



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**JULIANA CAPARROZ GONÇALE**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAL  
E DESOXICOLATO DE ANFOTERICINA B SOBRE ESPÉCIES DE  
*Candida*: estudo *in vitro* e *in vivo* em *Galleria mellonella***

2022

**JULIANA CAPARROZ GONÇALE**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAL E  
DESOXICOLATO DE ANFOTERICINA B SOBRE ESPÉCIES DE *Candida*: estudo  
*in vitro* e *in vivo* em *Galleria mellonella***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Microbiologia / Imunologia . Linha de pesquisa: Agentes antimicrobianos e métodos de controle para infecção de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira  
Coorientadora: Dra. Lívia Mara Alves Figueiredo Godoi

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Gonçale, Juliana Caparroz

Avaliação da eficácia das formulações lipossomal e desoxicolato de anfotericina B sobre espécies de Candida: estudo in vitro e in vivo em *Galleria mellonella* / Juliana Caparroz Gonçale. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.

67 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Aplicada à Odontologia - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientador: Juliana Campos Junqueira

Coorientador: Lívia Mara Alves Figueiredo-godoi

1. Anfotericina B. 2. Anfotericina B lipossomal. 3. Anfotericina B desoxicolato . 4. Candida. 5. Biofilme. I. Junqueira, Juliana Campos, orient. II. Figueiredo-godoi, Lívia Mara Alves, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira** (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus São José dos Campos

**Dra. Junya de Lacorte Singulani**

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Campus Belo Horizonte

**Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus São José dos Campos

São José dos Campos, 05 de agosto de 2022.

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos (UNESP) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal (CASB), pela oportunidade e suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de Mestrado no período de 01/06/2020 a 31/07/2021 e 01/03/2022 a 31/07/2022.

À minha orientadora, Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira, agradeço a paciência, apoio e confiança. Sua competência e organização, foram essenciais na minha formação. A minha eterna gratidão, respeito e admiração.

À minha coorientadora, Dra. Lívia Mara Alves Figueiredo Godoi, por estar ao meu lado, contribuindo para o meu desenvolvimento profissional e pessoal. Sua competência, clareza e dedicação me deram a certeza de que tudo daria certo.

Aos membros da banca, que disponibilizaram o seu tempo e conhecimento para a leitura desta dissertação, e por toda contribuição para melhora da qualidade deste trabalho.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal, especialmente a Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira, pela recepção e incentivo no início desta jornada.

A Profa. Dra. Liliana Scorzoni por sua colaboração orientação e disponibilidade para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Assoc. Cláudio Antonio Talge Carvalho, Lucas Nakashima e Marina Tiburcio, pela oportunidade de lecionar no projeto de extensão “Prevest - Cursinho Pré-vestibular da Unesp”.

À Professora Marianne Spalding, pelo aprendizado, durante a organização e desenvolvimento de atividades no projeto de extensão “Inverno na Universidade”.

A toda minha família que de alguma forma contribuiu para a realização deste trabalho. Especialmente meu esposo Ivandilson e minha filha Júlia, pois sem eles eu jamais teria chegado até aqui.

Às minhas Professoras de graduação Khesler Patrícia Olázia Name e Nadia Cristina Lima, por fazerem parte da minha jornada acadêmica e por vibrarem com minhas conquistas. Obrigada pelo carinho.

À minha amiga Pâmela Beatriz, pelo apoio, disponibilidade e amizade. Minha eterna gratidão.

Ao Dr. Felipe de Camargo Ribeiro, pela atenção, disponibilidade e profissionalismos ao responder todas as minhas dúvidas após as aulas ministradas.

Aos meus amigos de laboratório, Evelyn, Máira, Paulo, Patrícia, Gabriela, Amanda, Letícia, Lilian, Amanda Siqueira, Maria Fernanda, Rafael, Fernanda, Lara, Milena e Eric. Fazer parte deste grupo de pesquisa foi a realização de um sonho. Obrigada pelo ambiente acolhedor, carinho e colaboração.

Às minhas amigas do LANA Thaís Cristine, Sabrina Liberato, Vanessa Mecatti e Ellen Bessa pela disposição em colaborar, compartilhando conhecimento e também pelos momentos de descontração.

A todos os funcionários do ICT-Unesp que colaboraram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos, que fazem parte da minha vida fora da pesquisa, mas que foram apoio imprescindível nesta importante etapa, muito obrigada!

## RESUMO

Gonçale JC. Avaliação da eficácia das formulações lipossomal e desoxicolato de anfotericina B sobre espécies de *Candida*: estudo *in vitro* e *in vivo* em *Galleria mellonella* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

Anfotericina B pertence a primeira classe (polienos) de medicamentos antifúngicos introduzidos no mercado. O amplo espectro de ação e a baixa taxa de resistência microbiana, definiram a anfotericina B como tratamento de escolha para as infecções graves por *Candida* spp. Porém, os efeitos colaterais causados pela sua toxicidade impulsionaram o desenvolvimento de novas formulações a base de lipídios. Assim, o objetivo desse estudo foi comparar os efeitos antifúngicos da formulação lipossomal da anfotericina B (AmB-L) com a formulação convencional de anfotericina B desoxicolato (AmB-D). Para isso a atividade antifúngica foi testada sobre diferentes espécies de *Candida*, incluindo *Candida albicans* (cepa clínica 70), *Candida glabrata* (cepa clínica 64), *Candida tropicalis* (cepa clínica 11) e *Candida parapsilosis* (cepa ATCC 90018), utilizando-se métodos de estudo *in vitro* e *in vivo*. Em estudo *in vitro*, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) em células planctônicas por meio do método de microdiluição em caldo. A seguir, concentrações de 10x, 20x e 50x a CIM foram testadas sobre os biofilmes de *Candida*, verificando-se seus efeitos pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Para o estudo *in vivo*, foi utilizado o modelo invertebrado *Galleria mellonella*. Os animais foram infectados por *Candida* e tratados com as formulações de anfotericina B, então foram monitorados diariamente para determinação da curva de sobrevivência e índice de saúde. Os resultados dos testes *in vitro* demonstraram atividade antifúngica semelhante entre AmB-L e AmB-D em crescimento planctônico. Ambas as formulações apresentaram valores de CIM de 0,5 µg/mL para *C. albicans* e *C. parapsilosis*, e de 1 µg/mL para *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Nos biofilmes, AmB-D apresentou maior atividade inibitória em relação à AmB-L, para todas as cepas de *Candida* estudadas. Nos testes *in vivo*, o tratamento com AmB-L ou AmB-D aumentou a sobrevivência e índice de saúde das larvas infectadas por *Candida*, sendo observada maior eficácia da formulação AmB-D em relação à AmB-L. Portanto, concluiu-se que AmB-L e AmB-D apresentam a mesma efetividade sobre células planctônicas, mas AmB-D mostrou maior ação antifúngica sobre biofilmes e infecção experimental no modelo *G. mellonella*.

Palavras-chave: anfotericina B; anfotericina B lipossomal; anfotericina B desoxicolato; *Candida*; biofilme.

## ABSTRACT

Gonçale JC. Evaluation of the efficacy of liposomal and deoxycholate amphotericin B formulations on Candida species: *in vitro* and *in vivo* study in Galleria mellonella [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

Amphotericin B belongs to the first class (polyenes) of antifungal drugs introduced commercially. The broad spectrum of action and the low rate of microbial resistance have defined amphotericin B as the treatment of choice for serious infections by Candida spp. However, the side effects caused by toxicity stimulated the development of new formulations based on lipids. Thus, the aim of this study was to compare the antifungal effects of the liposomal amphotericin B formulation (AmB-L) with the conventional formulation deoxycholate amphotericin B (AmB-D). For this, the antifungal activity was tested on different Candida species, including Candida albicans (clinical strain 70), Candida glabrata (clinical strain 64), Candida tropicalis (clinical strain 11) and Candida parapsilosis (ATCC strain 90018), using *in vitro* and *in vivo* study methods. In *in vitro* tests, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the broth microdilution method. Next, concentrations of 10x, 20x and 50x the MIC were tested on Candida biofilms, verifying their effects by counting colony-forming units (CFU). For the *in vivo* study, the Galleria mellonella invertebrate model was used. The animals were infected with Candida and treated with amphotericin B formulations, then monitored daily to determine the survival curves and health index score. The results of *in vitro* tests demonstrated similar antifungal activity between AmB-L and AmB-D in planktonic cells. Both formulations showed MIC values of 0.5 µg/mL for C. albicans and C. parapsilosis, and 1 µg/mL for C. glabrata and C. tropicalis. In biofilms, AmB-D showed greater inhibitory activity in relation to AmB-L for all Candida strains studied. In *in vivo* tests, the treatment with AmB-L or AmB-D increased the survival and health index of larvae infected by Candida, with greater efficacy for the AmB-D formulation in relation to AmB-L. Therefore, it was concluded that AmB-L and AmB-D have the same effectiveness on planktonic cells, but AmB-D showed greater antifungal action on biofilms and experimental infection in the G. mellonella model.

Keywords: amphotericin B; liposomal amphotericin B; deoxycholate amphotericin B; Candida; biofilm.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 Gênero <i>Candida</i></b> .....	<b>14</b>
<b>2.2 Biofilme</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3 Antifúngicos</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4 <i>Galleria mellonella</i></b> .....	<b>20</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>23</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1 Cepas e condições de cultivo</b> .....	<b>24</b>
<b>4.2 Antifúngicos</b> .....	<b>24</b>
<b>4.3 Suscetibilidade antifúngica <i>in vitro</i> das células planctônicas</b> .....	<b>25</b>
<b>4.4 Estudo <i>in vitro</i> em biofilme</b> .....	<b>26</b>
<b>4.4.1 Formação dos biofilmes de <i>Candida</i></b> .....	<b>26</b>
<b>4.4.2 Tratamento dos biofilmes com AmB-L e AmB-D</b> .....	<b>27</b>
<b>4.4.3 Contagem das células viáveis de <i>Candida</i></b> .....	<b>27</b>
<b>4.5 Estudo <i>in vivo</i> em <i>G. mellonella</i></b> .....	<b>27</b>
<b>4.5.1 Preparo das larvas de <i>G. mellonella</i></b> .....	<b>28</b>
<b>4.5.2 Ensaio de susceptibilidade de <i>G. mellonella</i> à infecção por <i>Candida</i> spp.</b> .....	<b>28</b>
<b>4.5.3 Ensaio de toxicidade de AmB-L e AmB-D L em <i>G. mellonella</i></b> .....	<b>29</b>
<b>4.5.4 Tratamento das larvas de <i>G. mellonella</i> com AmB-L e AmB-D.</b> .....	<b>29</b>
<b>4.5.5 Determinação da curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> após o tratamento com AmB-L e AmB-D</b> .....	<b>30</b>
<b>4.5.6 Análise do índice de saúde das larvas de <i>G. mellonella</i> após o tratamento das infecções por <i>Candida</i> spp. com AmB-L e AmB-D.</b> .....	<b>30</b>
<b>4.6 Análise estatística</b> .....	<b>31</b>
<b>5 RESULTADO</b> .....	<b>32</b>
<b>5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima em células planctônicas</b> .....	<b>32</b>

5.2 Comparação da atividade antifúngica de AmB-L e AmB-D sobre os biofilmes de <i>Candida</i> spp. ....	33
5.3 Ensaio de susceptibilidade de <i>G. mellonella</i> à infecção por <i>Candida</i> spp. ....	37
5.4 Ensaio de toxicidade de AmB-L e AmB-D em <i>G. mellonella</i> . ....	40
5.5 Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i> após o tratamento da infecção por <i>Candida</i> com AmB-L e AmB-D .....	40
5.6 Índice de saúde de <i>G. mellonella</i> após o tratamento da infecção por <i>Candida</i> com AmB-L e AmB-D .....	44
6 DISCUSSÃO .....	53
7 CONCLUSÃO .....	58
REFERÊNCIAS .....	59

## 1 INTRODUÇÃO

O corpo humano apresenta microbiota residente composta por diversos microrganismos, incluindo bactérias e fungos. O gênero *Candida* é composto por fungos comensais presentes na pele, mucosa oral, vaginal e gastrointestinal. No estado de deficiência do sistema imune ou desequilíbrio da microbiota residente, podem causar candidoses, sendo então considerados patógenos oportunistas (Köhler et al., 2017; Wall et al., 2019).

Dentro do gênero, *Candida albicans* é a espécie mais comum, porém espécies não *albicans* como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida dubliniensis*, também são apontadas como causa de infecções (Doi et al., 2016). Em 2009, *Candida auris* foi identificada como uma nova espécie do gênero (Satoh et al., 2019) e tem sido associada com doenças invasivas de considerável importância em ambientes hospitalares, principalmente por apresentarem mecanismos de resistência a várias classes de antifúngicos (Larkin et al., 2017).

Os grupos com maior suscetibilidade às infecções por *Candida* (candidoses) são compostos por indivíduos com sistema imunológico debilitado por infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e pacientes submetidos à transplantes de órgãos, tratamento quimioterápico para neoplasias ou terapia prolongada com antibióticos de largo espectro (Sroussi et al., 2017). Outro fator que pode favorecer o desenvolvimento das candidoses é o uso de dispositivos médicos-odontológicos, como próteses dentárias, cateteres venosos e sondas endotraqueais. (Pellon et al., 2020).

Para causar infecção no hospedeiro, o gênero *Candida* dispõe de mecanismos de patogenicidade que aumentam o seu potencial de colonização, invasão tecidual e evasão do sistema imune. Entre esses, os principais são: capacidade de aderência, dimorfismo, produção de enzimas proteolíticas e formação de biofilme. O processo que determina a transição de estado comensal inofensivo para fungo patogênico é multifatorial e está ligado à capacidade do gênero em se adaptar as diferentes condições impostas pelo organismo do hospedeiro (Brown et al., 2014; Vila et al., 2020).

Ao formar tubos germinativos, as células de *Candida* passam da forma leveduriforme para forma filamentosa, aumentando sua capacidade de fixação e nutrição. Após a mudança morfológica, as células fúngicas aderem-se firmemente às superfícies bióticas ou abióticas, formando um biofilme, o qual oferece maior resistência aos tratamentos antifúngicos e evasão do sistema imune. O biofilme é considerado a forma de crescimento mais prevalente e está frequentemente associado as infecções sistêmicas consideradas mais agressivas (Alim et al., 2018).

O tratamento das infecções causadas por *Candida* apresentam algumas limitações. Uma das dificuldades no tratamento das infecções fúngicas se devem às semelhanças bioquímicas e fisiológicas existentes entre as células do fungo e do hospedeiro. Esta característica torna a dose de antifúngico tóxica as células do hospedeiro, resultando em número limitado de fármacos disponíveis. Além desse fator, os mecanismos de resistência desenvolvidos por espécies de *Candida* podem tornar os tratamentos existentes ineficazes (Rojas et al., 2020). Assim, as espécies de *Candida* constituem um dos fungos patogênicos mais estudados em todo o mundo (Rodrigues, Albuquerque 2020; Wall et al., 2020).

As principais classes de antifúngicos disponíveis para uso em humanos são: polienos, azóis e equinocandinas. A classe dos polienos, representada pela anfotericina B, age principalmente ligando-se ao ergosterol, um componente da membrana citoplasmática fúngica. Essa ligação aumenta a permeabilidade, comprometendo a integridade da célula e levando à lise celular (Gray et al., 2012). A classe dos azóis atua impedindo a biossíntese do ergosterol e apresenta menor toxicidade do que os polienos, porém possui alta taxa de resistência microbiana. As equinocandinas representam a classe mais recente de antifúngicos e atuam na inibição da síntese de  $\beta$ -(1,3) glucanas, presente na parede celular dos fungos. As equinocandinas possuem ampla atividade fungicida e baixa toxicidade, mas atualmente já existem cepas de *Candida* que desenvolveram resistência à essa classe de antifúngicos (Pais et al., 2019; Revie et al., 2018).

A anfotericina B foi descoberta no ano de 1956, e está comercialmente disponível para o uso como antifúngico desde 1965. Desde então, é considerada como tratamento de escolha para infecções fúngicas invasivas graves, pois apresenta amplo espectro de ação e baixa taxa de resistência microbiana (Cavassin et al., 2021). A primeira formulação de anfotericina B desoxicolato (AmB-D), aprovada pela *Food*

*and Drug Administration* (FDA) é conhecida comercialmente como Fungisone®. Nesta formulação, a anfotericina B está associada ao desoxicolato de sódio, que possui a função de promover a solubilidade da droga em solução aquosa, facilitando a ligação da parte hidrofóbica do fármaco ao ergosterol. Porém, esta afinidade não é específica, e pode ocorrer entre o fármaco e o colesterol, presente em células de mamíferos, causando toxicidade. Diante desta desvantagem, houve o interesse no desenvolvimento de novas formulações, buscando-se melhorar a eficácia e a segurança do tratamento com anfotericina B (Wall, Lopez-Ribot, 2020).

Então, na década de 1990, foram desenvolvidas novas formulações a base de lipídios, entre elas a anfotericina B lipossomal (AmB-L) registrada comercialmente como AmBisome®. Sua principal característica é a estabilidade físico-química proporcionada pela presença de colesterol em sua fórmula. A complexa estrutura formada por anfotericina B em lipossomas é capaz de atravessar a parede celular fúngica. Isso permite que a anfotericina B seja liberada diretamente na membrana celular do fungo, diminuindo a ligação ao colesterol e conseqüentemente causando menor toxicidade (Groll et al., 2019).

As diferenças entre as formulações de anfotericina B não se limitam apenas a toxicidade, mas também ao tempo de liberação nos tecidos do hospedeiro, o que pode influenciar no tratamento das infecções ligadas a formação do biofilme (Dorocka-Bobkowska et al., 2009). Deste modo, para comparar a eficácia das formulações é necessário testar seus efeitos em diferentes condições de crescimento fúngico, tanto em estudos *in vitro*, como *in vivo*.

