que esse efeito é potencializado quando a curcumina é utilizada como FS associada à luz^{29,30}.

Algumas abordagens têm sido propostas para enfrentar a resistência às drogas antimicrobianas mediada pelos sistemas de efluxo, as quais incluem: uso de drogas antifúngicas que não são substratos dos sistemas de efluxo (como equinocandinas), inibição do suprimento de energia e inibição farmacológica direta dos sistemas de efluxo^{32,33,34}. Alguns estudos demonstraram que determinadas substâncias podem ser usadas para inibir as bombas de efluxo presentes na membrana plasmática fúngica, como a própria curcumina³⁵ e também verapamil^{34,36}, ibuprofeno³⁷, farnesol³⁸, monoterpenos (timol e carvacrol)³⁹, FK506⁴⁰, unarmicinas A e C⁴¹, derivados de chalcona⁴², disulfiram⁴³ e algumas milbemicinas⁴⁴. Um desses inibidor do sistema de efluxo microbiano que tem sido bastante investigado é o verapamil, um bloqueador dos canais de cálcio pertencente à classe fenilalquilamina utilizado no tratamento de hipertensão⁴⁵ e angina pectoris⁴⁶, que tem sido empregado também para inibição das bombas de efluxo de espécies bacterianas³².

Assim, verifica-se que a utilização de inibidores dos sistemas de efluxo e a aPDT são métodos potenciais para o combate da resistência fúngica. Portanto, as hipóteses do presente estudo consideram que cepas de *C. albicans* susceptível e resistente à fluconazol (1) possam apresentar diferente susceptibilidade à aPDT mediada pela curcumina, e que (2) a utilização de inibidores dos sistemas de efluxo (curcumina e verapamil) possam potencializar a ação antifúngica do fluconazol e reverter a resistência fúngica.

7.CONCLUSÕES

- A aPDT mediada pela curcumina e luz LED foi efetiva para redução da viabilidade de ambas cepas de *C. albicans*, as quais mostraram valores de redução em \log_{10} similares. Para CaS, a curcumina sozinha também promoveu redução de viabilidade, o que não foi observado para CaR;
- Em culturas planctônicas, os inibidores das bombas de efluxo (verapamil e curcumina), em concentrações sub-inibitórias, aumentaram a susceptibilidade de ambas as cepas ao fluconazol. Esse efeito sinérgico foi maior para CaR para ambas combinações, ou seja, houve reversão da resistência ao fluconazol, sendo que o verapamil foi mais efetivo do que a curcumina. A associação concomitante dos dois inibidores (verapamil e curcumina) com o fluconazol não promoveu maior redução das cepas utilizadas.

REFERÊNCIAS*

1. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. J Med Microbiol. 2013; 62(Pt 1):10-24.
2. Rautemaa R, Ramage G. Oral candidosis-clinical challenges of a biofilm disease. Crit Rev Microbiol. 2011; 37(4):328-36.
3. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. Microbiol Mol Biol Rev. 2011; 75(2): 213-67.
4. Patuwo C, Young K, Pardi V, Murata RM. The changing role of HIV-associated oral candidiasis in the era of HAART. J Calif Dent Assoc. 2015; 43(2):87-92.
5. Palmer GD, Robinson PG, Challacombe SJ, Birnbaum W, Croser D, Erridge PL. Aetiological factors for oral manifestations of HIV. Oral Dis. 1996; 2(3):193-7.
6. Costa SF, Marinho I, Araújo EAP, Manrique AEI, Medeiros EAS, Levin AS. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. J Hosp Infect. 2000; 45(1):69-72.
7. Dimopoulos G, Karabinis A, Samonis G, Falagas M.E. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007; 26(6):377-84.
8. Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S, Cohen J, et al. The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. New Microbes New Infect. 2015; 6(1): 22-9.
9. Muzyka BC, Glick M. A review of oral fungal infections and appropriate therapy. J Am Dent Assoc 1995; 126(1): 63-72.

