



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

JULIANA DE CAMARGO FENLEY

**EFEITOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DOS INIBIDORES DA PROTEASE DO
HIV ATAZANAVIR E DARUNAVIR EM *Candida albicans*: formação
de biofilme, filamentação e infecção em modelo de *Galleria
mellonella***

JULIANA DE CAMARGO FENLEY

**EFEITOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DOS INIBIDORES DA PROTEASE DO HIV
ATAZANAVIR E DARUNAVIR EM *Candida albicans*: formação de biofilme,
filamentação e infecção em modelo de *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 BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia / Imunologia. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico.

Orientador: Prof. Dr. Rodnei Dennis Rossoni

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2021]. 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).

Fenley, Juliana de Camargo

Efeitos in vitro e in vivo dos inibidores da protease do HIV Atazanavir e Darunavir nos fatores de virulência de Candida albicans: formação de biofilme, filamentação e infecção em modelo de Galleria mellonella. / Juliana de Camargo Fenley. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.
53 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2021.

Orientador: Rodnei Dennis Rossoni.

1. Candida albicans. 2. Fatores de virulência. 3. Inibidores da protease de HIV. 4. Sulfato de Atazanavir. 5. Darunavir. I. Rossoni, Rodnei Dennis, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodnei Dennis Rossoni (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. João Nobrega de Almeida Júnior

Universidade Federal do Estado de São Paulo (Unifesp)

Escola Paulista de Medicina

Profa. Dra. Liliana Scorzoni

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 28 de maio de 2021

DEDICATÓRIA

À minha mãe Nilce de Camargo Fenley, por todo incentivo e a dedicação de sempre. Sou o que sou e cheguei onde estou graças a você.

Ao meu marido Yuri Gollino, pelo suporte e motivação.

Às minhas filhas Isabela Fenley Gollino e Fernanda Fenley Gollino pela inspiração em ser sempre melhor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodnei Dennis Rossoni, pela paciência, dedicação e pelo exemplo de organização, experiência e comprometimento.

À Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, acompanhar sua experiência na docência e por sua participação desde a elaboração até a defesa deste trabalho.

À Profa. Dra. Patrícia Pimentel de Barros, pelo exemplo de meticulosidade e auxílio na elaboração e condução da pesquisa.

À Profa. Dra. Liliana Scorzoni pela convivência e prontidão em ajudar.

Às professoras Coordenadoras do Mestrado e Doutorado do Programa de Biopatologia Bucal do ICT-UNESP, Profa. Dra. Luciene Dias de Oliveira e Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcelos pela dedicação para com os alunos e para com o Programa de Pós-Graduação.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Bucal do ICT Unesp pela convivência, em especial Maíra Terra Garcia, sempre tão disposta e solícita, e Evelyn Luzia de Souza Santos sempre tão agradável e tranquila.

Ao Prof. Dr. Lauro Perdigão Neto pela disponibilidade em contribuir com este trabalho em sua fase de qualificação e defesa.

Ao Prof. Dr. João Nobrega de Almeida Júnior, pela prontidão em participar da etapa final deste desafio.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS.....	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 PROPOSIÇÃO.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Cepas de micro-organismos.....	20
3.2 Agentes antirretrovirais e determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	20
3.3 Ação dos medicamentos na formação de biofilme de <i>C. albicans</i>	21
3.3.1 Análise temporal do crescimento de <i>C. albicans</i> pela contagem do número de células viáveis.....	22
3.3.2 Análise temporal do biofilme de <i>C. albicans</i> por quantificação da biomassa total.....	22
3.3.3 Avaliação da expressão dos genes <i>BRC1</i> e <i>SAP2</i> nos biofilmes de <i>C. albicans</i>	23
3.3.3.1 Extração de RNA.....	23
3.3.3.2 Transcrição Reversa (RT-PCR)	24
3.3.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase.....	24
3.4 Ensaio de filamentação.....	25
3.5 Estudo <i>in vivo</i>	25
3.5.1 Análise da toxicidade ATV e DRV em <i>G. mellonella</i>	26
3.5.2 Preparo da suspensão de <i>C. albicans</i>	26
3.5.3 Injeção de fármacos em <i>G. mellonella</i>	26
3.5.4 Determinação da curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i>	27
3.6 Análise Estatística.....	27