Os testes *in vitro* de susceptibilidade das células planctônicas são conduzidos por normativas globais que descrevem metodologias e interpretação precisa dos seus resultados (Berkow et al., 2020; Rex et al., 1996). Porém, o mesmo não acontece com os testes de biofilmes (Soldini et al., 2018). Levando em consideração as implicações do biofilme nas infecções fúngicas, estabelecer metodologias de avaliação pode ser útil para a escolha da formulação adequada e o direcionamento da dose eficaz, uma vez que os biofilmes são mais resistentes aos antifúngicos (Rodrigues, Henriques 2017).

O modelo *in vivo* *Galleria mellonella*, tem sido amplamente utilizado para testes de eficácia de agentes antimicrobianos. Esses animais contam com a presença de seis tipos de células fagocitárias que podem ser monitoradas durante a infecção,

fornecendo parâmetros de resposta imunológica. Além disso, são de fácil manuseio e apresentam tamanho adequado para inoculação de doses exatas, tanto de patógenos quanto de fármacos (Scorzoni et al., 2013). Por todas estas qualidades, *G. mellonella* tornou-se uma opção viável para o estudo de fungos e comparações entre diferentes terapias (Jorjão et al., 2018).

Diante do exposto, esse trabalho teve por objetivo comparar a eficácia antifúngica das formulações de AmB-L e AmB-D sobre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, investigando seus efeitos em células planctônicas, biofilmes e modelo hospedeiro de *G. mellonella*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Gênero *Candida*

Os fungos do gênero *Candida* são polimórficos, podendo se apresentar na forma de levedura, hifa e pseudo-hifa. A transição entre as diferentes morfologias ocorre em resposta as condições impostas pelo organismo do hospedeiro, tais como: temperatura, valor de pH e presença de células do sistema imunológico. Tanta versatilidade permite a colonização de *Candida* em diferentes nichos, muitas vezes em um mesmo hospedeiro (Gonçalves et al., 2020).

Aproximadamente 17 espécies do gênero *Candida* podem acometer o homem de forma patogênica e causar diversos tipos de infecções, sendo *C. albicans* a espécie mais comum (Ciurea et al., 2021). No entanto, nas últimas décadas houve um aumento no isolamento de espécies não *albicans* relacionadas a infecções graves, devido principalmente à presença de resistência intrínseca às principais classes de antifúngicos por parte de algumas destas espécies (Dadar et al., 2018; Seyoum et al., 2020). Isso faz com que o gênero *Candida* represente um desafio permanente em ambientes hospitalares. No Brasil, pacientes internados por longos períodos apresentam taxa de mortalidade em torno de 50%. As espécies mais prevalentes destes casos são *C. albicans* (34,3%), *C. parapsilosis* (24,1%), *C. tropicalis* (15,3%) e *C. glabrata* (10,2%) (Doi et al., 2016).

*Candida* é considerada um microrganismo oportunista, pois só é capaz de causar infecção quando seus mecanismos de patogenicidade se sobressaem em relação as defesas naturais do hospedeiro (Witerden et al., 2017). Os fatores que levam a predisposição para o desenvolvimento das candidoses estão relacionados a deficiência do sistema imune e perturbações locais nos tecidos do hospedeiro, acometendo com frequência pacientes que fazem uso de medicamentos imunossupressores, antibióticos de amplo espectro, quimioterapia, radioterapia, sondas endotraqueais e portadores de doenças como HIV e diabetes (Pellon et al., 2020; Sroussi et al., 2017).

Um exemplo das complicações decorrentes da patogenicidade de *Candida* é o agravamento da doença causada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2), uma vez que a junção dos tratamentos terapêuticos invasivos e o uso de antibióticos e corticoides predispõe o surgimento de candidoses orofaríngeas. A falta de precisão no diagnóstico e a correta escolha do tratamento permitem a disseminação pela corrente sanguínea podendo levar o paciente a óbito (Arastehfar et al., 2020; Salehi et al., 2020).

As infecções causadas por *Candida* se dividem em: superficiais e sistêmicas. As infecções superficiais estão ligadas ao aumento de células fúngicas nos tecidos, que geralmente ocorrem na mucosa oral, vaginal ou pele do hospedeiro. Já as infecções sistêmicas ocorrem devido a disseminação do fungo através da corrente sanguínea e são associadas ao uso de dispositivos invasivos, que servem como substrato para a fixação das leveduras e subsequente formação do biofilme (Alvarez-Lerma et al., 2003).

Para causar infecção nos tecidos do hospedeiro, os fungos dispõem de mecanismos de patogenicidade, que aumentam seu potencial de colonização e invasão tecidual. A capacidade de aderência é mediada por proteínas expressas na superfície do fungo, que são codificadas principalmente pelos genes *ALS* (*agglutinin like-sense*) (Hoyer et al., 2008). *Candida* também produz e secreta diversas moléculas no meio extracelular (Witchley et al., 2019). Entre elas, as mais conhecidas e associadas com a virulência, são as enzimas hidrolíticas, incluindo as famílias de proteinases aspartil secretórias (Saps), fosfolipases e lipases, responsáveis pela invasão tecidual e aquisição de nutrientes (de Barros et al., 2017; Gil-Bona et al., 2015; Witchley et al., 2019).

Outro importante mecanismo de patogenicidade é a formação de biofilme (Singh et al., 2018). O biofilme ocorre quando as células planctônicas de vida livre se fixam a uma superfície biótica ou abiótica, e ao se tornarem permanentemente aderidas, passam a ser chamadas de células sésseis (Touil et al., 2018). Os biofilmes são considerados um desafio para o tratamento das candidoses, pois apresentam maior resistência aos antifúngicos, evasão do sistema imune e são fonte de disseminação de células que podem vir a colonizar outros nichos através da corrente sanguínea (Vila et al., 2016).

## 2.2 Biofilme

O biofilme é formado por comunidades de microrganismos fixos a uma superfície e envolvidos por uma matriz extracelular autoproduzida. A matriz funciona como uma barreira de proteção, sendo geralmente composta por carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Alim et al., 2018; Silva et al., 2009). As comunidades participantes do biofilme podem ser polimicrobianas, incluindo diferentes espécies fúngicas e bacterianas, ou por uma única espécie microbiana (Peters et al., 2012; Santos et al., 2016).

*C. albicans* está entre as espécies fúngicas mais encontradas como causa de infecções associadas ao biofilme, no entanto, *Candida guilliermondii*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* também são capazes de formar biofilme (Silva et al., 2009). O desenvolvimento do biofilme ocorre em quatro etapas: aderência de leveduras ao substrato, desenvolvimento de microcolônias, maturação em matriz extracelular e dispersão de células através da corrente sanguínea. Cada uma destas etapas é marcada por mudanças físicas, químicas e biológicas (Lohse et al., 2018; Nobile, Johnson, 2015).

Existem diferenças significativas na composição e estrutura do biofilme entre as espécies de *Candida*, que podem ser observadas por imagens de microscopia eletrônica de varredura. *C. albicans* apresenta um biofilme composto por uma grande quantidade de hifas emaranhadas, mas o mesmo não acontece com *C. glabrata* que possui um biofilme formado por leveduras recobrando a superfície de forma contínua (Rodrigues, Henriques, 2017). No biofilme maduro (48h) de *C. tropicalis* e *C. albicans* formados em discos de resina, podem ser encontradas hifas e leveduras, porém em proporções diferentes, onde *C. tropicalis* apresenta maior concentração de leveduras (de Barros et al., 2018).

Os biofilmes apresentam características distintas das células planctônicas, o que confere maior resistência física e suscetibilidade diminuída dos microrganismos aos antifúngicos. Portanto, os biofilmes contribuem para o agravamento das infecções sistêmicas (Srinivasan et al., 2014) e suas consequências são amplamente estudadas (Tan et al., 2017). Os mecanismos que regulam a resistência antifúngica do biofilme ainda não foram totalmente desvendados, mas em parte se deve a rigidez causada

pela alta densidade de células fúngicas e consequente redução da penetração dos agentes antifúngicos. Outra hipótese é a regulação negativa do gene responsável pela síntese do ergosterol o que implica na diminuição do alvo de alguns antifúngicos (Jensen et al., 2015; Prazynska, Gospodarek, 2014).

Os testes de susceptibilidade das células planctônicas são padronizados por normativas estabelecidas pelos comitês internacionais: *European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) que apontam pontos de corte, classificando as cepas como sensível ou resistente, de acordo com a concentração inibitória mínima (CIM) (Berkow et al., 2020). Para os biofilmes não existem normativas estabelecidas (Soldini et al., 2018), no entanto o conhecimento das particularidades dos biofilmes é resultado dos esforços de vários grupos de pesquisa, que ao longo de décadas vem trabalhando no desenvolvimento de ensaios reprodutíveis que otimizem a triagem de fármacos de acordo com a atividade antifúngica nos biofilmes (Almshawit et al., 2014; Chandra, Mukerjee, 2015).

O teste de formação de biofilmes em placas de 96 poços tem sido muito empregado em estudos *in vitro*, pois oferece resultados confiáveis e reprodutíveis, em curto período e com baixo custo. Para isso, as cepas microbianas previamente padronizadas são alocadas nos poços para que possam formar o biofilme, e em seguida é realizado o tratamento com o composto a ser avaliado. A quantificação das células do biofilme pós-tratamento, pode ser realizada por diversas metodologias, sendo as mais utilizadas: contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e conversão metabólica do corante formazan (XTT) (Chandra, Mukerjee, 2015; Costa-Ordini et al., 2017; Ramage et al., 2001, Marco-Zambrano et al., 2016; Singh et al., 2018).

A padronização de metodologias apresenta relevância clínica uma vez que os testes em biofilmes podem direcionar estratégias para evitar os eventos de resistência e efeitos colaterais associados à toxicidade de fármacos. Desse modo, estudos utilizando metodologias *in vitro* de biofilmes possibilitam a triagem de concentrações e formulações adequadas de antifúngicos, uma vez que os biofilmes exigem concentrações diferentes das células planctônicas (Pierce et al., 2008).

## 2.3 Antifúngicos

Assim como os seres humanos, os fungos são organismos eucariotos, e por compartilharem semelhanças químicas e físicas há um número limitado de alvos seletivos para o desenvolvimento de drogas antifúngicas. As três principais classes de antifúngicos disponíveis para o tratamento das candidoses são: polienos, azóis e equinocandinas. Apesar dos esforços, a descoberta de novos antifúngicos encontra-se estagnada uma vez que a mais recente classe de antifúngico foi lançada no mercado na década de 1990 (Rivie et al., 2018).

Os polienos, representados pela anfotericina B, se mantêm ao longo de 60 anos como o tratamento de escolha para as infecções graves causadas por diversos fungos, como *Geotrichum* spp., *Kodamaea ohmeri*, *Malassezia* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp., *Trichosporon* spp., *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. Produzida a partir da fermentação da bactéria *Streptomyces nodus*, a anfotericina B foi descoberta em 1956, tendo como alvo de ação o ergosterol presente na membrana celular fúngica. Ao se ligar ao ergosterol, a anfotericina B aumenta a permeabilidade da membrana causando lise e morte celular (Cavassin et al., 2021).

Apesar do principal mecanismo de ação da anfotericina B ser a ligação ao ergosterol, esse fármaco pode causar dano oxidativo pelo acúmulo de radicais livres na célula fúngica. Esta ação pró-oxidativa foi confirmada por análise de expressão gênica, a qual demonstrou que o antifúngico é capaz de induzir a expressão de genes de estresse (Chang et al., 2017). Outro efeito observado é a estimulação do sistema imune pela produção de citocinas inflamatórias, favorecendo a ativação de macrófagos, produção de superóxidos e óxido nítrico, responsáveis por melhorar a resposta do hospedeiro frente às infecções fúngicas (Cavassin et al., 2021).

A principal vantagem da anfotericina B é o largo espectro e a baixa taxa de resistência microbiana. Por outro lado, além da baixa biodisponibilidade oral a toxicidade é um grande problema, pois na formulação convencional da Anfotericina B contendo desoxicolato de sódio, a afinidade pelo ergosterol se estende ao colesterol das células de mamíferos. Por esse motivo a indústria farmacêutica tem se empenhando no desenvolvimento de novas formulações, que possam diminuir a toxicidade e seus efeitos colaterais. Dentre todas as formulações aprovadas pela FDA

até o momento, apenas três permanecem disponíveis: Anfotericina B desoxicolato, complexo lipídico de anfotericina B Abelcet® e Anfotericina B lipossomal AmBisome® (Adler-Moore et al., 2019).

A formulação lipossomal é um complexo iônico estável, composto por anfotericina B, fosfatidilcolina de soja hidrogenada, diestearoil fosfatidilglicerol, colesterol e  $\alpha$ -tocoferol. Esta associação garante um tempo de circulação maior e menor toxicidade ao paciente, permitindo assim a administração de doses maiores, o que pode significar um melhor desempenho contra infecções causadas por cepas resistentes e biofilmes em comparação as outras formulações (Liu et al., 2020).

Ao comparar a toxicidade de anfotericina B convencional e lipossomal *in vitro* através da determinação da taxa de hemólise em glóbulos vermelhos, AmB-L demonstrou ser significativamente menos tóxica que AmB-D (Liu et al., 2020). Em outro estudo realizado com células epiteliais, o uso da AmB-L mostrou-se não citotóxica em concentrações entre 1 e 256  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto AmB-D foi tóxica em concentrações menores, que corresponderam de 1 a 4  $\mu\text{g/mL}$  para células de linhagem celular de câncer epitelial cervical humano (HeLa) e 16  $\mu\text{g/mL}$  para células humanas de carcinoma escamoso (HSC-3) (Dorocka-Bobkowska, Konopka, 2009).

A baixa toxicidade de AmB-L é favorecida pelas características físico-químicas de seus componentes que formam um complexo estável (Adler-Moore et al., 2016). Através de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e criofixação, foi possível observar a passagem dos lipossomas intactos através da parede celular, atingindo a membrana plasmática de *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans* (Walker et al., 2018). Isso pode explicar a maior afinidade de AmB-L pelo ergosterol uma vez que a liberação do fármaco ocorre diretamente na membrana plasmática fúngica.

Em relação a eficácia antifúngica, existem vários estudos que compararam as formulações da anfotericina B lipossomal e convencional. No entanto, a maior parte desses estudos utilizaram testes de microdiluição em caldo em células planctônicas e sabe-se que vários fatores podem influenciar nos resultados, como o tipo de cepa e adaptações empregadas em cada pesquisa (Adler-Moore et al., 2019). Por isso é possível encontrar na literatura resultados controversos. Geralmente, os estudos com cepas de *Candida* mostram que a AmB-D possui uma maior atividade antifúngica do que AmB-L (Van De Ven et al., 2012; Leon et al., 2011 Takemoto et al., 2006). Em contrapartida, alguns estudos apresentam AmB-L com atividade antifúngica superior

a AmB-D (Herrada et al., 2021; Hull et al., 2012; Kuhn et al., 2002).

Sabe-se que o desempenho de várias drogas antifúngicas é menor em células em biofilmes do que em crescimento planctônico, com diferenças de CIM podendo variar entre 4 e 1000 vezes no gênero *Candida* (Taff et al., 2013). A resistência dos biofilmes está relacionada a múltiplos fatores, principalmente a dificuldade de penetração da droga antifúngica nos biofilmes. Foi relatado que a capacidade de penetração da anfotericina B é reduzida em torno de 35% nos biofilmes de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. O sequestro dos fármacos pelos glucanos presentes na matriz e a baixa difusão devido ao alto peso molecular de  $924.09 \text{ mol}^{-1}$  da anfotericina B, também são apontados como causas da resistência dos biofilmes (Singh et al., 2018).

## **2.4 *Galleria mellonella***

Além dos estudos *in vitro* em culturas planctônicas e em biofilmes, estudos *in vivo* em animais são essenciais para pesquisas relacionadas a eficácia de compostos antifúngicos. Os estudos em animais devem ser conduzidos antes da realização de estudos clínicos e devem atender os princípios dos 3Rs. A teoria dos 3Rs (*Replacement*, *Reduction* e *Refinement*) propõe a substituição, redução e refinamento sempre que possível dos modelos animais, a fim de garantir o bem-estar animal sem comprometer os avanços da ciência. Por isso, nos últimos anos a utilização de mamíferos como coelhos, ratos, camundongos, cães e macacos têm sido reduzidos devido as questões éticas, financeiras e práticas (MacArthur 2018). Como alternativa para experimentação *in vivo*, foram introduzidos os modelos de infecção em invertebrados. Entre as vantagens da utilização destes modelos em relação aos vertebrados estão benefícios éticos, baixos custos de manutenção, rapidez na obtenção de resultados, possibilidade da utilização de muitos animais por grupo e presença de resposta imune inata semelhante aos mamíferos (Smith, Casadevall, 2021).

Entre os invertebrados utilizados na pesquisa de infecções fúngicas, está o inseto *G. mellonella*, pois suas larvas apresentam várias vantagens em relação aos outros animais invertebrados, como: possibilidade de crescimento a  $37^\circ\text{C}$  que permite

o estudo de patógenos na mesma temperatura corporal humana; tamanho adequado para manipulação e experimentação; e precisão na inoculação de doses de patógenos e/ou fármacos (Catuli et al., 2019). Para a utilização de *G. mellonella* em pesquisa é necessário aderir a um protocolo de criação e manutenção, pois a dieta e outros fatores externos podem influenciar no sistema imune do animal e conseqüentemente nos resultados (Banville et al., 2012; Jorjão et al., 2018).

As respostas imunológicas de *G. mellonella* são divididas entre resposta celular e humoral. Participam da resposta celular os hemócitos presentes na hemolinfa do invertebrado, cuja função pode ser comparada aos neutrófilos de mamíferos, pois são capazes de fagocitar patógenos e formar nódulos. A resposta humoral ocorre através da melanização, coagulação e produção de peptídeos antimicrobianos (Pereira et al., 2018). Tais características permitem que as larvas de *G. mellonella* sejam utilizadas no estudo de tratamentos antimicrobianos e na compressão dos mecanismos de virulência de diversos microrganismos, entre eles os fungos do gênero *Candida* (Li et al., 2013).