* 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-normalizacao-atualizado.pdf>

10. Vergani CE, Sanitá PV, Mima EG, Pavarina AC, Machado AL. Oral candidiasis: conventional and alternative treatment options. In: Contreras F, Fluentes P. *Candidiasis: epidemiology, symptoms and treatment options*. UK: Nova Biomedical; 2013.
11. Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9(9): 719-27.
12. Scully CM, Kabir EL, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1994; 5(2): 125-57.
13. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11(2): 382-402.
14. Clinical and Laboratory Institute Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. 3rd ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Institute; 2008.
15. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, et al. *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiology*. 2007;153 (10): 3211- 7.
16. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56(1): 20- 51.
17. Pao SS, Paulsen IT, Saier MHJr. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62(1): 1- 34.
18. Prasad R, Gaur M, Komath SS. Efflux pumps in drug resistance of *Candida*. *Infect Disord Drug Targets*. 2006; 6(2): 69- 83.
19. Gaur M, Choudhury D, and Prasad R. Complete inventory of ABC proteins in human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2005; 9(1): 3- 15.
20. Gaur M, Puri N, Manoharlal R, Rai V, Mukhopadhyay G, Choudhury D, et al. MFS transportome of the human pathogenic yeast *Candida albicans*. *BMC Genomics*. 2008; 9:579.
21. Sanglard D, Odds FC. Reviews resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis*. 2002; 2(2): 73-85.

22. Gonzales FP, Maisch T. Photodynamic inactivation of microorganisms as an innovative approach to kill mucocutaneous and skin microorganisms. *G Ital Dermatol Venereol.* 2010; 145(4): 477-89.
23. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral Biofilms. *Periodontol 2000.* 2011; 55(1): 143- 66.
24. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008; 163(1): 1-12.
25. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006; 38(5): 468-81.
26. Konopka K, Goslinsk T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007; 86(8): 694-707.
27. Mantareva V, Angelov I, Kussovski V, Dimitrov R, Lapok L, Wihrlé D. Photodynamic efficacy of water-soluble Si(IV) and Ge(IV) phthalocyanines towards *Candida albicans* planktonic and biofilm cultures. *Eur J Med Chem.* 2011; 46(9): 4430- 40.
28. Strakhovskaya MG, Belenikina NS, Ivanova EV, Chemeris YuK, Stranadko EF. The photodynamic inactivation of the yeast *Candida guilliermondii* in the presence of photodithazine. *Mikrobiologija.* 2002; 71(3): 298- 301.
29. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol.* 2011; 87(4): 895-903.
30. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, MacHado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med.* 2011; 43(9): 927- 34.
31. Martins CV, Da Silva DL, Neres ATM, Magalhães TFF, Watanabe GA, Modolo LV, et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63(2): 337- 9.
32. Kishen A, Upadya M, Tegos GP, Hamblin MR. Efflux pump inhibitor potentiates antimicrobial photodynamic inactivation of *Enterococcus Faecalis* biofilm. *Photochem Photobiol.* 2010; 86(6): 1343- 9.
33. Pina V, Rodrigues AG, Costa de Oliveira S, Ricardo E, Mårdh PE. 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; 56(4): 678- 85.
34. Prates RA, Kato IT, Ribeiro MS, Tegos GP, Hamblin M.R. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(7): 1525- 32.
 35. Sharma M, Manoharlal R, Shukla S, Puri N, Prasad T, Ambudkar S. Curcumin modulates efflux mediated by yeast ABC multidrug transporters and is synergistic with antifungals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(8): 3256-65.
 36. Yu Q, Ding X, Xu N, Cheng X, Qian K, Zhang B, et al. In vitro activity of verapamil alone and in combination with fluconazole or tunicamycin against *Candida albicans* biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2013; 41(2): 179- 82.
 37. Rircardo E, De Oliveira SC, Dias AS, Guerra J, Rodrigues AG, Pina C. Ibuprofen reverts antifungal resistance on *Candida albicans* showing overexpression of CDR genes. *FEMS Yeast Res.* 2009; 9(4): 618- 25.
 38. Sharma M, Prasad R. The quorum-sensing molecule farnesol is a modulator of drug efflux mediated by ABC multidrug transporters and synergizes with drugs in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(10): 4834- 43.
 39. Ahmad A, Khan A, Manzoor N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *Eur J Pharm Sci.* 2013; 48(1-2): 80-6.
 40. Egner R, Bauer BE, Kuchler K. The transmembrane domain 10 of the yeast Pdr5p ABC antifungal efflux pump determines both substrate specificity and inhibitor susceptibility. *Mol Microbiol.* 2000; 35(5): 1255- 63.
 41. Tanabe K, Lamping E, Adachi K, Takano Y, Kawabata K, Shizuri Y, et al. Inhibition of fungal ABC transporters by unnarmicin A and unnarmicin C, novel cyclic peptides from marine bacterium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 364(4): 990- 5.
 42. Łacka I, Konieczny MT, Bułakowska A, Kodedová M, Gašková D, Maurya IK, et al. Chemosensitization of multidrug resistant *Candida albicans* by the oxathiolone fused chalcone derivatives. *Front Microbiol.* 2015; 6(8): 1- 10.
 43. Shukla S, Zuben ES, Prasad R, Ambudkar SV. Disulfiram is a potent modulator of multidrug transporter Cdr1p of *Candida albicans*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 322(2): 520- 5.