4 RESULTADOS.....	28
4.1 Ensaios <i>in vitro</i>.....	28
4.1.1 Teste de Concentração Inibitória Mínima.....	28
4.1.2 Avaliação do efeito de ATV e DRV na contagem de UFC/mL em biofilmes de <i>C albicans</i>.....	30
4.1.3 Avaliação do efeito de ATV e DRV na biomassa dos biofilmes de <i>C. albicans</i>.....	31
4.1.4 Avaliação da expressão dos genes <i>BRC1</i> e <i>SAP2</i> nos biofilmes de <i>C. albicans</i>.....	32
4.1.5 Efeitos de ATV e DRV sobre a filamentação de <i>C. albicans</i>.....	34
4.2 Ensaios <i>in vivo</i>.....	35
4.2.1 Toxicidade de ATV e DRV em <i>Galleria mellonella</i>.....	36
4.2.2 Efeitos de ATV e DRV na candidose experimental em <i>Galleria mellonella</i>.....	37
5 DISCUSSÃO.....	40
6 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIC	Concentração Inibitória de Biofilme
CA60	Cepa clínica de <i>C. albicans</i> sensível a fluconazol
CA70	Cepa clínica de <i>C. albicans</i> resistente a fluconazol
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Ótica
HAART	Terapia Antirretroviral Altamente Eficaz
HIV:	Vírus da Imunodeficiência Humana
IP-HIV	Inibidor da Protease do HIV
IPs-HIV	Inibidores da Protease do HIV
ITRN	Inibidor da Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeo
MTT	Sal tetrazólio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio)
PBS:	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia Polimerase quantitativa
Sap	Enzima aspartil protease secretada
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Humana
TARV	Terapia Antirretroviral
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
XTT	Sal tetrazólio (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida)
YNB	Meio de cultura <i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	Meio de cultura <i>Yeast Peptone Dextrose</i>

Fenley JC. Efeitos *in vitro* e *in vivo* dos inibidores da protease do HIV Atazanavir e Darunavir nos fatores de virulência de *Candida albicans*: formação de biofilme, filamentação e infecção em modelo de *Galleria mellonella* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

RESUMO

Candida albicans é um fungo que habitualmente coloniza superfícies mucosas de humanos e pode assumir caráter patogênico a depender de fatores do hospedeiro. Portadores da Síndrome da Imunodeficiência Humana, causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), são propícios a apresentar candidose nas mucosas devido a imunodeficiência celular que apresentam. A introdução da Terapia Antirretroviral (TARV), em especial o surgimento dos Inibidores da Protease do HIV (IPs-HIV), reduziu drasticamente a incidência e prevalência destas patologias ao longo dos anos. Estudos clínicos e epidemiológicos com IPs-HIV de primeira geração demonstraram que tal redução não se deve exclusivamente à melhora imunológica promovida pela TARV, e pesquisas *in vitro* já demonstraram propriedades antifúngicas e antibiofilme de alguns IPs-HIV de primeiras gerações em *C. albicans*. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do Atazanavir (ATV) e Darunavir (DRV), dois IPs-HIV de segunda e terceira geração respectivamente em uso clínico atual no Brasil, em diferentes fatores de virulência de *C. albicans*. Para isso foram realizados estudos com duas cepas clínicas de *C. albicans* isoladas de lesões de candidose orofaríngea de pacientes portadores de HIV para avaliar a ação *in vitro* das drogas na morfogênese, formação de biofilme (contagem de células viáveis e quantificação de biomassa) e na expressão dos genes de virulência *BRC1* e *SAP2*, e *in vivo* no efeito protetor desses medicamentos na infecção experimental por *C. albicans* em modelo de *Galleria mellonella*. Os dados foram analisados por teste *t*, ANOVA, Kruskal-Wallis, Dunn e Kaplan-Meier ($p < 0,05$). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) para ambos os IPs-HIV testados foi 512 µg/mL. Nos biofilmes, a redução na contagem de UFC/mL de *C. albicans* nos grupos tratados com IPs-HIV foi de até 6,81 Log. A biomassa dos biofilmes tratados também sofreu reduções significantes para ATV (82%), DRV (81%) comparada ao grupo controle. DRV e ATV promoveram redução estatisticamente significativa de expressão gênica de *SAP2* e *BRC1*, respectivamente, quando comparados ao controle ($p < 0,05$). Em relação à morfogênese de *C. albicans*, ATV e DRV inibiram significativamente a formação de hifas ($p = 0,0183$). No estudo *in vivo*, o uso profilático de ATV e DRV em *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* prolongou em até 40% a sobrevivência das larvas ($p = 0,0004$). Conclui-se que ATV e DRV inibiram a filamentação e apresentaram atividade antifúngica, antibiofilme e na expressão de genes de fatores de virulência de *C. albicans* e preveniram candidose em *G. mellonella*.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Fatores de virulência. Inibidores da protease de HIV. Sulfato de Atazanavir. Darunavir.