Dentre os testes utilizados em *G. mellonella*, estão a determinação da curva de sobrevivência e pontuação do índice de saúde. Como resultado, estes testes oferecem respostas significativas sobre os fatores de virulência microbianos e eficácia de determinado tratamento. A inoculação do patógeno e/ou tratamento é feita nas pró-patas abdominais do animal, com auxílio de uma seringa, possibilitando a injeção diretamente na hemolinfa. A seguir, o processo de infecção é, normalmente, monitorado por até 7 dias. A curva de sobrevivência é feita por meio da contagem de larvas mortas a cada 24h. A pontuação do índice de saúde é determinada pela soma de pontuações dos seguintes critérios: sobrevivência, mobilidade, grau de melanização e capacidade de produzir casulo, sendo que uma larva saudável recebe no máximo 10 pontos (Vertyporokh, Wojda, 2019).

Os resultados obtidos em estudos utilizando o modelo invertebrado *G. mellonella* oferecem respostas significativas, que são correlacionadas com testes *in vitro* e em outros modelos animais. Por isso, este modelo apesar de não substituir a experimentação em modelos vertebrados, pode ser utilizado como modelo de triagem no estudo de tratamentos antifúngicos, seleção de dosagens e acompanhamento dos eventos de resistência em cepas clínicas (Soldini et al., 2018; Trevijano-Contador, Zaragoza, 2019). Desse modo, *G. mellonella* torna-se um modelo de estudo

interessante para comparar a eficácia de diferentes formulações de antifúngicos para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp.

### 3 PROPOSIÇÃO

#### 3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é comparar a eficácia da anfotericina B lipossomal (AmB-L) e anfotericina B desoxicolato (AmB-D) sobre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*.

#### 3.2 Objetivos específicos

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro* por meio do método de microdiluição em caldo das formulações AmB-L e AmB-D sobre células planctônicas de *Candida* spp.;

Avaliar a atividade da AmB-L e AmB-D sobre os biofilmes de *Candida* spp. formados *in vitro* por meio da contagem de células viáveis;

Comparar a eficácia *in vivo* da AmB-L e AmB-B frente a infecção experimental por *Candida* spp. em *G. mellonella*, por meio da análise da curva de sobrevivência e índice de saúde.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cepas e condições de cultivo

Neste estudo, foram utilizadas quatro cepas de *Candida*, sendo três cepas clínicas: *C. albicans* 70, *C. glabrata* 64 e *C. tropicalis* 11 isoladas de candidose orofaríngea de pacientes HIV positivos (Junqueira et al., 2012) e uma cepa de referência *C. parapsilosis* American Type Culture Collection (ATCC) 90018. Todas as cepas foram provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT), Universidade Estadual Paulista (Unesp), campus São José dos Campos, onde são mantidas congeladas em soluções estoque a -80°C em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) contendo 20% de glicerina. Para ativação, as cepas foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose e incubadas por 48 h a 37°C em estufa bacteriológica.

### 4.2 Antifúngicos

Para este estudo, a anfotericina B lipossomal AmBisome® (Gilead Sciences San Dimas, CA, EUA) foi diluída em água destilada, de acordo com as instruções do fabricante, obtendo-se uma concentração de 4 mg/mL. A anfotericina B desoxicolato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi diluída em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 7 mg/mL. Soluções estoque de cada antifúngico foram mantidos protegidos da luz a -20°C. A partir das soluções estoque de AmB-L e AmB-D foram preparadas concentrações de 16 a 0,0312 µg/mL diluídas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) para CIM. Para o tratamento dos biofilmes foi testado concentrações entre 2,5 e 50 µg/mL diluídas em meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB). Para os testes *in vivo*, a solução estoque de cada formulação foi diluída em água destilada estéril e doses de 10 µL contendo 5 µg foram aplicadas em cada larva.

### 4.3 Suscetibilidade antifúngica *in vitro* das células planctônicas

Os valores de CIM de todas as cepas de *Candida* foram determinados pelo método de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M27-A3 do *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI 2008), com algumas modificações.

Um inóculo do crescimento de *Candida* em ágar Sabouraud dextrose foi suspenso em 20 mL do meio de cultura *Yeast Extract, Peptone Dextrose* (YPD) e incubado por 24 h a 37°C em estufa bacteriológica. Após o período de incubação, as leveduras crescidas no meio foram isoladas por centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em 20 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Tal procedimento para lavagem das células foi repetido por duas vezes.

A densidade celular foi ajustada em meio RPMI (Sigma-Aldrich), tamponados com MOPS (ácido 3- (N-morfolino propanossulfônico) em aproximadamente  $1 \times 10^3$  células/mL, com auxílio de um hemocitômetro Neubauer.

Em placas de 96 poços de fundo chato, foram adicionados 100 µL do meio RPMI do 2º ao 12º poço. Em seguida, 200 µL de cada fármaco foram adicionados ao 1º poço a uma concentração de duas vezes a concentração inicial (32 µg/mL), então foi retirado 100 µL do 1º poço e feita 9 diluições seriadas. Em seguida todos os poços foram preenchidos com uma alíquota de 100 µL de suspensão fúngica de cada cepa previamente padronizada, obtendo-se assim um volume final de 200 µL com densidade celular de aproximadamente  $0,5 \times 10^3$  células/mL. O 11º poço foi inoculado com o meio RPMI e suspensão padronizada de *Candida* (controle positivo) e o 12º poço foi inoculado com 200 µL de RPMI (controle negativo), servindo como controles em todos os experimentos.

As placas foram protegidas da luz e incubadas por 24 h a 37°C em estufa bacteriológica. Os valores de CIM para AmB-L e AmB-D foram definidos como as menores concentrações que inibiram no mínimo 90% do crescimento fúngico. A constatação do CIM foi realizada por leitura em espectrofotômetro de microplacas (Epoch Bio Teck Instruments, Inc, USA) a 595 nm. Todos os ensaios foram feitos em duplicata e repetidos pelo menos 3 vezes em momentos diferentes.

#### 4.4 Estudo *in vitro* em biofilme

A atividade das formulações AmB-L e AmB-D foram testadas contra os biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* seguindo a metodologia previamente estabelecida por nosso grupo de pesquisa (de Barros et al., 2018).

##### 4.4.1 Formação dos biofilmes de *Candida*

Para a formação do biofilme, um inóculo do crescimento de *Candida* em ágar Sabouraud dextrose foi suspenso em 20 mL de caldo YPD e incubado por 24 h em agitação com rotação de 75 rpm a 37°C. As células fúngicas crescidas foram isoladas por centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em 20mL de PBS, sendo este procedimento para a lavagem das células repetido por duas vezes.

A densidades celular foi ajustada em aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/mL em caldo YNB suplementado com glicose na concentração de 100 mM, utilizando-se um hemocítmetro Neubauer. Os biofilmes foram formados em placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato, cada grupo analisado foi composto por 6 biofilmes. Para isso, inicialmente foram inoculados 200  $\mu$ L da suspensão de *Candida* previamente padronizada. Em seguida a placa foi incubada em agitação com rotação de 75 rpm a 37°C por 90 minutos, para promover a adesão inicial dos microrganismos. Após a fase inicial de adesão, a suspensão de células foi aspirada delicadamente e cada poço foi lavado 2 vezes com PBS para remoção das células fracamente aderidas. Um volume de 200  $\mu$ L de YNB fresco foi transferido para cada poço e a placa incubada por 24 h em agitação com rotação de 90 rpm a 37°C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em momentos diferentes.

#### 4.4.2 Tratamento dos biofilmes com AmB-L e AmB-D

Após a formação do biofilme, o sobrenadante das culturas foi gentilmente aspirado e cada poço contendo biofilme foi lavado por 2 vezes com 200 µL de PBS. Em seguida, um número de 6 biofilmes por grupo recebeu o tratamento de 200 µL de AmB-L ou AmB-D, diluídas em YNB, nas concentrações de 10, 20 e 50 vezes a CIM de cada cepa de *Candida*. Para cada cepa, um grupo controle não tratado foi incluído recebendo apenas YNB fresco no dia do tratamento. Após tais procedimentos os biofilmes foram incubados por mais 24 h protegidos da luz em agitação com rotação de 90 rpm a 37°C.

#### 4.4.3 Contagem das células viáveis de *Candida*

Após 24 h do tratamento, cada poço contendo os biofilmes foi aspirado e lavado com 200 µL de PBS por 2 vezes. Em seguida, os biofilmes foram desprendidos com auxílio de um homogeneizador ultrassônico (Vibra Cell, Sonics & Materials, Inc. Newtown, CT, USA) por 30 s com amplificação de 25%. A partir da solução obtida de cada biofilme, foram feitas diluições seriadas ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ ) em seguida alíquotas de 5 µL destas diluições foram semeadas em gotas únicas, em placas de Petri contendo o meio ágar Sabouraud dextrose, em triplicata.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h para o crescimento das cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*. As cepas de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* necessitaram de um período maior de incubação (48 h) para que fosse possível realizar a contagem das colônias. Após o crescimento, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC).

#### 4.5 Estudo *in vivo* em *G. mellonella*

#### 4.5.1 Preparo das larvas de *G. mellonella*

As larvas de *G. mellonella* utilizadas neste experimento foram provenientes do Laboratório de Invertebrados do ICT/Unesp, cuja criação é realizada de acordo com a metodologia de Jorjão et al. (2018).

Foram selecionadas larvas com peso entre 250 e 300 mg, separadas em grupos contendo 10 larvas. Após seleção, as larvas foram incubadas a 37°C no dia anterior aos experimentos. Larvas com alterações de cor como manchas escuras ou melanização aparente foram excluídas. Durante todo o experimento as larvas não receberam alimentação. Para cada ensaio foram incluídos grupos controle que não receberam intervenção alguma, a fim de controlar a qualidade da criação e grupos inoculados com PBS como controle do trauma. Nos experimentos que ocorreu a morte de duas larvas em algum grupo controle o ensaio foi interrompido e um novo refeito. Cada experimento foi repetido por duas vezes, em momentos distintos.

Para a inoculação foi utilizada seringas Hamilton (Hamilton, EUA), doses de 10 µL de suspensão fúngica e ou, anfotericina B foram injetadas nas últimas pró-patas de cada larva. A limpeza da agulha e da parte interna da seringa foi realizada a cada cinco aplicações ou quando iniciada a inoculação de diferentes espécies fúngicas. Para tal, as seringas foram lavadas, sequencialmente, em 15 mL das seguintes soluções: hipoclorito de sódio a 0,2%; álcool absoluto a 95%; água destilada estéril; e PBS.

#### 4.5.2 Ensaio de susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *Candida* spp.

Para determinar a concentração fúngica de cada cepa de *Candida* a ser utilizada nos experimentos, foi realizada uma análise de susceptibilidade em *G. mellonella* à infecção. Para isso *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* foram padronizadas em diferentes concentrações entre 10<sup>5</sup> e 10<sup>9</sup> células/mL e um inóculo de 10 µL de cada suspensão foi injetado em um grupo de larvas de acordo com o item 4.5.1. Como controle foram incluídos grupos sem intervenção e grupos

inoculados apenas com PBS. Após a inoculação as larvas foram incubadas a 37°C no escuro, o número de larvas mortas foi anotado a cada 24 h durante 7 dias.

#### **4.5.3 Ensaio de toxicidade de AmB-L e AmB-D L em *G. mellonella***

A fim de conferir a toxicidade das formulações de anfotericina B nas larvas de *G. mellonella*, grupos de 10 larvas, não infectadas por *Candida*, foram inoculados com doses de 10 µL de AmB-L ou AmB-D nas concentrações equivalentes a 2,5, 5 e 10 µg/larva de acordo com o item 4.5.1. Cada formulação armazenada em solução estoque, foi diluída em água destilada estéril e inoculada na última pró-pata com auxílio de uma seringa Hamilton. Foram incluídos grupos controle sem intervenção e inoculados apenas com PBS. Após a inoculação as larvas foram incubadas a 37°C e a sobrevivência das larvas foi avaliada diariamente por 7 dias.

#### **4.5.4 Tratamento das larvas de *G. mellonella* com AmB-L e AmB-D.**

Após seleção, das concentrações adequadas de *Candida ssp.* e anfotericina B, iniciou-se o tratamentos das larvas infectadas. Decorrido 2 h da infecção, as larvas foram tratadas com dose única de 5 µg/larva de AmB-L ou AmB-D de acordo com Binder et al. (2020). Em seguida, as larvas foram incubadas a 37°C e monitoradas diariamente. Como controle, foram utilizados grupos que não receberam nenhuma intervenção, grupos inoculados apenas com PBS, grupos inoculados apenas com AmB-L ou AmB-D e grupos infectados com *Candida* sem tratamento. Todas as larvas receberam o mesmo número de inoculações, por isso os grupos inoculados com PBS, AmB-L, AmB-D e grupos infectados não tratados receberam uma segunda dose de PBS.

#### **4.5.5 Determinação da curva de sobrevivência de *G. mellonella* após o tratamento com AmB-L e AmB-D**

Após os tratamentos, as larvas foram monitoradas por 7 dias e o número de larvas mortas anotado a cada 24 h para determinação da curva de sobrevivência. Foram consideradas mortas as larvas que não apresentaram nenhum movimento. As larvas mortas foram removidas do grupo assim que identificadas.

#### **4.5.6 Análise do índice de saúde das larvas de *G. mellonella* após o tratamento das infecções por *Candida* spp. com AmB-L e AmB-D.**

O índice de saúde das larvas foi determinado de acordo com o sistema de pontuação patológica proposto por Loh et al. (2013). Nesse sistema, as larvas são monitoradas diariamente recebendo uma pontuação referente aos seguintes atributos: atividades de movimentação, extensão da produção de seda (formação de casulo), melanização e sobrevivência. Para cada atributo é fornecida uma pontuação (Quadro 1). A somatória dos pontos indica o índice geral de saúde de cada larva. Larvas saudáveis apresentam alta atividade de movimentação e produção de casulo. A melanização ocorre como resposta imune a processos infecciosos, por isso larvas com machas escuras em sua cutícula recebem uma pontuação menor. Larvas saudáveis, pontuam entre 9 e 10. Larvas mortas por infecção pontuam 0.

Nesse trabalho, esses atributos foram analisados durante 7 dias após os tratamentos. As médias obtidas a cada 24 h para cada atributo (atividade de movimentação, formação de casulo, melanização e sobrevivência) foram transformadas em porcentagem de 100% e os resultados apresentados em gráficos.

Quadro 1 - Sistema de pontuação do índice de saúde

<b>Categoria</b>	<b>Descrição</b>	<b>Pontuação</b>
Atividade de movimentação	Sem atividade	0
	Atividade mínima na estimulação	1
	Atividade na estimulação	2
	Atividade sem estimulação	3
Formação de casulo	Sem casulo	0
	Casulo parcial	0,5
	Casulo completo	1
Melanização	Melanização completa (preta)	0
	Pontos escuros na larva marrom	1
	≥ 3 pontos na larva bege	2
	< 3 pontos na larva bege	3
	Sem melanização	4
Sobrevivência	Morta	0
	Viva	2

Fonte: Loh et al., 2013

#### 4.6 Análise estatística

Em todos os testes foi utilizado o programa GraphPad Prism 9.0, com nível de significância de 5%. Os dados de UFC obtidos nos ensaios de biofilmes foram transformados em logaritmo ( $\log_{10}$ ) e analisados pelo teste ANOVA seguida do teste de Tukey. Em relação ao estudo em *G. mellonella*, os resultados da curva de sobrevivência foram analisados pelo método Kaplan-Meier com nível de significância calculado pelo teste Log-rank (Mantel-Cox) e o índice de saúde foi analisado por ANOVA e teste de Tukey.

## 5 RESULTADO

### 5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima em células planctônicas

A atividade antifúngica de AmB-L e AmB-D em células planctônicas foi avaliada por meio do teste de microdiluição em caldo. Ambas as formulações apresentaram valores de CIM de 0,5 µg/mL para *C. parapsilosis* e *C. albicans*, e de 1 µg/mL para *C. glabrata* e *C. tropicalis*. A CIM para a cepa de referência *C. parapsilosis* 90018 manteve-se dentro da variação permitida segundo a CLSI. Os valores de CIM para células planctônicas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados de CIM para formulações de anfotericina B lipossomal (AmB-L) e desoxicolato (AmB-D) em diferentes cepas de *Candida*

Cepa	CIM (µg/mL)	
	AmB-L	AmB-D
<i>C. parapsilosis</i> 90018	0,5	0,5
<i>C. albicans</i> 70	0,5	0,5
<i>C. glabrata</i> 64	1,0	1,0
<i>C. tropicalis</i> 11	1,0	1,0

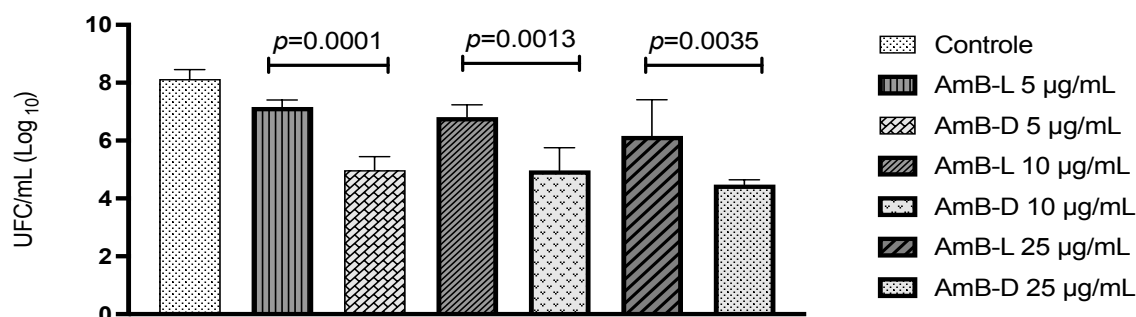
Fonte: Elaborada pela autora.