44. Lamping E, Ranchod A, Nakamura K, Tyndall J, Niimi K, Holmes AR, et al. Abc1p is a multidrug efflux transporter that tips the balance in favor of innate azole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(2): 354-69
45. Kaplan NM. Calcium entry blockers in the treatment of hypertension. current status and future prospects. *JAMA*. 1989; 262(6): 817- 23.
46. Brogden RN, Benfield P. Verapamil: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in coronary artery disease. *Drugs*. 1996; 51(5): 792- 819.
47. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284(5418): 1318- 22.
48. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001; 80(3): 903- 8.
49. Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res*. 2010; 89(3):205-18.
50. Kucharíková S, Tourneu H, Lagrou K, Dijck P, Bujdáková B. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. *J Med Microbiol*. 2011; 60(9): 1261-9.
51. Murjerker, Pranab K, Chandra J, Kuhn D, Ghannoum M. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun*. 2003; 71(8): 4333- 40.
52. 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(1): 26- 32.
53. Yu Qilin, Chenpeng Xiao, Kailun Zhang, Chang Jia, Xiaohui Ding, Bing Zhang, et al. The calcium channel blocker verapamil inhibits oxidative stress response in *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 2014; 177(3–4): 167- 77.
54. Yu Qilin, Ding X, Zhang B, Xu N, Jia C, Mao J, et al. Inhibitory effect of verapamil on *Candida albicans* hyphal development, adhesion and gastrointestinal colonization. *FEMS Yeast Res*. 2014; 14(4): 633- 41.
55. Reis de Sá LF, Toledo FT, Gonçalves AC, Sousa BA, dos Santos AA, Duarte da Silva VA, Tassis AC, Ramos JA, Carvalho MA, Lamping E, Ferreira-Pereira A.

- Synthetic organotellurium compounds sensitize drug resistant *Candida albicans* clinical isolates to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 61(1): 1231-16.
56. Nazik H, Choudhary V, Stevens DA. Verapamil inhibits aspergillus biofilm, but antagonizes voriconazole. *J Fungi.* 2017; 3(3): 50.
57. Tran-Nguyen, Prasad R, Falson P, Boumendjel A. Modulators of the efflux pump CDR1P of *Candida albicans*: mechanisms of action and chemical features. *Curr Med Chem.* 2017; 24(30): 3242-53.
58. Mima EG, Pavarina AC, Silva M, Ribeirão DG, Vergani CE, Kurachi C, et al. Denture stomatitis treated with photodynamic therapy: five cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112(5): 602-8.
59. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000.* 2011; 55(1):143-66.
60. Andrade MC, Carvalho M, Ribeiro D, Dovigo LN, Brunetti I, Giampaolo ET, et al. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* Spp. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(2): 200- 10.

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 6 de Agosto de 2020

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara 6 de Agosto de 2018

Yuliana Del Pilar Vega Chacón