Fenley JC. *In vitro* and *in vivo* effects of the HIV Protease Inhibitors Atazanavir and Darunavir in virulence factors of Candida albicans: biofilm formation, hyphae formation and infection in Galleria mellonella model [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.

ABSTRACT

Candida albicans is a fungus that usually colonizes mucous surfaces of humans and can assume pathogenic character depending on host factors. Patients with Human Immunodeficiency Syndrome, caused by the Human Immunodeficiency Virus (HIV), are favorable to present mucous candidosis due to the cellular immunodeficiency they present. The introduction of Antiretroviral Therapy (ART), especially the emergence of HIV Protease Inhibitors (HIV-PI), has drastically reduced the incidence and prevalence of these mycosis over the years. Clinical and epidemiological studies with first-generation HIV-PIs have shown that this reduction is not exclusively due to the immunological improvement promoted by ART, and *in vitro* research has already demonstrated antifungal and antibiofilm properties of firsts-generations HIV-PIs on C. albicans. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of Atazanavir (ATV) and Darunavir (DRV), two HIV-PIs of second and third generation respectively currently in clinical use in Brazil, on virulence factors of C. albicans. For this purpose, studies were carried out with two clinical strains of C. albicans isolated from lesions of oropharyngeal candidosis of HIV positive patients to evaluate *in vitro* action of the drugs on morphogenesis, biofilm formation (number of viable cell and biomass determination) and virulence factor genes BRC1 and SAP2 expression and *in vivo* on the protective effect of these drugs on experimental infection by C. albicans in Galleria mellonella model. Data were analyzed by t Student, ANOVA, Kruskal-Wallis and Dunn and Kaplan-Meier ($p < 0.05$) tests. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for both tested HIV-PIs was 512 $\mu\text{g/mL}$. In biofilms, a reduction in the CFU/mL count of C. albicans in the groups treated with HIV-PIs was up to 6.81 log. The biomass of biofilms also suffered significant reductions for ATV (82%) and DRV (81%) compared to the control group. DRV and ATV statistically significantly downregulated the expression of SAP2 and BRC1 genes respectively ($p < 0,05$). Regarding the morphogenesis of C. albicans, ATV and DRV inhibited the formation of hyphae ($p = 0.0183$). In the *in vivo* study, the prophylactic use of ATV and DRV in G. mellonella infected with C. albicans prolonged larval survival by up to 40% ($p = 0.0004$). We can conclude that ATV and DRV inhibited filamentation and showed antifungal activity, being able to inhibit growth, formation and virulence factors gene expression of C. albicans biofilm and prevented candidosis in G. mellonella.