## 5.2 Comparação da atividade antifúngica de AmB-L e AmB-D sobre os biofilmes de *Candida* spp.

A atividade das formulações AmB-L e AmB-D sobre os biofilmes de 24 h de *Candida* foi avaliada por meio da quantificação de células viáveis (UFC/mL). Considerando o perfil de susceptibilidade reduzida dos biofilmes aos agentes antimicrobianos em comparação às células planctônicas, os biofilmes foram tratados com AmB-L e AmB-D em concentrações equivalentes a 10, 20 e 50 vezes a CIM de cada espécie. Sendo assim, para *C. parapsilosis* e *C. albicans* foram utilizados as concentrações de 5 µg/mL, 10 µg/mL e 25 µg/mL de AmB-L ou AmB-D. Para *C. glabrata* e *C. tropicalis*, foram utilizadas concentrações de 10 µg/mL, 20 µg/mL e 50 µg/mL de cada formulação antifúngica.

O biofilme de *C. parapsilosis* ATCC 90018 (Figura 1). Apresentou um crescimento para o grupo controle de 8,13 log<sub>10</sub> UFC/mL. No geral, a redução dos grupos tratados em relação ao grupo controle atingiu até 1,96 log<sub>10</sub> UFC/mL para AmB-L e 3,65 log<sub>10</sub> UFC/mL para AmB-D. Ao realizar análises comparativas entre os dois grupos tratados com formulações diferentes em mesma concentração, a formulação AmB-D foi mais eficiente do que AmB-L. Nas concentrações de 5 µg/mL, AmB-D reduziu 2,18 log<sub>10</sub> UFC/mL em relação ao grupo AmB-L ( $p=0,0001$ ). Para as concentrações de 10 µg/mL, AmB-D diminuiu 1,83 log<sub>10</sub> UFC/mL em relação a AmB-L ( $p=0,0013$ ). O tratamento dos biofilmes com AmB-D na concentração de 25 µg/mL, reduziu 1,68 log<sub>10</sub> UFC/mL a mais em relação a AmB-L na mesma concentração ( $p=0,0035$ ).

Figura 1 - Quantificação da viabilidade celular dos biofilmes por contagem de UFC/mL de *C. parapsilosis* após tratamento com anfotericina B lipossomal (AmB-L) ou anfotericina B desoxicolato (AmB-D)

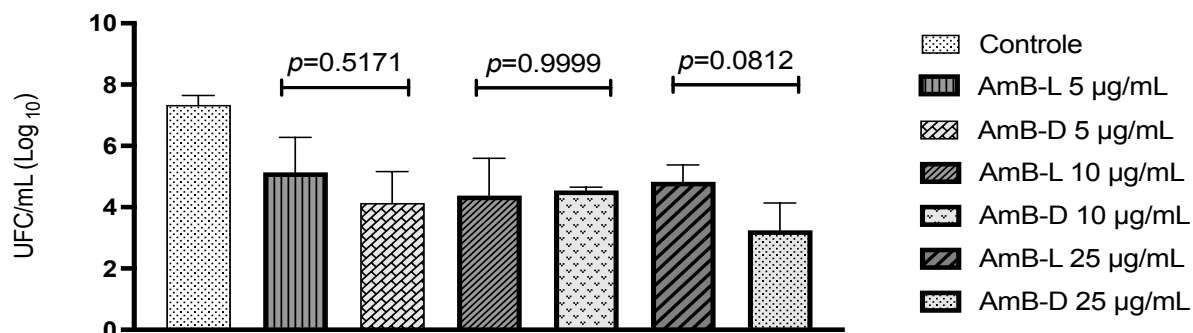


Legenda: Estudo *in vitro* em biofilme de *C. parapsilosis* ATCC 90018 tratada com AmB-L e AmB-D nas concentrações 5 µg/mL (10x CIM), 10 µg/mL (20x CIM) e 25 µg/mL (50x CIM). Resultados apresentados em média e desvio padrão dos valores de UFC/mL. Valor de *p* obtido na comparação entre AmB-L e AmB-D na mesma concentração.

Fonte: Elaborada pela autora.

O biofilme da cepa clínica de *C. albicans* 70 (Figura 2) apresentou um crescimento de 7,34 log<sub>10</sub> UFC/mL no grupo controle. A redução de células viáveis nos grupos tratados em relação ao grupo controle foi de até 2,96 log<sub>10</sub> UFC/mL para AmB-L e 4,09 log<sub>10</sub> UFC/mL para AmB-D. Ao comparar AmB-L e AmB-D em concentrações semelhantes, a formulação AmB-D mostrou maior capacidade em reduzir as células fúngicas do que AmB-L, porém não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados por formulações diferentes em mesma concentração. Na concentração de 5 µg/mL a redução das células viáveis para AmB-D foi de 1,00 log<sub>10</sub> UFC/mL em relação ao grupo tratado com AmB-L (*p*=0,5171). Para a concentração 10 µg/mL (20x CIM), AmB-L reduziu 1,16 log<sub>10</sub> UFC/mL em relação a AmB-D (*p*=0,9999). Na concentração de 25 µg/mL, a AmB-D levou a redução de 1,58 log<sub>10</sub> UFC/mL a mais em relação a AmB-L (*p*=0,0812).

Figura 2 - Quantificação da viabilidade celular dos biofilmes por contagem de UFC/mL de *C. albicans* após tratamento com anfotericina B lipossomal (AmB-L) ou anfotericina B desoxicolato (AmB-D)

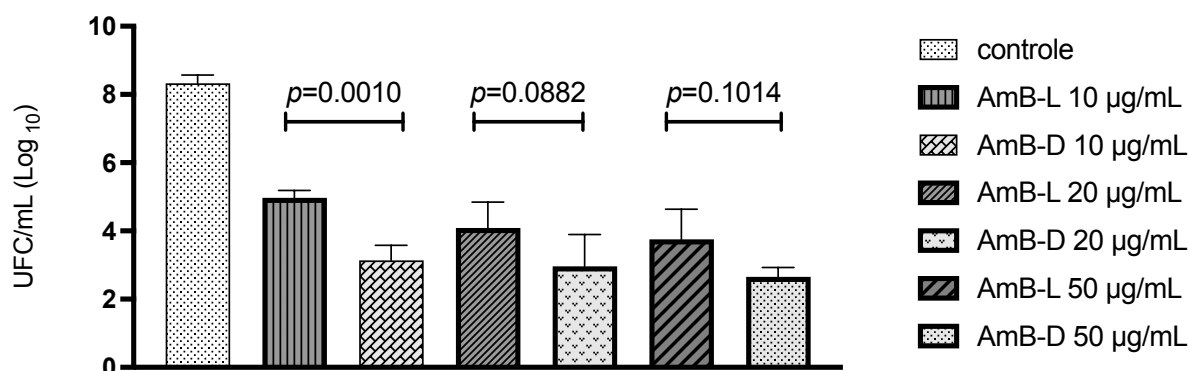


Legenda: Estudo *in vitro* em biofilme de *C. albicans* 70 tratada com AmB-L e AmB-D nas concentrações 5 µg/mL (10x CIM), 10 µg/mL (20x CIM) e 25 µg/mL (50x CIM). Resultados apresentados em média e desvio padrão dos valores de UFC/mL. Valor de  $p$  obtido na comparação entre AmB-L e AmB-D na mesma concentração.

Fonte: Elaborada pela autora.

O biofilme do grupo controle da cepa clínica *C. glabrata* 64 (Figura 3) exibiu crescimento de 8,32 log<sub>10</sub> UFC/mL. A redução dos grupos tratados em relação ao grupo controle foi de até 4,57 log<sub>10</sub> UFC/mL para AmB-L e 5,67 log<sub>10</sub> UFC/mL para AmB-D. Ao comparar as formulações de anfotericina B em concentrações semelhantes, a formulação AmB-D foi mais eficiente do que AmB-L. Porém, diferenças estatisticamente significantes foram encontradas apenas nos grupos tratados com as concentrações de 10 µg/mL (10x CIM). Nesta concentração de 10 µg/mL, a redução das células viáveis para AmB-D foi de 1,83 log<sub>10</sub> UFC/mL em relação ao grupo AmB-L ( $p=0,0010$ ). Para a concentração 20 µg/mL (20x CIM), AmB-D reduziu 1,12 log<sub>10</sub> UFC/mL em relação a AmB-L ( $p=0,0882$ ). Na concentração de 50 µg/mL, a AmB-D levou a redução de 1,09 log<sub>10</sub> UFC/mL em relação a AmB-L ( $p=0,1014$ )

Figura 3 - Quantificação da viabilidade celular dos biofilmes por contagem de UFC/mL de *C. glabrata* após tratamento com anfotericina B lipossomal (AmB-L) ou anfotericina B desoxicolato (AmB-D)

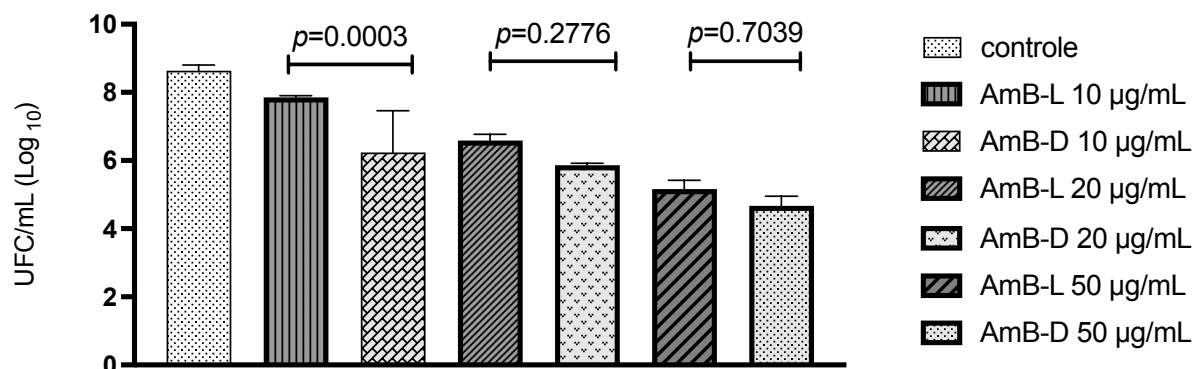


Legenda: Estudo *in vitro* em biofilme de *C. glabrata* 64 tratada com AmB-L e AmB-D nas concentrações 10µg/mL (10x CIM), 20µg/mL (20x CIM) e 50µg/mL (50x CIM). Resultados apresentados em média e desvio padrão dos valores de UFC/mL. Valor de *p* obtido na comparação entre AmB-L e AmB-D na mesma concentração.

Fonte: Elaborada pela autora.

A cepa clínica *C. tropicalis* 11 (Figura 4) demonstrou um crescimento de 8,64 log<sub>10</sub> UFC/mL no grupo controle. A redução dos grupos tratados em relação ao grupo controle foi de até 3,48 log<sub>10</sub> UFC/mL para AmB-L e 3,97 log<sub>10</sub> UFC/mL para AmB-D. As formulações AmB-L e AmB-D foram comparadas estatisticamente em concentrações semelhantes, verificando-se que AmB-D teve maior atividade antifúngica do que AmB-L. Porém, apenas na concentração de 10 µg/mL (10 x CIM) houve diferença estatística significativa entre as formulações. A redução das células viáveis para AmB-D 10 µg/mL foi de 1,61 log<sub>10</sub> UFC/mL em relação ao grupo AmB-L 10 µg/mL (*p*=0,0003). Para a concentração 20 µg/mL (20x CIM), AmB-D reduziu 0,72 log<sub>10</sub> UFC/mL em relação a AmB-L (*p*=0,2776). Na concentração mais elevada, AmB-D 50 µg/mL reduziu 0,49 log<sub>10</sub> UFC/mL em relação a AmB-L 50 µg/mL (*p*=0,7039).

Figura 4 - Quantificação da viabilidade celular dos biofilmes por contagem de UFC/mL de *C. tropicalis* após tratamento com anfotericina B lipossomal (AmB-L) ou anfotericina B desoxicolato (AmB-D)



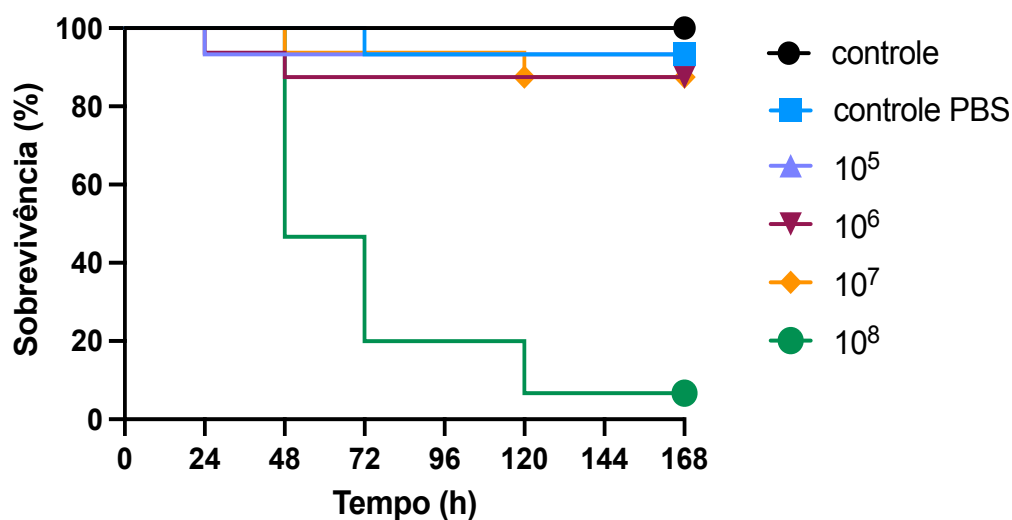
Legenda: Estudo *in vitro* em biofilme de *C. tropicalis* 11 tratada com AmB-L e AmB-D nas concentrações 10µg/mL (10x CIM), 20µg/mL (20x CIM) e 50µg/mL (50x CIM). Resultados apresentados em média e desvio padrão dos valores de UFC/mL. Valor de *p* obtido na comparação entre AmB-L e AmB-D na mesma concentração.

Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.3 Ensaio de susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *Candida* spp.

Para determinar uma concentração de cada cepa de *Candida* que fosse letal para as larvas de *G. mellonella*, primeiramente foi avaliada a susceptibilidade das larvas frente a infecção por diferentes concentrações fúngicas. Após a infecção e monitoramento por 7 dias da curva de sobrevivência de *G. mellonella*, foram selecionadas concentrações que levassem uma taxa de mortalidade maior do que 50%. Assim, foi determinada a concentração de  $1 \times 10^8$  células/mL para as cepas de *C. parapsilosis* (Figura 5), *C. albicans* (Figura 6) e *C. tropicalis* (Figura 7) e  $5 \times 10^8$  células/mL para *C. glabrata* (Figura 8).

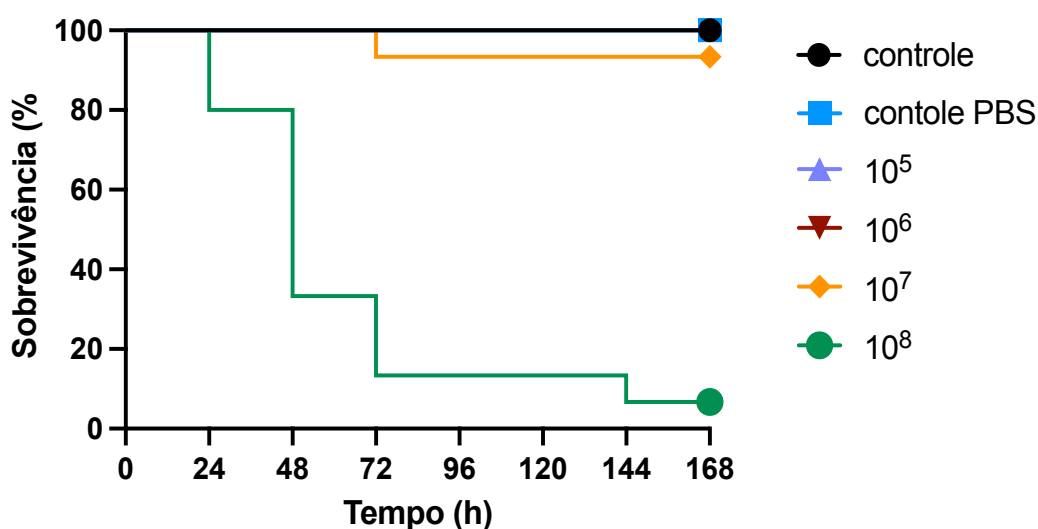
Figura 5 – Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectada por *C. parapsilosis* ATCC 90018 padronizada em  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  células/ mL



Legenda:  $p < 0,0001$ . (controle) grupo sem intervenção; (controle PBS) grupo controle do trauma inoculado com PBS.

Fonte: Elaborada pela autora.

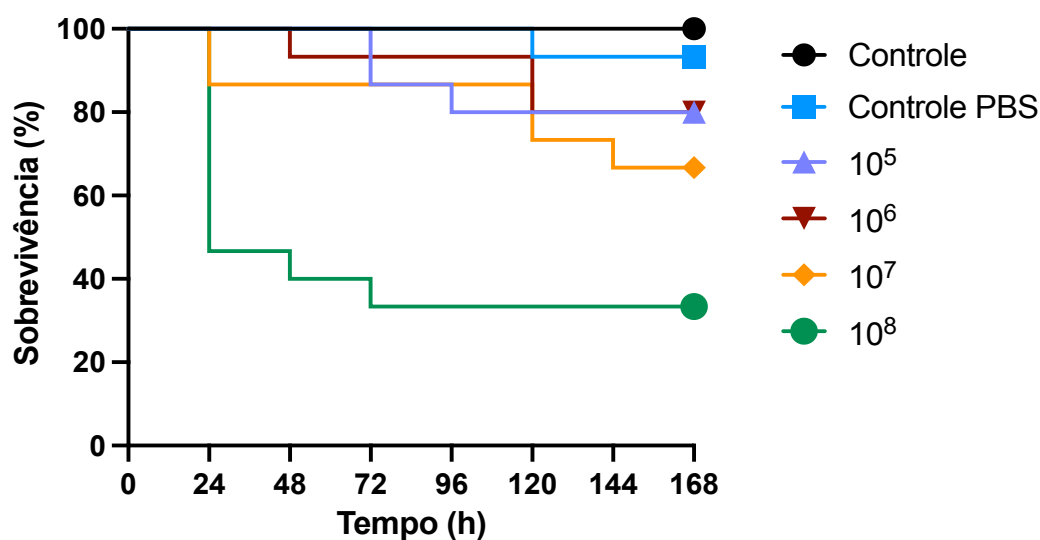
Figura 6 – Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectada por *C. albicans* 70 padronizada em  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  células/mL



Legenda:  $p < 0,0001$ . (controle) grupo sem intervenção; (controle PBS) grupo controle do trauma inoculado com PBS.