Keywords: Candida albicans. Virulence factors. HIV protease inhibitors. Atazanavir sulfate. Darunavir.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* configura como o mais frequente patógeno fúngico capaz de causar doenças em seres humanos (Colombo, Guimarães, 2003; Mello et al., 2017; Santos, 2011; da Silva Dantas et al., 2016; Thein et al., 2006). A espécie *Candida albicans* é a mais prevalente e responsável por mais da metade dos casos de infecções, causando tanto micoses superficiais quanto doenças invasivas (Mello et al., 2017, Chanda et al., 2017, Colombo et al., 2013). Habitualmente coloniza as superfícies mucosas de humanos (trato gastrointestinal, respiratório e geniturinário) e sua patogenicidade pode se dar em consequência de modificações no sistema imune do hospedeiro, que secundariamente permite transformações no comportamento da levedura favorecendo atuação dos seus fatores de virulência (Chanda et al., 2017; Colombo et al., 2013; Samaranayake et al., 2009; Tsang, Hong, 2010), que vão desde a sua flexibilidade metabólica, versatilidade morfológica, capacidade de adesão, produção de enzimas (fosfolipase, estearase e aspartil proteases secretadas, conhecidas como Saps) e de formação de biofilme (François et al., 2013; da Silva Dantas et al., 2016; Thein et al., 2006).

Biofilmes são comunidades microbianas aderidas a superfícies sólidas (bióticas ou abióticas) que se comportam com um padrão similar de agregação e produção de uma matriz extracelular polissacarídica. No caso do gênero *Candida* estes são compostos de uma malha complexa de leveduras, pseudo-hifas e hifas envolta na matriz extracelular de polissacarídeos. O processo de formação do biofilme se inicia com a adesão das células ao substrato, seguido pela fase de proliferação das células aderidas formando micro-colônias com deposição de matriz extracelular e transição da morfologia de leveduriforme para filamentosa (pseudo-hifas e hifas); a maturação do biofilme se dá pela produção de uma matriz exopolimérica que atua como sustentação da arquitetura do biofilme e por último ocorre a dispersão de células e fragmentos do biofilme maduro permitindo a disseminação sistêmica da infecção. A capacidade de formação do biofilme sabidamente contribui para a resistência a medicamentos antifúngicos e seu processo de formação favorece a filamentação, um dos principais mecanismos de patogenicidade do fungo, responsável pela invasão e injúria tecidual no hospedeiro (Barros et al., 2020; Chanda et al., 2017; Mello et al.,

2017; Santos et al., 2018).

Tais processos de formação de biofilme são controlados por fatores de transcrição capazes de influenciar as respostas celulares de acordo com os estímulos ambientais dependente da regulação de vias de expressão de vários genes (Barros et al., 2020; Motaung et al., 2017). No gênero *Candida* os mecanismos moleculares de regulação da fase de adesão são comandados por uma gama de genes, com destaque para os da família *ALS* que codificam adesinas de congregação e *HWP1* que codifica uma adesina expressa somente por hifas (Ten Cate et al., 2009; Costa et al., 2013; Nobile, Mitchell, 2006). Na fase precoce de formação de biofilme destaca-se o fator de transcrição *Brc1*, que regula a expressão de proteínas de superfície celular codificadas pelos genes citados, além de outros como *HYR1*, *ECE1*, *RBT5*, *ECM331* (Cavalheiro, Teixeira, 2018; Nobile, Mitchell, 2005). A transição morfológica de levedura para hifa é mediada principalmente pelo gene *EFG1* e outros, como *CPH1*, *TEC1*, *SUV3*, *NUP85*, *UME6*, *MDS3* e *KEM3* (Blankenship, Mitchell, 2006; Ramage et al., 2009). As células são envolvidas pela matriz extracelular decorrente da expressão dos genes *ADH1*, *GCA1* e *GCA2* (Blankenship, Mitchell, 2006; Finkel, Mitchell, 2011). Por fim, a fase de dispersão é regulada positivamente pela expressão dos genes *PES1* e *NRG1* e negativamente pelos genes *UME6* e *SUR7* (Costa et al., 2013; Nobile, Mitchell, 2006).

O dano celular causado pelo estabelecimento do biofilme deve-se, dentre outros fatores, à expressão de genes para as enzimas histolíticas com destaque para as Saps (De Bernardis et al., 2001). As Saps são codificadas por uma família de 10 genes homólogos (*SAP1-10*). Essas proteínas têm como função degradar barreiras tissulares durante invasão, destruição de moléculas de defesa do hospedeiro por meio de clivagem de imunoglobulinas e componentes do complemento, citocinas e peptídeos antimicrobianos, nutrição e adesão a superfícies bióticas e abióticas, constituindo um importante fator de virulência (De Bernardis et al., 2001; Hube, Naglik, 2001; Naglik et al., 2004).

Na cavidade bucal, a candidose oral é a patologia superficial causada por este fungo mais comum em humanos, se apresenta clinicamente como formas eritematosa, pseudomembranosa, hiperplásica, glossite romboide mediana, queilite angular e eritema gengival linear (mais recentemente descrita e relacionada à SIDA), e são decorrentes da formação de biofilme em hospedeiros com resposta imune

deficiente, seja por fatores imunodepressores sistêmicos (extremos de idade, medicamentos ou comorbidades), locais (xerostomia, próteses), ou ainda associada a outros fatores de risco como uso prolongado de antibióticos (Samaranayake, 1992; Samaranayake et al., 2009).

Pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Humana (SIDA) são especialmente propensos a infecções mucosas pelo gênero *Candida*, devido a imunodeficiência celular relacionada à depleção de linfócitos T CD4 causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), seu agente etiológico. A candidose orofaríngea é uma das doenças oportunistas mais frequentes em pacientes com SIDA, representando um marcador de progressão de doença, altamente prevalente no início da epidemia, quando não havia terapia antirretroviral (TARV) eficaz (Borg-von Zepelin et al., 1999; Korting et al., 1999; Sangeorzan et al., 1994). No final década de 80 surgiram os inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeos (ITRN), que ofereceram alguma ação no controle virológico, porém foi somente em 1995, com o surgimento dos Inibidores de Protease do HIV (IPs-HIV), usados em conjunto com os ITRN que se compôs a chamada “terapia antirretroviral altamente eficaz” (HAART), capaz de promover controle virológico completo, favorecendo a recuperação imunológica e, conseqüentemente, prevenção do aparecimento de doenças oportunistas e aumento significativo na sobrevida do portadores dessa patologia (Hoeg et al., 2009; Souza, Almeida, 2005; Wlodawer, Erickson, 1993).

Os IPs-HIV atuam inibindo a aspartil protease do HIV (responsável por clivar poliproteínas precursoras Gag e Gag-Pol em proteínas funcionais e estruturais do vírus), impedindo sua maturação e bloqueando a infectividade de novos vírions. A primeira geração dessa classe é representada pelos fármacos Ritonavir, Nelfinavir, Saquinavir, Indinavir e Amprenavir, que tiveram seu uso clínico pouco a pouco abandonado devido a toxicidade, alta prevalência de efeitos colaterais, posologia complicada e emergência de resistência viral, à medida que drogas mais modernas foram surgindo (Santos, Braga-Silva, 2013; Souza, Almeida, 2005). A segunda geração de IPs-HIV é representada pelas drogas Fosamprenavir, Lopinavir, Atazanavir (ATV) e Tipranavir, que agregaram maior barreira genética contra resistência viral, facilidade posológica e razoável redução dos efeitos colaterais, porém necessitam ser utilizadas com Ritonavir em baixas doses como potencializador (“*booster*”). Dentre esses, Tipranavir foi o último a ser lançado no mercado, em 2005.

A terceira geração possui apenas um representante em uso clínico e comercial, chamado Darunavir (DRV), que é o principal IP-HIV em uso clínico atual (Corrêa et al., 2013). No Brasil o tratamento para HIV é universalmente garantido pelo Ministério da Saúde, e os IPs-HIV estão previstos para uso em crianças e adultos como terapia de segunda escolha (em casos de intolerância ou impossibilidade de uso de outras classes no início de terapia) ou em situações de resgate por falha virológica. Estão disponíveis as formulações Lopinavir/ritonavir, ATV, Fosamprenavir, Tipranavir e DRV, todos em uso concomitante com Ritonavir como *booster* (Ministério da Saúde ((Brasil), 2018a, 2018b).