Fonte: Elaborada pela autora.

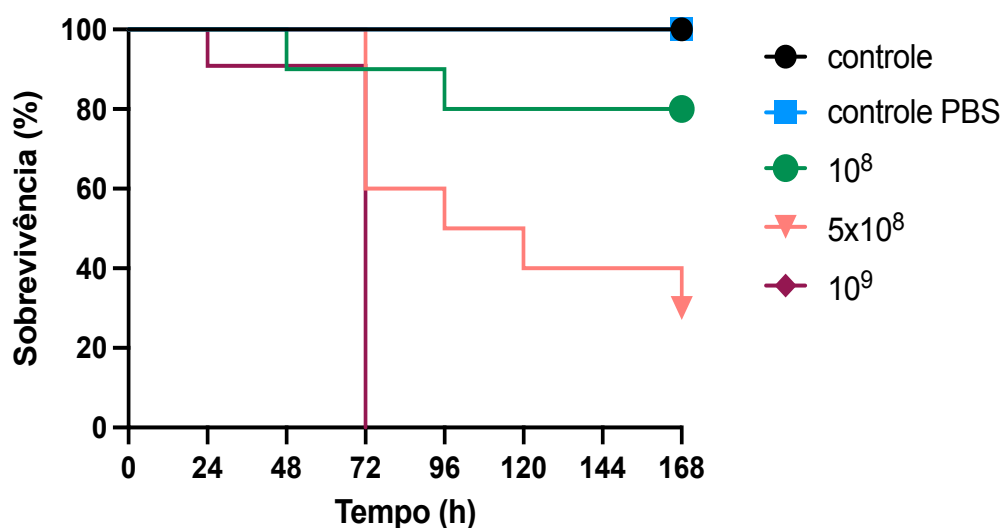
Figura 7 - Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectada por *C. tropicalis* 11 padronizada em  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  células/mL



Legenda:  $p < 0,0001$ . (controle) grupo sem intervenção; (controle PBS) grupo controle do trauma inoculado com PBS.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 8 – Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectada por *C. glabrata* 64 padronizada em  $10^8$ ,  $5 \times 10^8$  e  $10^9$  células/mL



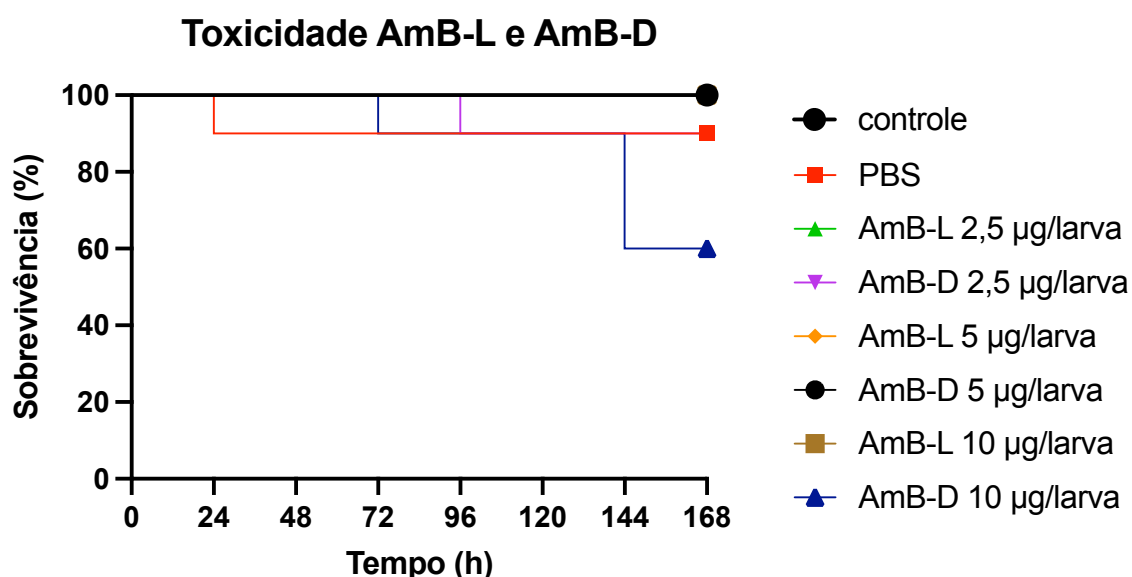
Legenda:  $p < 0,0001$ . (controle) grupo sem intervenção; (controle PBS) grupo controle do trauma inoculado com PBS.

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 5.4 Ensaio de toxicidade de AmB-L e AmB-D em *G. mellonella*

A toxicidade de AmB-L e AmB-D foi avaliada pela curva de sobrevivência em *G. mellonella* não infectada por *Candida*. Os resultados demonstraram que ambas as formulações não apresentaram toxicidade nas concentrações de 2,5 e 5 µg/larva. AmB-D foi tóxica na concentração de 10 µg/larva causando a morte de 4 larvas durante o ensaio (Figura 9).

Figura 9 - Curva de sobrevivência obtida no ensaio de toxicidade de AmB-L e AmB-D em *G. mellonella*.



Legenda:  $p=0,0072$ . (controle) grupo sem intervenção; (PBS) grupo controle do trauma inoculado com PBS.

Fonte: Elaborada pela autora.

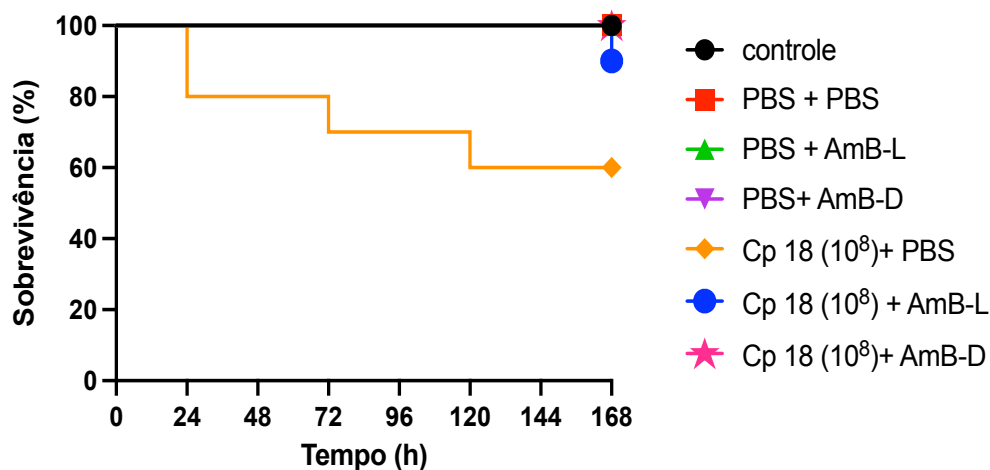
#### 5.5 Curva de sobrevivência de *G. mellonella* após o tratamento da infecção por *Candida* com AmB-L e AmB-D

Após a seleção da concentração de *Candida* e das formulações de AmB-L e AmB-D para estudo no modelo invertebrado, foram realizados os ensaios de

tratamento das larvas infectadas. Para isso, as larvas infectadas receberam o tratamento de 5 µg/larva de AmB-L ou AmB-D após 2 h da infecção por *Candida*.

O grupo infectado por *C. parapsilosis* (Figura 10), obteve taxa de sobrevivência de 60% após período de 7 dias. Com a aplicação de AmB-D, a sobrevivência das larvas passou a ser de 100% ( $p=0,0289$ ). O grupo tratado com AmB-L apresentou sobrevivência de 90% das larvas ( $p=0,1060$ ). Comparando estatisticamente os dois grupos que receberam tratamento, não houve diferença entre eles ( $p=0,3172$ ). O grupo controle sem intervenção manteve 100% de sobrevivência, comprovando a saúde das larvas utilizadas no ensaio. Os grupos controle PBS + PBS, grupo PBS + AmB-L e PBS + AmB-D, apresentaram a sobrevivência de 100% indicando que tanto o PBS quanto as formulações de anfotericina B não alteraram o estado de saúde das larvas.

Figura 10 - Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectada por *C. parapsilosis* ATCC 90018 ( $10^8$  células/mL) e tratada com AmB-L ou AmB-D



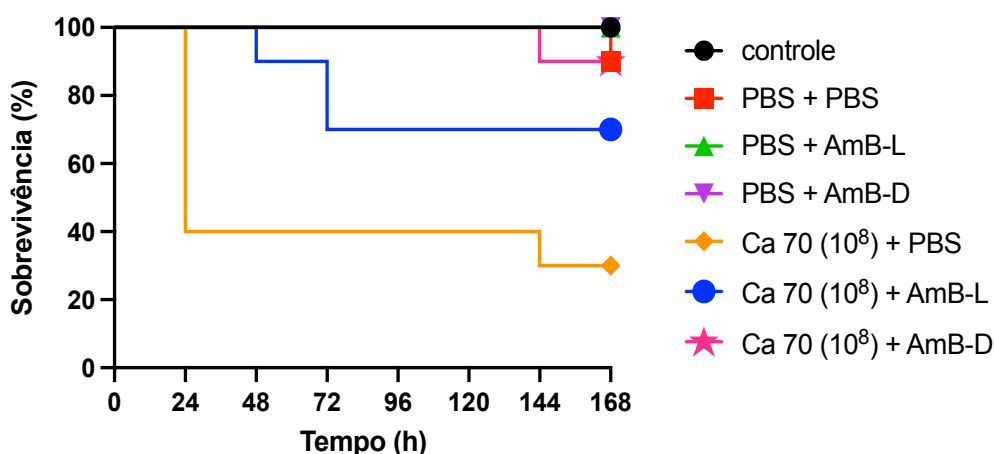
Legenda:  $p=0,0007$ .

Fonte: Elaborada pela autora.

As larvas infectadas por *C. albicans* (Figura 11), obtiveram índice de sobrevivência de 30% ao final do experimento, com maior número de mortes (60%) 24 h após a infecção. O tratamento com AmB-L resultou no aumento de 40% da sobrevivência das larvas em relação ao grupo infectado, chegando ao final do ensaio

com 70% de sobrevivência ( $p=0,0490$ ). AmB-D apresentou o melhor desempenho entre as formulações para *C. albicans*, pois ao final do experimento 90% das larvas estavam vivas ( $p=0,0049$ ). As duas formulações apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle, porém ao compará-las não houve diferença entre elas ( $p=0,2450$ ). As larvas do grupo controle mantiveram 90% de sobrevivência durante o ensaio, comprovando a saúde das larvas selecionadas. O grupo controle PBS + PBS, apresentou 90% de sobrevivência e os grupos PBS + AmB-L e PBS + AmB-D apresentaram a sobrevivência de 100% indicando que tanto o PBS quanto as formulações de anfotericina B não causaram dano a saúde das larvas.

Figura 11 - Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectada por *C. albicans*  $70 (10^8$  células/mL) e tratada com AmB-L ou AmB-D



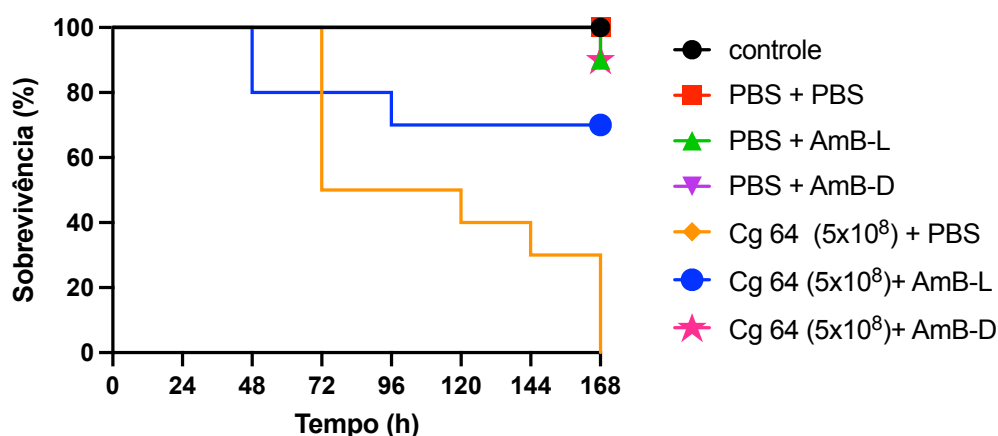
Legenda:  $p < 0,0001$ .

Fonte: Elaborada pela autora.

As larvas infectadas por *C. glabrata* (Figura 12) apresentaram 100% de morte após 7 dias de análise, sendo que 50% das mortes aconteceram em 72 h. O tratamento das larvas infectadas com AmB-L resultou na sobrevivência de 70% das larvas ( $p=0,01020$ ) ao final do experimento, enquanto o grupo tratado com AmB-D apresentou sobrevivência de 90% ( $p < 0,0001$ ). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ( $p=0,2437$ ). O grupo controle sem intervenção manteve 100% de sobrevivência, comprovando a saúde das larvas utilizadas no ensaio. Os grupos controle PBS + PBS, grupo PBS + AmB-L e PBS +

AmB-D apresentaram a sobrevivência de 100% indicando que tanto o PBS quanto as formulações de anfotericina B não foram capazes de alterar o estado de saúde das larvas.

Figura 12 - Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectada por *C. glabrata* 64 ( $5 \times 10^8$  células/mL) e tratada com AmB-L ou AmB-D

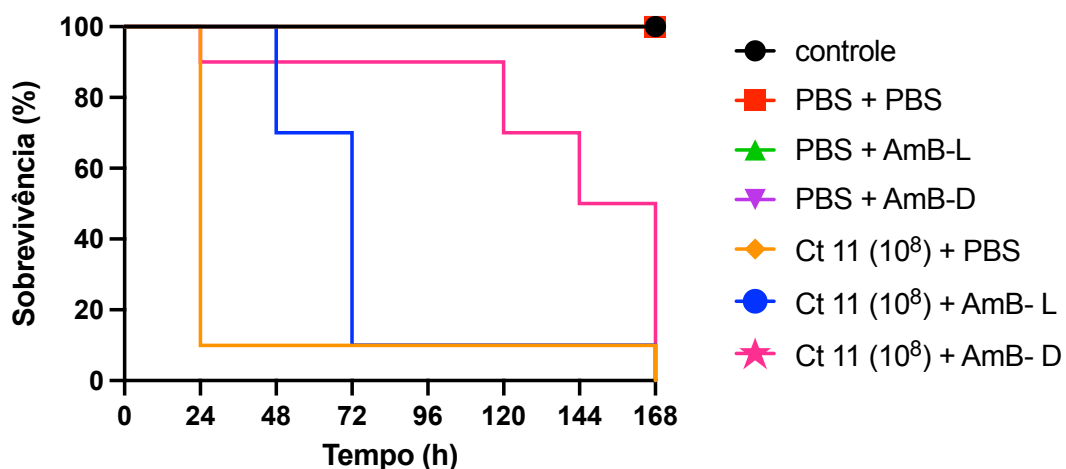


Legenda:  $p=0,0001$ .

Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação à infecção por *C. tropicalis* (Figura 13), 100% das larvas morreram ao final do ensaio (7 dias), sendo que 90% das mortes ocorreram nas primeiras 24 h de experimento. O tratamento com AmB-L prolongou a sobrevivência das larvas, no qual 30% sobreviveram por 48 h e 70% sobreviveram por 72 h ( $p=0,0074$ ). O grupo que recebeu o tratamento com AmB-D apresentou sobrevivência de 90% das larvas por até 120 h após a infecção ( $p=0,0059$ ). Quando comparado os dois tratamentos, AmB-D obteve o melhor resultado entre as formulações, com diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0103$ ). O grupo controle sem intervenção manteve 100% de sobrevivência, comprovando a saúde das larvas selecionadas para o ensaio. O grupo controle PBS + PBS, grupo PBS + AmB-L e PBS + AmB-D apresentaram a sobrevivência de 100% indicando que tanto o PBS quanto as formulações de anfotericina B não causaram dano ao estado de saúde das larvas.

Figura 13 - Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectada por *C. tropicalis* 11 ( $10^8$  células/mL) e tratada com AmB-L ou AmB-D



Legenda:  $p=0,0001$ .

Fonte: Elaborada pela autora.

## 5.6 Índice de saúde de *G. mellonella* após o tratamento da infecção por *Candida* com AmB-L e AmB-D

Além da análise da curva de sobrevivência em *G. mellonella*, o estado de saúde das larvas também foi avaliado de acordo com o sistema de Loh et al. (2013). Para isso, foi calculada a porcentagem das pontuações médias obtidas para os seguintes atributos: atividade de movimentação, formação de casulo, melanização e sobrevivência. O índice de saúde total foi a soma de todos estes atributos observados.

Com relação as larvas infectadas por *C. parapsilosis* (Figura 14A), para atividade de movimentação foi possível observar que nos grupos controle, PBS + PBS e PBS + AmB-D as larvas mantiveram 100% de atividade. No grupo PBS + AmB-L e no grupo *C. parapsilosis* + AmB-L as larvas mantiveram 93,3% de atividade. O grupo *C. parapsilosis* + AmB-D apresentou atividade de 76,6%, enquanto o grupo *C. parapsilosis* + PBS apresentou índice de movimentação de 46,6% ( $p < 0,0001$ ).