O ATV (Reyataz®) é o único Azapeptídeo da classe, lançado nos Estados Unidos em 2003 e foi o primeiro IP-HIV com a vantagem farmacocinética favorável a posologia de uso uma vez ao dia, o que associado à melhor tolerabilidade gastrointestinal, reduzida toxicidade metabólica e comparável potência virológica o fez ganhar mercado e permitiu sua persistência até o momento no protocolo de tratamento brasileiro (Ministério da Saúde (Brasil), 2018a). Atualmente a posologia recomendada é de 300mg em uso conjunto com *booster* de ritonavir. (Mastrolorenzo et al., 2007; Ministério da Saúde (Brasil), 2018a).

O DRV (Prezista®) é um IP-HIV sintético e não peptídico, desenvolvido em 1998 pelo laboratório farmacêutico Tibotec (Ghosh et al., 1998), hoje uma empresa do grupo Johnson & Johnson. O medicamento foi licenciado em junho de 2006 nos Estados Unidos e em fevereiro de 2007 na União Europeia (Corrêa et al., 2013; Van Gyseghem et al., 2009), e disponibilizado pelo Ministério da Saúde do Brasil desde 2008. A dose oral diária de DRV para pacientes adultos sem evidência de resistência aos IPs-HIV é de 800 mg acrescido de 100 mg de ritonavir uma vez por dia, administrados com alimentos (Corrêa et al., 2013; Sekar et al., 2007) ou 600mg acrescidos de 100mg de ritonavir a cada 12 horas (Corrêa et al., 2013; Ministério da Saúde (Brasil), 2018b). Possui a maior barreira genética da classe, melhor perfil de tolerabilidade e menor gama de efeitos colaterais (Mastrolorenzo et al., 2007; Santos, Braga-Silva, 2013).

Ao longo dos primeiros anos de uso clínico dos IPs-HIV, estudos clínicos e epidemiológicos evidenciaram redução expressiva de candidose oral em pacientes com SIDA (Dios et al., 1999; Munro, Hube, 2002; Zingman, 1996), resultado inicialmente atribuído ao aumento de contagem de linfócitos T CD4, isto é, efeito da

melhora imunológica e não ação direta dos medicamentos. Posteriormente, estudos clínicos controlados (Cassone et al., 2002; Cauda et al., 1999) mostraram redução da recorrência de candidose oral não explicada pela contagem de linfócitos T CD4, realçando a possibilidade de efeito antifúngico direto dos IPs-HIV. Essa hipótese foi confirmada por alguns estudos *in vitro* que evidenciaram efeitos de diferentes IPs-HIV de primeira geração na inibição direta de Saps secretadas por *Candida* (Cauda et al., 1999; Gruber et al., 1999; Kortling et al., 1999; Monod et al., 1999).

Gruber et al. (1999) realizaram estudo *in vitro* para avaliar o efeito de Indinavir em diferentes concentrações em uma cepa de *C. albicans* CBS 5982 quanto a atividade e quantificação de Saps por meio de quantificação de proteólise, quantificação de antígeno Sap2 por FACscan, além de possível efeito de morte celular por citometria de fluxo, viabilidade celular por teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) e interferência na capacidade de alongação da hifa por microscopia direta. Foi encontrada atividade em inibição da Sap concentração-dependente e um efeito muito modesto de Indinavir em altas concentrações na viabilidade e capacidade de formação de hifas do fungo, sugerindo efeito fungistático da droga. Já Monod et al. (1999), em estudo *in vitro* avaliaram a atividade proteolítica de diferentes concentrações de Ritonavir e Saquinavir em ensaios com Saps 1 a 6 recombinantes provenientes de enzimas purificadas da levedura *Pichia pastoris* mostrando inibição potente na atividade de Saps 1 a 3 pelo Ritonavir e moderada por Saquinavir e Indinavir, e nenhuma ou muito fraca inibição das Saps 4 a 6. Além disso, avaliaram atividade de Ritonavir, Saquinavir e Indinavir na adesão a células epiteliais utilizando cepa *C. albicans* SC5314, observando inibição concentração-dependente mais evidente com Ritonavir, mas também com Saquinavir. Considerando que as Saps 1 a 3 são envolvidas na adesão mucosa, o estudo favoreceu a hipótese de causa-efeito para a melhora observada em pacientes em uso de IPs-HIV. O mesmo grupo conduziu um estudo mais complexo (Borg-von Zepelin et al., 1999) avaliando também Nelfinavir, em que o Ritonavir mais uma vez mostrou melhor performance na inibição das Saps 1 a 3, além de inibição na adesão de *C. albicans* em células epiteliais de maneira concentração-dependente.