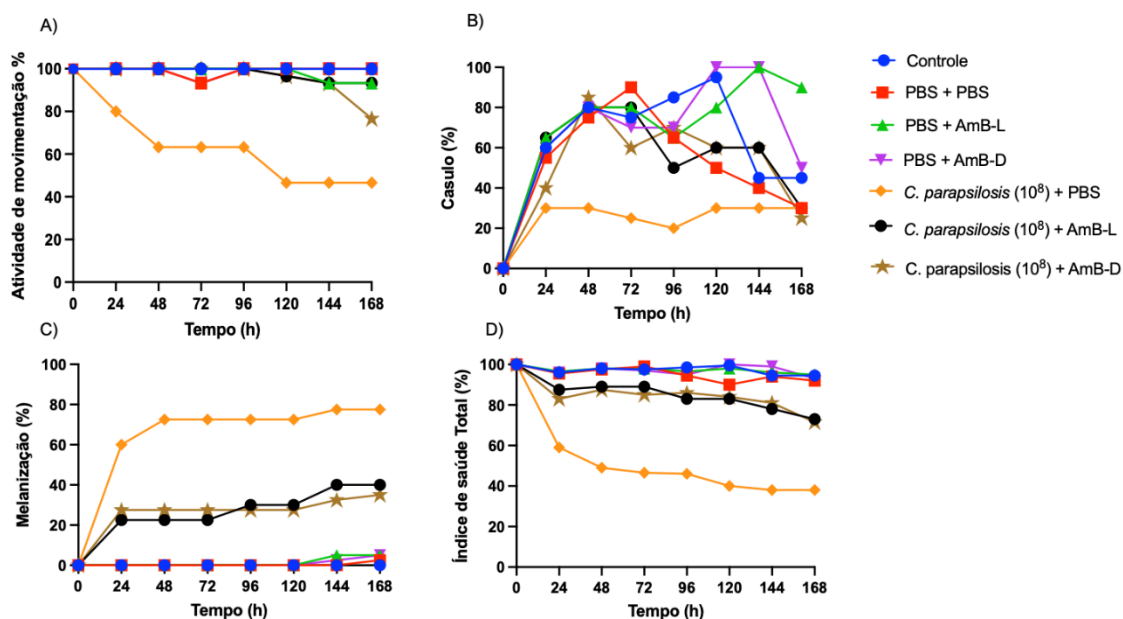
No atributo de formação de casulo (Figura 14B), apesar da grande variação durante os 7 dias de ensaio, o grupo *C. parapsilosis* + PBS foi o que apresentou a menor capacidade de produção. A porcentagem de casulos formados por todos os

grupos ao final do ensaio foi de 45%, 30%, 90%, 50%, 30%, 30% e 25%, respectivamente, para os grupos controle, PBS + PBS, PBS + AmB-L, PBS + AmB-D, *C. parapsilosis* + PBS, *C. parapsilosis* + AmB-L e *C. parapsilosis* + AmB-D ( $p=0,0403$ ).

Quanto ao índice de melanização (Figura 14C), as larvas do grupo *C. parapsilosis* + PBS apresentaram um índice de melanização de 77,5%. O tratamento das larvas com anfotericina B resultou na redução da melanização. O grupo *C. parapsilosis* + AmB-L apresentou índice de melanização de 40%, enquanto o grupo *C. parapsilosis* + AmB-D apresentou um índice de melanização de 35%. Os grupos controle, PBS + PBS, PBS + AmB-L e PBS + AmB-D apresentaram melanização de 0%, 2,5% e 5% respectivamente.

Ao analisar o índice de saúde total das larvas (figura 14D), o grupo *C. parapsilosis* + PBS foi o que apresentou menor índice de saúde ( $p<0,0001$ ). Considerando apenas os grupos que receberam os tratamentos de AmB-L ou AmB-D ambas as formulações apresentaram resultados semelhantes e não foram encontradas diferenças estatísticas entre elas ( $p=0,9999$ ).

Figura 14 – Pontuação média dos atributos do índice de saúde de larvas de *G. mellonella* infectada por *C. parapsilosis* e tratadas com AmB-L ou AmB-D



Legenda: A) pontuação média das larvas em relação a atividade de movimentação; B) Pontuação média das larvas em relação a formação de casulo; C) Pontuação média das larvas em relação a melanização; D) Pontuação média das larvas considerando todos os atributos do índice de saúde. (Controle) grupo sem intervenção; (PBS+PBS) grupo controle do trauma inoculado com PBS; (PBS + AmB-L) grupo controle AmB-L; (PBS + AmB-D) grupo controle AmB-D; (*C. parapsilosis* (10<sup>8</sup>) + PBS) grupo infectado; (*C. parapsilosis* (10<sup>8</sup>) + AmB-L) grupo infectado e tratado com AmB-L; (*C. parapsilosis* (10<sup>8</sup>) + AmB-D) grupo infectado e tratado com AmB-D.

Fonte: Elaborada pela autora.

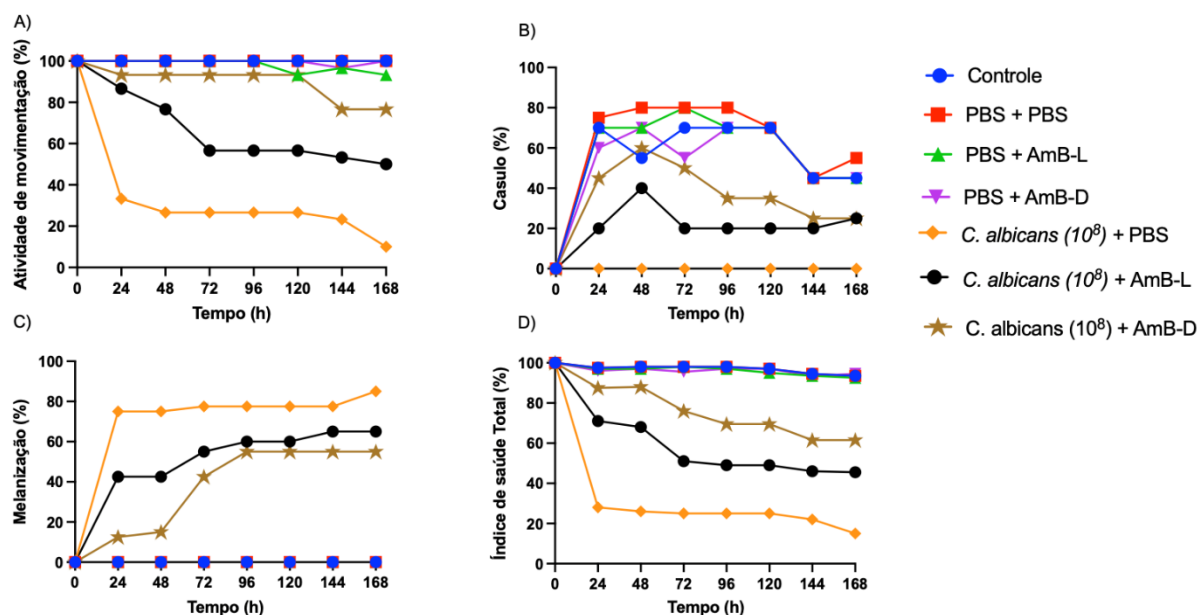
Dando continuidade aos ensaios, foi realizada a análise do índice de saúde das larvas infectadas por *C. albicans*. A porcentagem das pontuações médias obtidas para o atributo atividade de movimentação (Figura 15A), demonstrou que as larvas dos grupos controle, PBS + PBS, PBS + AmB-D mantiveram 100% da atividade. O grupo PBS + AmB-L apresentou atividade de 93,3%. O grupo *C. albicans* + PBS resultou em redução na atividade de movimentação, apresentando apenas 10% de movimentação ao final do ensaio experimental. O tratamento das larvas com anfotericina B promoveu a melhora deste atributo em relação ao grupo infectado. As larvas do grupo *C. albicans* + AmB-L apresentaram 50% de atividade ao final do ensaio. Já o grupo *C. albicans* + AmB-D manteve a atividade de 76,6% ( $p < 0,0001$ ).

Para o atributo formação de casulo (Figura 15B), o grupo *C. albicans* + PBS, não foi capaz de formar casulo durante todo o ensaio. Nos grupos controle, PBS + AmB-L e PBS + AmB-D, o índice para este atributo foi de 45%, enquanto o grupo PBS + PBS ao final do ensaio apresentou índice de 55%. Já os grupos *C. albicans* + AmB-L e *C. albicans* + AmB-D apresentaram índice de 25% para formação de casulo ( $p < 0,0001$ ).

Considerando a pontuação do atributo melanização (Figura 15C), foi possível observar que o grupo *C. albicans* + PBS apresentou o maior índice de melanização, em 24 hs as larvas apresentaram 75% de melanização, ao final do ensaio as larvas deste grupo obtiveram o índice de 85% de melanização. O tratamento com anfotericina B foi capaz de reduzir os níveis de melanização, tanto no grupo *C. albicans* + AmB-L, quanto no grupo *C. albicans* + AmB-D, que ao final do ensaio apresentaram índice de 65 e 55% respectivamente. Os grupos controle, PBS + PBS, PBS + AmB-L e PBS + AmB-D mantiveram sua coloração inicial, com índice de 0% para o atributo melanização ( $p < 0,0001$ ).

A pontuação total do índice de saúde (Figura 15D) demonstrou que o grupo infectado teve maior impacto negativo na saúde das larvas ( $p < 0,0001$ ). Ao comparar apenas os grupos que receberam tratamento, ambas as formulações foram capazes de melhorar a resposta das larvas frente a infecção causada por *C. albicans* com resultados semelhantes e sem diferença estatística entre elas ( $p = 0,2024$ ).

Figura 15 - Pontuação média dos atributos do índice de saúde de larvas de *G. mellonella* infectada por *C. albicans* e tratadas com AmB-L ou AmB-D



Legenda: A) pontuação média das larvas em relação a atividade de movimentação; B) Pontuação média das larvas em relação a formação de casulo; C) Pontuação média das larvas em relação a melanização; D) Pontuação média das larvas considerando todos os atributos do índice de saúde. (Controle) grupo sem intervenção; (PBS+PBS) grupo controle do trauma inoculado com PBS; (PBS + AmB-L) grupo controle AmB-L; (PBS + AmB-D) grupo controle AmB-D; (*C. albicans* ( $10^8$ ) + PBS) grupo infectado; (*C. albicans* ( $10^8$ ) + AmB-L) grupo infectado e tratado com AmB-L; (*C. albicans* ( $10^8$ ) + AmB-D) grupo infectado e tratado com AmB-D.

Fonte: Elaborada pela autora.

A terceira cepa de *Candida* a ser analisada foi *C. glabrata*, que apresentou redução expressiva no atributo atividade de movimentação (Figura 16A). Após 72 h de infecção, as larvas do grupo *C. glabrata* + PBS apresentaram índice de 23,3%, e ao final do ensaio, devido a morte de 100% das larvas deste grupo, o índice foi de 0%. O grupo *C. glabrata* + AmB-L apresentou melhora no estado de saúde, ao final do ensaio as larvas deste grupo mantiveram 30% de atividade. O grupo *C. glabrata* + AmB-D manteve 73,3% da atividade de movimentação. Os grupos controle, PBS + PBS, PBS + AmB-L e PBS + AmB-D chegaram ao final do ensaio com 93,3%.

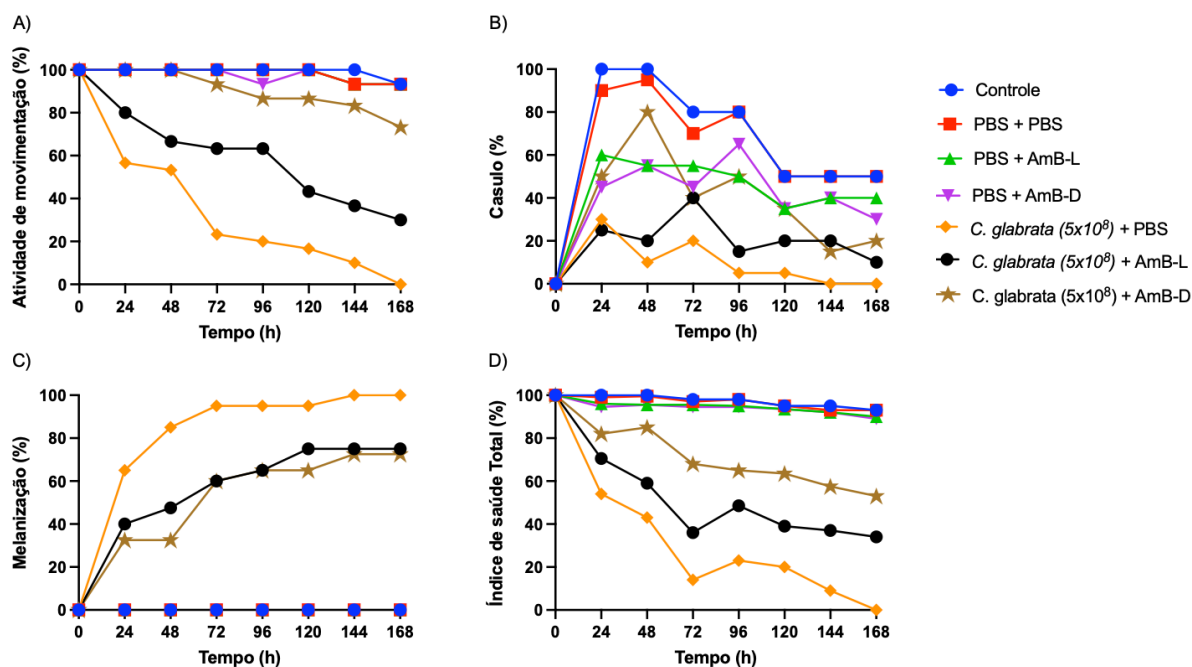
Apesar da grande variação, foi possível perceber que a capacidade de formar casulo das larvas infectadas por *C. glabrata* foi prejudicada durante o ensaio (Figura 16B). O grupo *C. glabrata* + PBS foi o grupo que menos produziu casulo. O grupo *C. glabrata* + AmB-L chegou a produção de 40% em 72 h, no entanto finalizou o ensaio

com 10% de produção. O grupo *C. glabrata* + AmB-D, dentre os grupos infectados, foi o que manteve maior índice de produção durante o ensaio, e ao final obteve o índice de 20% de formação de casulo ( $p < 0,0001$ ).

A saúde das larvas observadas quanto a melanização (Figura 14C) demonstrou que o grupo *C. glabrata* + PBS apresentou maior índice de melanização (100%). Os grupos *C. glabrata* + AmB-L e *C. glabrata* + AmB-D obtiveram melhora no estado de saúde, e chegaram ao final do ensaio com 75 e 72,5% de melanização, respectivamente. Os grupos controle, PBS + PBS, PBS + AmB-L e PBS + AmB-D chegaram, ao final do ensaio, com 0% de atividade.

O índice total de saúde demonstrou que na infecção por *C. glabrata* (Figura 16D), os tratamentos elevaram as condições de saúde ( $p < 0,0001$ ). Apesar da AmB-D apresentar melhores resultados, não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $p = 0,2636$ ).

Figura 16 - Pontuação média dos atributos do índice de saúde de larvas de *G. mellonella* infectada por *C. glabrata* e tratadas com AmB-L ou AmB-D



Legenda: A) pontuação média das larvas em relação a atividade de movimentação; B) Pontuação média das larvas em relação a formação de casulo; C) Pontuação média das larvas em relação a melanização; D) Pontuação média das larvas considerando todos os atributos do índice de saúde. (Controle) grupo sem intervenção; (PBS+PBS) grupo controle do trauma inoculado com PBS; (PBS + AmB-L) grupo controle AmB-L; (PBS + AmB-D) grupo controle AmB-D; (*C. glabrata* (5x10<sup>8</sup>) + PBS) grupo infectado; (*C. glabrata* (5x10<sup>8</sup>) + AmB-L) grupo infectado e tratado com AmB-L; (*C. glabrata* (5x10<sup>8</sup>) + AmB-D) grupo infectado e tratado com AmB-D.  
Fonte: Elaborada pela autora.

A análise dos atributos para determinar o índice de saúde de *G. mellonella* infectada por *C. tropicalis* demonstrou que após a infecção das larvas, a atividade de movimentação no grupo *C. tropicalis* + PBS foi reduzida a 3,3% (Figura 17A). O tratamento da infecção com anfotericina B resultou na melhora deste atributo, onde o grupo *C. tropicalis* + AmB-L apresentou índice de 36,6% de atividade após 48 h de infecção e o grupo *C. tropicalis* + AmB-D manteve 63,3% de movimentação após 48 h da infecção. O grupo controle e PBS + PBS mantiveram a atividade de 100%, enquanto os grupos PBS + AmB-L e PBS + AmB-D demonstraram atividade de movimentação de 93,3% e 80%, respectivamente ( $p < 0,0001$ ).

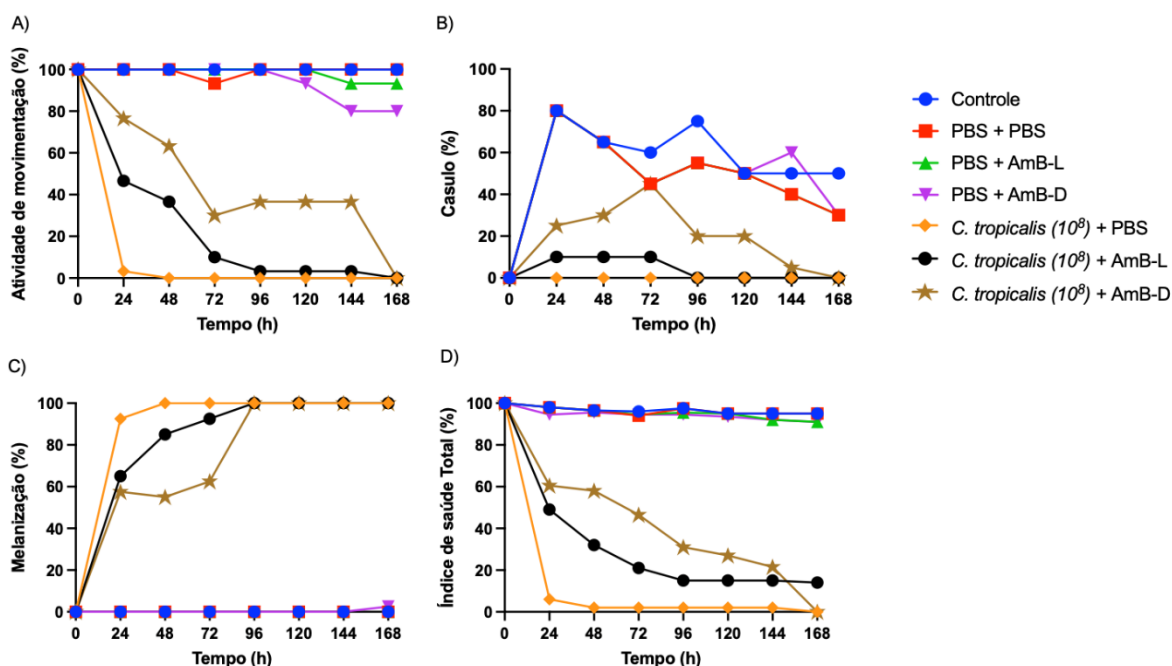
Para o atributo formação de casulo (Figura 17B), a infecção causada por *C. tropicalis* foi capaz de impedir a produção do grupo *C. tropicalis* + PBS durante todo o

experimento. Os grupos *C. tropicalis* + AmB-L e *C. tropicalis* + AmB-D foram capazes de formar casulo ao longo do ensaio, porém, ao final, o índice de formação de casulo para ambos os grupos ficou em 0%. Nos grupos controle, PBS + PBS, PBS + AmB-L e PBS + AmB-D a formação de casulo, ao final do ensaio, foi de no máximo em 50% ( $p < 0,0001$ ).

*C. tropicalis* dentre as espécies estudadas, foi a espécie que causou maior índice de melanização (Figura 17C). Após 24 h de infecção o grupo *C. tropicalis* + PBS apresentou índice de 92,5% de melanização, em 48h o índice atingiu o nível máximo de 100% das larvas. O tratamento dos grupos *C. tropicalis* + AmB-L e *C. tropicalis* + AmB-D não impediu a melanização das larvas, porém a melanização ocorreu de forma mais lenta. Os grupos controle, PBS + PBS, PBS + AmB-L e PBS + AmB-D mantiveram a coloração do início do ensaio, portanto o índice ao final do ensaio foi de 0% de melanização ( $p < 0,0001$ ).

A análise do índice total de saúde demonstrou que *C. tropicalis* foi capaz de causar infecção nas larvas de *G. mellonella* (Figura 17D). Os grupos tratados com AmB-L e AmB-D apesar de apresentarem o mesmo declínio na pontuação dos atributos de saúde, os mesmos ocorreram de forma mais lenta, onde não foram encontradas diferenças estatísticas entre as formulações ( $p = 0,9511$ )

Figura 17 - Pontuação média dos atributos do índice de saúde de larvas de *G. mellonella* infectada por *C. tropicalis* e tratadas com AmB-L ou AmB-D



Legenda: A) pontuação média das larvas em relação a atividade de movimentação; B) Pontuação média das larvas em relação a formação de casulo; C) Pontuação média das larvas em relação a melanização; D) Pontuação média das larvas considerando todos os atributos do índice de saúde. (Controle) grupo sem intervenção; (PBS+PBS) grupo controle do trauma inoculado com PBS; (PBS + AmB-L) grupo controle AmB-L; (PBS + AmB-D) grupo controle AmB-D; (*C. tropicalis* ( $10^8$ ) + PBS) grupo infectado; (*C. tropicalis* ( $10^8$ ) + AmB-L) grupo infectado e tratado com AmB-L; (*C. tropicalis* ( $10^8$ ) + AmB-D) grupo infectado e tratado com AmB-D.

Fonte: Elaborada pela autora.

## 6 DISCUSSÃO

Este estudo propôs comparar as formulações de anfotericina B lipossomal e convencional. O uso clínico da anfotericina B ocorreu a partir da década de 1960 e sabe-se que sua atividade está relacionada principalmente com a ligação ao ergosterol, presente na membrana dos fungos. Esta ligação promove a formação de poros, e conseqüentemente, aumento da permeabilidade, lise e morte celular (Gray et al., 2012). Apesar da anfotericina B ser o tratamento de escolha para infecções graves, seu mecanismo de ação é responsável por reações adversas, pois a ligação do fármaco ao ergosterol, também pode ocorrer com o colesterol presente em células de mamíferos, o que causa toxicidade (Grazziotin et al., 2018).

O risco de toxicidade da anfotericina B foi diminuído devido ao desenvolvimento de novas formulações a base de lipídios, como a AmB-L (Groll et al., 2019). A formulação lipossomal se diferencia da formulação convencional no tempo de circulação e liberação nos tecidos. Sua principal vantagem é a toxicidade reduzida devido a estabilidade físico-química da associação da anfotericina B aos lipossomas, o que torna o fármaco capaz de atravessar a parede celular fúngica, favorecendo sua liberação diretamente na membrana celular, diminuindo a ligação ao colesterol. (Walker et al., 2018)

Com o objetivo de comparar as formulações AmB-L e AmB-D quanto a atividade sobre células planctônicas de *Candida*, nesse estudo foi determinada a CIM utilizando-se o método de microdiluição em caldo. Como resultado, ambas as formulações apresentaram valores de CIM de 0,5 µg/mL para *C. parapsilosis* e *C. albicans*, e de 1 µg/mL para *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Os resultados de CIM semelhantes em ambas as formulações confrontam o estudo de Rodrigues e Henriques (2017), no qual a AmB-D apresentou valores de CIM menores que os obtidos com AmB-L para essas mesmas espécies de *Candida*. No entanto, de forma semelhante aos resultados encontrados em nosso estudo, Liu et al., (2020) verificaram que o valor de CIM para *C. albicans* foi de 0,5 – 1 µg/mL para AmB-L e de 0,5 µg/mL para Fungizone.

As divergências encontradas por diferentes estudos podem ocorrer em virtude do tipo de cepa microbiana e das adaptações empregadas durante a execução da

metodologia. Por isso a importância de seguir normas estabelecidas mundialmente como EUCAST e CLSI. No presente estudo foram adotadas as normas do CLSI e incluída a cepa de referência *C. parapsilosis* ATCC 90018. Os resultados obtidos para esta cepa estão de acordo com o intervalo de CIM aceito pela norma CLSI.

Diferente das células planctônicas de vida livre, o biofilme é formado a partir da fixação das leveduras às superfícies bióticas ou abióticas. A formação da matriz extracelular confere as espécies de *Candida* maior resistência física e evasão do sistema imune (Taff et al., 2013). Para avaliar a atividade das formulações de anfotericina B sobre os biofilmes de *Candida*, foram utilizadas concentrações equivalentes a 10, 20 e 50 vezes a CIM de cada cepa.

Como resultado, ambas as formulações reduziram significativamente o número de células viáveis em relação ao grupo controle não tratado, sendo encontradas diferenças estatísticas relevantes em todas as cepas testadas. No entanto, verificou-se que a atividade de AmB-D foi superior a AmB-L em todos os ensaios. Esses dados em biofilmes contrastaram com os resultados obtidos em células planctônicas, onde ambas as formulações apresentaram mesmos resultados para CIM.

A necessidade de doses elevadas de anfotericina B entre outros fármacos para a redução de biofilme já foi relatada por outros estudos (Vitális et al., 2020), bem como o perfil de resistência aumentado em relação as células planctônicas. Provavelmente, devido à capacidade intrínseca de cada cepa em produzir matriz extracelular e mutações em genes responsáveis pela produção de ergosterol, entre outros mecanismos que podem favorecer a inatividade dos antifúngicos (Prażyńska, Gospodarek 2014).

O estudo de Gómez-Molero et al. (2021) sugere que as células fúngicas do biofilme cultivado em meio YPD apresenta maior viabilidade quando comparado as células do biofilme formado em RPMI. No estudo, para reduzir 70% do biofilme de *C. parapsilosis* formado em RPMI foram necessários 5 µg/mL de Anfotericina B, enquanto para reduzir o biofilme formado no meio YPD, foram necessários 16 µg/mL do mesmo fármaco. Essa diferença entre os meios de cultura pode justificar a necessidade de doses elevadas do fármaco em nosso estudo, pois o meio utilizado foi YPD.

O fato de os biofilmes necessitarem de uma dose maior de antifúngicos para

o controle da infecção requer o uso de formulações menos tóxicas. Estudos que compararam as formulações AmB-D e AmB-L em células planctônicas e sésseis de biofilme indicaram que apesar da formulação convencional (AmB-D) apresentar atividade antifúngica superior em menores concentrações, sua utilização é limitada pela toxicidade. Então, AmB-L pode ser uma boa estratégia, uma vez que sua dose diária permitida (6 mg/kg) é maior do que a dose de AmB-D (1,2 mg/kg) (Rodrigues, Henriques, 2017).

De acordo com a teoria dos 3Rs que propõe a substituição, redução e refinamento dos modelos animais vertebrados devido às questões éticas, práticas e financeiras, o modelo invertebrado *G. mellonella* vem sendo utilizado como método alternativo *in vivo* para o estudo da patogenicidade e virulência do gênero *Candida*, assim como para avaliação da eficácia de medicamentos antifúngicos (Jemel et al., 2020). Existem trabalhos que destacam a utilidade do modelo na avaliação de drogas antifúngicas, como a comparação das diferentes classes de antifúngico sobre espécies de *Candida* (Binder et al., 2020; Ames et al., 2017). Até o momento, não existem estudos que compararam as formulações convencional e lipossomal de anfotericina B em *G. mellonella*.

Neste contexto, utilizamos *G. mellonella* para comparar a eficácia da AmB-L e AmB-D frente a infecção causada por *Candida* spp. por meio da análise da curva de sobrevivência e índice de saúde. Em concordância com os estudos de Binder et al, (2020) e Ames et al.(2017), nossos resultados mostraram que as cepas de *Candida* escolhidas foram capazes de causar a morte das larvas. Em seguida, mostramos que AmB-L ou AmB-D não foram letais para *G. mellonella* sem infecção por *Candida*, na concentração de 5 µg/larva (18,5 mg/Kg).

Como tratamento para a infecção causada por *Candida*, as larvas infectadas receberam uma dose de 5 µg/larva de AmB-L ou AmB-D. Após a contagem das larvas vivas, a curva de sobrevivência demonstrou que, assim como sobre os biofilmes de *Candida*, a AmB-D apresentou maior atividade antifúngica. Ao final do ensaio as larvas infectadas por *C. parapsilosis* e tratadas com AmB-D apresentaram 10% a mais de larvas vivas em comparação com as larvas que receberam o tratamento de AmB-L. Para as cepas *C. albicans* e *C. glabrata* a diferença foi de 20% a mais de sobrevivência no grupo tratado com AmB-D em relação ao grupo tratado com AmB-L.

Com relação a infecção causada por *C. tropicalis*, a curva de sobrevivência

demonstrou que os tratamentos não foram capazes de evitar a morte de *G. mellonella*. No entanto, houve o prolongamento do tempo de sobrevivência das larvas. O grupo infectado apresentou 90% de morte em 24 h após a infecção, para o grupo tratado com AmB-L o mesmo número de mortes ocorreu em 72 h e no grupo tratado com AmB-D 90% das mortes ocorreram em 168 h.

Além da curva de sobrevivência, nesse estudo foi analisado também o índice de saúde das larvas de *G. mellonella*. Larvas saudáveis são ativas, produzem casulo e não apresentam sinais de melanização. A inoculação de *Candida* nas larvas, causou lentidão e escurecimento ao redor do local da inoculação em poucas h. A melanização ocorre em resposta a infecção ou lesão, pela síntese do pigmento escuro, sua função é se depositar na superfície do patógeno invasor, facilitando o reconhecimento e a eliminação pelas moléculas e células de defesa do animal (Hillyer, 2016).

O índice de saúde é um sistema baseado na pontuação de quatro atributos: atividade de movimentação, formação de casulo, grau de melanização e sobrevivência. A estimativa numérica da saúde das larvas fornece em detalhes a evolução da infecção e tratamento administrado durante o ensaio. Os atributos avaliados para determinação do índice de saúde demonstraram que o tratamento com AmB-L e AmB-D diminuíram os sintomas de infecção.

*C. parapsilosis*, *C. albicans* e *C. glabrata* apesar de apresentarem números de morte diferentes para os grupos infectados, exibiram resultados semelhantes quanto aos atributos atividade de movimentação, formação de casulo e melanização do índice de saúde. *C. tropicalis*, foi a espécie mais virulenta, refletindo diretamente nos resultados obtidos. As larvas infectadas por esta cepa, em 24 h apresentaram índice de melanização de 90%, *C. albicans* foi a segunda espécie que mais causou melanização nas larvas, atingindo o índice de 75% em 24 h. *C. parapsilosis* e *C. glabrata* apresentaram índice de melanização em torno de 60% em 24 h.

Mantendo o padrão dos resultados encontrados em biofilme e curva de sobrevivência, AmB-D obteve melhores resultados, sendo mais efetiva na redução dos sintomas causados pelas infecções de *Candida*. Desse modo, a formulação convencional AmB-D mostrou-se mais eficaz do que AmB-L. No entanto, estudos adicionais são necessários, pois a dose diária de AmB-D recomendada para o tratamento das infecções fúngicas é inferior a dose recomendada de AmB-L. Diante da resistência dos biofilmes e a necessidade do uso de doses elevadas, o tratamento

de infecções fúngicas com formulações menos tóxicas como AmB-L pode ser interessante.

## 7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos concluiu-se que:

- a) As formulações AmB-L e AmB-D apresentaram valores semelhantes de concentração inibitória mínima, sendo 0,5 µg/mL para *C. parapsilosis* e *C. albicans*, e de 1 µg/mL para *C. glabrata* e *C. tropicalis*;
- b) A formulação AmB-D apresentou maior ação inibitória sobre os biofilmes de *Candida* do que a AmB-L para todas as cepas fúngicas estudadas;
- c) O tratamento com AmB-L ou AmB-D aumentou a sobrevivência e índice de saúde das larvas infectadas por *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Ao comparar as formulações de anfotericina B estudadas, AmB-D demonstrou maior eficácia *in vivo* do que AmB-L.

## REFERÊNCIAS

- Adler-Moore J, Lewis RE, Brüggemann RJM, Rijnders BJA, Groll AH, Walsh TJ. Preclinical Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Antifungal Activity of Liposomal Amphotericin B. *Clin Infect Dis*. 2019;68(Suppl4): S244–59. doi: 10.1093/cid/ciz064. PMID: 31222254.
- Adler-Moore JP, Gangneux JP, Pappas PG. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B. *Med Mycol*. 2016;54(3):223–31. doi: 10.1093/mmy/myv111. PMID: 26768369.
- Alim D, Sircaik S, Panwar SL. The significance of lipids to biofilm formation in *Candida albicans*: An emerging perspective. *J Fungi (Basel)*. 2018 Dec 18;4(4):140. doi: 10.3390/jof4040140. PMID: 30567300; PMCID: PMC6308932.
- Almshawit H, Macreadie I, Grando D. A simple and inexpensive device for biofilm analysis. *J Microbiol Methods*. 2014;98(1):59–63. doi: 10.1016/j.mimet.2013.12.020. PMID: 24389040.
- Álvarez-Lerma F, Palomar M, León C, Olaechea P, Cerdá E, Bermejo B. Colonización y/o infección por hongos en unidades de cuidados intensivos. Estudio multicéntrico de 1.562 pacientes. *Med Clin (Barc)*. 2003;121(5):161–6. doi: 10.1016/s0025-7753(03)73891-3.
- Ames L, Duxbury S, Pawlowska B, Ho H, Haynes K, Bates S. *Galleria mellonella* as a host model to study *Candida glabrata* virulence and antifungal efficacy. *Virulence*. 2017;8(8):1909–17.
- Arastehfar A, Carvalho A, Hong Nguyen M, Hedayati MT, Netea MG, Perlin DS, et al. Covid-19-associated candidiasis (Cac): An underestimated complication in the absence of immunological predispositions? *J Fungi*. 2020;6(4):1–13. doi: 10.3390/jof6040211. PMID: 33050019.
- Banville N, Browne N, Kavanagh K. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. *Virulence*. 2012;3(6):497–503. doi: 10.4161/viru.21972. PMID: 23076277.
- Berkow EL, Lockhart SR, Ostrosky-Zeichner L. Antifungal susceptibility testing: Current approaches. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(3):1–30. doi: 10.1128/CMR.00069-19. PMID: 32349998.
- Binder U, Arastehfar A, Schnegg L, Hörtnagl C, Hilmioğlu-Polat S, Perlin DS, et al. Efficacy of lamb against emerging azole-and multidrug-resistant *Candida parapsilosis*

isolates in the *Galleria mellonella* model. J Fungi. 2020;6(4):1–11. doi: 10.3390/jof6040377.

Brown AJP, Brown GD, Netea MG, Gow NAR. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. Trends Microbiol. 2014;22(11):614–22. doi: 10.1016/j.tim.2014.07.001. PMID: 25088819.

Casagrande Pierantoni D, Roscini L, Corte L, Bernardo M, Bassetti M, Tascini C, et al. Qualitative and quantitative change of the tolerance to liposomal amphotericin B triggered by biofilm maturation in *Candida parapsilosis*. Med Mycol. 2021;58(6):827–34. doi: 10.1093/MMY/MYZ113. PMID: 31758171.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). CLSI M27-A3(28): Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Wayne, PA: 2008. 13p.

Cutuli MA, Petronio G, Vergalito F, Magnifico I, Pietrangelo L, Venditti N, et al. *Galleria mellonella* as a consolidated *in vivo* model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. Virulence. 2019;10(1):527–41. doi: 10.1080/21505594.2019.1621649. PMID: 31142220.

Cavassin FB, Baú-Carneiro JL, Vilas-Boas RR, Queiroz-Telles F. Sixty years of Amphotericin B: AN OVERVIEW OF THE MAIN ANTIFUNGAL AGENT USED TO TREAT INVASIVE FUNGAL INFECTIONS. Infect Dis Ther. 2021;10(1):115–47. doi: 10.1007/s40121-020-00382-7.

Chang YL, Yu SJ, Heitman J, Wellington M, Chen YL. New facets of antifungal therapy. Virulence. 2017;8(2):222–36. doi: 10.1080/21505594.2016.1257457. PMID: 27820668.

Chandra J, Mukherjee PK. *Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. Microbiol Spectr. 2015 Aug;3(4):10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015. PMID: 26350306; PMCID: PMC4566167.

Ciurea CN, Santini A, Mare AD, Kosovski IB, Toma F, Vintila C, et al. *Candida* spp . in lower respiratory tract secretions – A ten years retrospective study. J Crit Care Med. 2021;7(3):217–26. doi: 10.2478/jccm-2021-0016.

Costa-Orlandi CB, Sardi JCO, Pitanguí NS, de Oliveira HC, Scorzoni L, Galeane MC, et al. Fungal biofilms and polymicrobial diseases. J Fungi. 2017;3(2):1–24. doi: 10.3390/jof3020022.

Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans* Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. Microb Pathog. 2018;117(February):128–38. doi: 10.1016/j.micpath.2018.02.028. PMID: 29454824.

- de Barros PP, Rossoni RD, De Camargo Ribeiro F, Junqueira JC, Jorge AOC. Temporal Profile of Biofilm Formation, Gene Expression and Virulence Analysis in *Candida albicans* Strains. *Mycopathologia*. 2017;182(3–4):285–95. doi: 10.1007/s11046-016-0088-2. PMID: 27830437.
- de Barros PP, Rossoni RD, Freire F, Ribeiro F de C, Lopes LA das C, Junqueira JC, et al. *Candida tropicalis* affects the virulence profile of *Candida albicans*: an *in vitro* and *in vivo* study. *Pathog Dis*. 2018;76(2):1–9. doi: 10.1093/femspd/fty014. PMID: 29617858.
- Doi AM, Pignatari ACC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LFA, Siqueira RA, et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. *PLoS One*. 2016;11(1):1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0146909. PMID: 26808778.
- Dorocka-Bobkowska B, Düzgüneş N, Konopka K. AmBisome and amphotericin B inhibit the initial adherence of *Candida albicans* to human epithelial cell lines, but do not cause yeast detachment. *Med Sci Monit*. 2009;15(9):262–9. PMID: 19721394.
- Gómez-Molero E, De-La-pinta I, Fernández-Pereira J, Groß U, Weig M, Quindós G, et al. *Candida parapsilosis* colony morphotype forecasts biofilm formation of clinical isolates. *J Fungi*. 2021;7(1):1–12. doi: 10.3390/jof7010033.
- Grazziotin LR, Moreira LB, Ferreira MAP. Comparative effectiveness and safety between amphotericin B lipidformulations: A systematic review. *Int J Technol Assess Health Care*. 2018;34(3):343–51. doi: 10.1017/S026646231800034X. PMID: 29897025.
- Gil-Bona A, Llama-Palacios A, Parra CM, Vivanco F, Nombela C, Monteoliva L, et al. Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *J Proteome Res*. 2015;14(1):142–53. doi: 10.1021/pr5007944.
- Gonçalves B, Fernandes L, Henriques M, Silva S. Environmental pH modulates biofilm formation and matrix composition in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling*. 2020;36(5):621–30. doi: 10.1080/08927014.2020.1793963. PMID: 32674601.
- Gray KC, Palacios DS, Dailey I, Endo MM, Uno BE, Wilcock BC, et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(7):2234–9. doi: 10.1073/pnas.1117280109. PMID: 22308411.
- Groll AH, Rijnders BJA, Walsh TJ, Adler-Moore J, Lewis RE, Brüggemann RJM. Clinical Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Safety and Efficacy of Liposomal Amphotericin B. *Clin Infect Dis*. 2019;68(Suppl 4): S260–74. doi: 10.1093/cid/ciz076. PMID: 31222253.

Herrada J, Gamal A, Long L, Sanchez SP, McCormick TS, Ghannoum MA. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of AmBisome compared to conventional amphotericin B and fluconazole against *Candida auris*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(6):1–4. doi: 10.1128/AAC.00306-21. PMID: 33846131.

Hoyer LL, Green CB, Oh SH, Zhao X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family - A sticky pursuit. *Med Mycol*. 2008;46(1):1–15. doi: 10.1080/13693780701435317. PMID: 17852717.

Hull CM, Parker JE, Bader O, Weig M, Gross U, Warrilow AGS, et al. Facultative sterol uptake in an ergosterol-deficient clinical isolate of *Candida glabrata* harboring a missense mutation in ERG11 and exhibiting cross-resistance to azoles and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(8):4223–32. doi: 10.1128/AAC.06253-11. PMID: 22615281.

Jensen RH, Astvad KMT, Silva LV, Sanglard D, Jørgensen R, Nielsen KF, et al. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance *in vivo* in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(9):2551–5. doi: 10.1093/jac/dkv140. PMID: 26017038.

Jemel S, Guillot J, Kallel K, Botterel F, Dannaoui E. *Galleria mellonella* for the Evaluation of Antifungal Efficacy against Medically Important Fungi, a Narrative Review. *Microorganisms*. 2020 Mar 11;8(3):390. doi: 10.3390/microorganisms8030390. PMID: 32168839; PMCID: PMC7142887.

Jorjão AL, Oliveira LD, Scorzoni L, Figueiredo-Godoi LMA, Prata MCA, Jorge AOC, et al. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for *in vivo* microbiological studies. *Virulence*. 2018;9(1):383–9. doi: 10.1080/21505594.2017.1397871.

Junqueira JC, Vilela SF, Rossoni RD, Barbosa JO, Costa AC, Rasteiro VMC, et al. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2012 Jan-Feb;54(1):17-24.

Köhler JR, Hube B, Puccia R, Casadevall A, Perfect JR. Fungi that infect humans. *The Fungal Kingdom*. 2017(4):813–43. doi: 10.1128/9781555819583.ch39.

Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: Unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(6):1773–80. doi: 10.1128/AAC.46.6.1773-1780.2002. PMID: 12019089.

Larkin E, Hager C, Chandra J, Mukherjee PK, Retuerto M, Salem I, et al. The emerging pathogen *Candida auris*: Growth phenotype, virulence factors, activity of antifungals, and effect of SCY-078, a novel glucan synthesis inhibitor, on growth

morphology and biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(5):1–13. doi: 10.1128/AAC.02396-16. PMID: 28223375.

Li DD, Deng L, Hu GH, Zhao LX, Hu DD, Jiang YY, et al. Using *Galleria mellonella-candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(9):1482–7. doi: 10.1248/bpb.b13-00270. PMID: 23995660.

Liu Y, Mei Z, Mei L, Tang J, Yuan W, Srinivasan S, et al. Analytical method development and comparability study for AmBisome® and generic Amphotericin B liposomal products. *Eur J Pharm Biopharm.* 2020;157(April):241–9. doi: 10.1016/j.ejpb.2020.09.008. PMID: 32980448.

Leon CG, Lee J, Bartlett K, Gershkovich P, Wasan EK, Zhao J, Clement JG, Wasan KM. In vitro cytotoxicity of two novel oral formulations of Amphotericin B (iCo-009 and iCo-010) against *Candida albicans*, human monocytic and kidney cell lines. *Lipids Health Dis.* 2011 Aug 20;10:144. doi: 10.1186/1476-511X-10-144. PMID: 21854638; PMCID: PMC3173361.

Logan C, Martin-Loeches I, Bicanic T. Invasive candidiasis in critical care: challenges and future directions. *Intensive Care Med.* 2020;46(11):2001–14. doi: 10.1007/s00134-020-06240-x. PMID: 32990778.

MacArthur Clark J. The 3Rs in research: A contemporary approach to replacement, reduction, and refinement. *Br J Nutr.* 2018;120(s1): S1–7. doi: 10.1017/S0007114517002227. PMID: 29081302.

Marcos-Zambrano LJ, Gómez-Perosanz M, Escribano P, Zaragoza CO, Bouza E, Guinea J. Biofilm production and antibiofilm activity of echinocandins and liposomal amphotericin B in Echinocandin-Resistant yeast species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(6):3579–86. doi: 10.1128/AAC.03065-15. PMID: 27021323.

Moreno-Rodríguez AC, Torrado-Durán S, Molero G, García-Rodríguez JJ, Torrado-Santiago S. Efficacy, and toxicity evaluation of new amphotericin B micelle systems for brain fungal infections. *Int J Pharm.* 2015;494(1):17–22. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.08.003. PMID: 26256151.

Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol.* 2015;69(1):71–92. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104330. PMID: 26488273.

Pais P, Galocha M, Viana R, Cavalheiro M, Pereira D, Teixeira MC. Microevolution of the pathogenic yeasts *Candida albicans* and *Candida glabrata* during antifungal therapy and host infection. *Microb Cell.* 2019;6(3):142–59. doi: 10.15698/mic2019.03.670.

Prażyńska M, Gospodarek E. In Vitro Effect of Amphotericin B on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* Biofilm Formation. *Mycopathologia*. 2014;177(1–2):19–27. doi: 10.1007/s11046-014-9727-7. PMID: 24436013.

Pellon A, Sadeghi Nasab SD, Moyes DL. New Insights in *Candida albicans* Innate Immunity at the Mucosa: Toxins, Epithelium, Metabolism, and Beyond. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10(March):1–14. doi: 10.3389/fcimb.2020.00081. PMID: 32195196.

Pereira TC, Barros PP de, de Oliveira Fugisaki LR, Rossoni RD, Ribeiro F de C, Menezes RT de et al. Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. *J Fungi*. 2018;4(4). doi: 10.3390/jof4040128.

Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, William Costerton J, Shirtliff ME. Polymicrobial interactions: Impact on pathogenesis and human disease. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(1):193–213. doi: 10.1128/CMR.00013-11. PMID: 22232376.

Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL Jr, Mowat E, Ramage G, et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc*. 2008;3(9):1494–500. doi: 10.1038/nprot.2008.141. PMID: 18772877; PMCID: PMC2741160.

Ramage G, Wickes BL. Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of. *Society*. 2001;45(9):2475–9. doi: 10.1128/AAC.45.9.2475. PMID: 11502517.

Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms, and impact. *Current Opinion Microbiol*. 2018;45(Figure 2):70–6. doi: 10.1016/j.mib.2018.02.005.

Rex JH, Pfaller MA, Lancaster M, Odds FC, Bolmstrom A, Rinaldi MG. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory standards-recommended broth macrodilution testing of ketoconazole and itraconazole. *J Clin Microbiol*. 1996;34(4):816–7. doi: 10.1128/jcm.34.4.816-817.1996. PMID: 8815089.

Rodrigues CF, Henriques M. Liposomal and deoxycholate amphotericin b formulations: Effectiveness against biofilm infections of *Candida* spp. *Pathogens*. 2017;6(4):1–13. doi: 10.3390/pathogens6040062.

Rodrigues ML, Albuquerque PC. Searching for a change: The need for increased support for public health and research on fungal diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(6):1–5. doi: 10.1371/journal.pntd.0006479.

Rojas AE, Pérez JE, Hernández JS, Zapata Y. Análisis cuantitativo de la expresión de genes de resistencia a fluconazol en cepas de *Candida albicans* aisladas al ingreso de adultos mayores a una unidad de cuidados intensivos de Manizales, Colombia. *Biomédica*. 2020;40(1):153–65. doi: 10.7705/biomedica.4723.

Salehi M, Ahmadikia K, Mahmoudi S, Kalantari S, Jamalimoghadamsiahkali S, Izadi A, et al. Oropharyngeal candidiasis in hospitalised COVID-19 patients from Iran: Species identification and antifungal susceptibility pattern. *Mycoses*. 2020;63(8):771–8. doi: 10.1111/myc.13137. PMID: 32609906.

Santos JD, Piva E, Vilela SF, Jorge AO, Junqueira JC. Mixed biofilms formed by *C. albicans* and non-*albicans* species: a study of microbial interactions. *Braz Oral Res*. 2016;30:S1806-83242016000100232. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0023. Epub 2016 Mar 15. PMID: 26981754.

Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol*. 2009;53(1):41–4. doi:10.1111/j.1348-0421.2008.00083.x.\

Scorzoni L, de Lucas MP, Mesa-Arango AC, Fusco-Almeida AM, Lozano E, Cuenca-Estrella M, et al. Antifungal Efficacy during *Candida krusei* Infection in Non-Conventional Models Correlates with the Yeast In Vitro Susceptibility Profile. *PLoS One*. 2013;8(3). doi: 10.1371/journal.pone.0060047.

Seyoum E, Bitew A, Mihret A. Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species isolated in different clinical samples and their in vitro antifungal susceptibility profile in Ethiopia. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):1–9. doi: 10.1186/s12879-020-4883-5. PMID: 32188422.

Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans Candida* species: Quantification, structure, and matrix composition. *Med Mycol*. 2009;47(7):681–9. doi: 10.3109/13693780802549594. PMID: 19888800.

Singh R, Kumari A, Kaur K, Sethi P, Chakrabarti A. Relevance of antifungal penetration in biofilm-associated resistance of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species. *J Med Microbiol*. 2018;67(7):922–6. doi: 10.1099/jmm.0.000757. PMID: 29767615.

Smith DFQ, Casadevall A. Fungal immunity and pathogenesis in mammals versus the invertebrate model organism *Galleria mellonella*. *Pathog Dis*. 2021;79(3):1–25. doi: 10.1093/femspd/ftab013. PMID: 33544836.

Soldini S, Posteraro B, Vella A, De Carolis E, Borghi E, Falleni M, et al. Microbiologic and clinical characteristics of biofilm-forming *Candida parapsilosis* isolates

associated with fungaemia and their impact on mortality. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(7):771–7. doi: 10.1016/j.cmi.2017.11.005. PMID: 29133157.

Srinivasan A, Gupta CM, Agrawal CM, Leung KP, Lopez-Ribot JL, Ramasubramanian AK. Drug susceptibility of matrix-encapsulated *Candida albicans* nano-biofilms. *Biotechnol Bioeng.* 2014;111(2):418–24. doi: 10.1002/bit.25120. PMID: 24114441.

Sroussi HY, Epstein JB, Bensadoun RJ, Saunders DP, Lalla RV, Migliorati CA, et al. Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis. *Cancer Med.* 2017;6(12):2918–31. doi: 10.1002/cam4.1221. PMID: 29071801.

Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol.* 2013;8(10):1325–37. doi: 10.2217/fmb.13.101. PMID: 24059922.

Takemoto K, Yamamoto Y, Ueda Y. Evaluation of antifungal pharmacodynamic characteristics of AmBisome against *Candida albicans*. *Microbiol Immunol.* 2006;50(8):579–86. doi: 10.1111/j.1348-0421.2006.tb03832.x. PMID: 16924142.

Tan Y, Leonhard M, Ma S, Moser D, Schneider-Stickler B. Dispersal of single and mixed non-*albicans* *Candida* species biofilms by  $\beta$ -1,3-glucanase in vitro. *Microb Pathog.* 2017 Dec;113:342–347. doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.057. PMID: 29101060.

Touil HFZ, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K. In vitro activity of antifungal combinations against planktonic and sessile cells of *Candida albicans* isolated from medical devices in an intensive care department. *J Mycol Med.* 2018;28(3):414–8. doi: 10.1016/j.mycmed.2018.06.008. PMID: 30032993.

Trevijano-Contador N, Zaragoza O. Immune response of *Galleria mellonella* against human fungal pathogens. *J Fungi.* 2019;5(1):1–13. doi: 10.3390/jof5010003.

Van De Ven H, Paulussen C, Feijens PB, Matheeußen A, Rombaut P, Kayaert P, et al. PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent in vitro and in vivo alternatives to Fungizone and AmBisome. *J Control Release.* 2012;161(3):795–803. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.05.037. PMID: 22641062.

Vertyporokh L, Wojda I. Immune response of *Galleria mellonella* after injection with non-lethal and lethal dosages of *Candida albicans*. *J Invertebr Pathol.* 2020;170:107327. doi: 10.1016/j.jip.2020.107327. PMID: 31945326.

Vila T, Ishida K, Seabra SH, Rozental S. Miltefosine inhibits *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* spp. biofilms and impairs the dispersion of infectious cells. *Int*

J Antimicrob Agents. 2016;48(5):512–20. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.07.022. PMID: 27667564.

Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral candidiasis: A disease of opportunity. J Fungi. 2020;6(1):1–28. doi: 10.3390/jof6010015.

Vitális E, Nagy F, Tóth Z, Forgács L, Bozó A, Kardos G, et al. *Candida* biofilm production is associated with higher mortality in patients with candidaemia. Mycoses. 2020;63(4):352–60. doi: 10.1111/myc.13049. PMID: 31943428.

Walker L, Sood P, Lenardon MD, Milne G, Olson J, Jensen G, et al. The viscoelastic properties of the fungal cell wall allow traffic of AmBisome as intact liposome vesicles. MBio. 2018;9(1):1–15. doi: 10.1128/mBio.02383-17. PMID: 29437927.

Wall G, Lopez-Ribot JL. Current antimycotics, new prospects, and future approaches to antifungal therapy. Antibiotics. 2020;9(8):1–10. doi: 10.3390/antibiotics9080445.

Wall G, Montelongo-Jauregui D, Vidal Bonifacio B, Lopez-Ribot JL, Uppuluri P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. Curr Opin Microbiol. 2019 Dec;52:1-6. doi: 10.1016/j.mib.2019.04.001. Epub 2019 May 11. PMID: 31085405; PMCID: PMC6842673.

Witchley JN, Penumetcha P, Abon N V., Woolford CA, Mitchell AP, Noble SM. *Candida albicans* Morphogenesis Programs Control the Balance between Gut Commensalism and Invasive Infection. Cell Host Microbe. 2019;25(3):432-443.e6. doi: 10.1016/j.chom.2019.02.008. PMID: 30870623.

Witherden EA, Shoaie S, Hall RA, Moyes DL. The human mucosal mycobiome and fungal community interactions. J Fungi. 2017;3(4):1–12. doi: 10.3390/jof3040056.