Na sequência, outros estudos também evidenciaram alteração em outros fatores de virulência de *C. albicans* com a associação dos IPs-HIV, como na capacidade de filamentação (Braga-Silva et al., 2010; Gruber et al., 1999; Kortling et

al., 1999) e adesão em placa acrílica (Tsang, Hong, 2010). Concordando com isso, Cassone et al. (1999) desenvolveram um estudo *in vivo* mostrando resultados clínicos semelhantes ao efeito do antifúngico fluconazol em modelo murino de candidíase vaginal em ratas Wistar ooforectomizadas tratadas com IPs-HIV via intravaginal.

Braga-Silva et al. (2010) realizaram um amplo estudo avaliando diferentes ações antifúngicas de cinco IPs-HIV, incluindo os de segunda geração (Lopinavir, Nelfinavir, Saquinavir, Ritonavir, e Amprenavir), em diferentes concentrações sobre *C. albicans*. Os autores observaram que todas as drogas testadas causaram redução na atividade proteolítica da Sap2 de forma concentração-dependente, sendo Amprenavir a droga com melhor performance. Esta também mostrou ação direta no crescimento planctônico, em biofilmes, na produção de estearase, expressão de glico-conjugados de superfície ricos em manose e ácido siálico, com reduções estatisticamente significantes. No entanto, a droga Amprenavir e seus precursores não se encontram mais em uso na prática, não sendo factível nem interessante portanto o desenvolvimento de mais estudos com tais medicamentos.

Recentemente, Lohse et al. (2020) testaram os efeitos de diversos inibidores de protease, incluindo os IPs-HIV Nelfinavir, Ritonavir, Indinavir, Lopinavir, Saquinavir e ATV no biofilme de *C. albicans* SNY425 quanto a capacidade de inibição de formação de biofilme e ruptura de biofilme pré-formado com as drogas selecionadas isoladamente e em combinação com Fluconazol, Caspofungina e Anfotericina B. Dentre os IPs-HIV estudados Nelfinavir se mostrou eficaz na inibição da formação do biofilme quando utilizado isoladamente e em conjunto com os três antifúngicos. Lopinavir, Ritonavir e Saquinavir levaram a inibição da formação do biofilme quando utilizados em conjunto com Caspofungina e Ritonavir e Saquinavir em conjunto com Anfotericina. Já a capacidade de ruptura de biofilme foi demonstrada com todos os IPs-HIV testados quando utilizados em conjunto com Caspofungina e não com os demais antifúngicos. Tais achados reforçam as evidências de ação *in vitro* dos IPs-HIV nos biofilmes e levantam a hipótese de utilidade de terapia combinada com antifúngicos já consagrados para tratamento e prevenção de infecções por biofilmes de *Candida*.

IPs-HIV também foram estudados em outros fungos (Brilhante et al., 2020; Eldesouky et al., 2021; Palmeira et al., 2018). Brilhante et al. (2020) demonstraram atividade antibiofilme de DRV em cultura planctônica de *Cryptococcus sp* e antifúngica

em sinergismo com Anfotericina B. Palmeira et al. (2018) demonstraram atividade de Saquinavir, Nelfinavir, Ritonavir e Indinavir em bloquear a atividade proteolítica de células escleróticas em *Fonsecaea pedrosoi*, fungo filamentoso demácio que é o principal agente etiológico da cromoblastomicose.

Os estudos *in vitro* abordados acima com IPs-HIV são promissores e podem ser considerados como estudos para Reposicionamento. Reposicionamento de Medicamentos ou Fármacos é uma prática internacional e metódica para encontrar novas aplicações para drogas já existentes (em uso clínico ou pré-clínico) fora do seu escopo original. Tal estratégia tem como vantagens a economia de recursos e tempo de estudo, visto que lida com fármacos já em fase adiantada de desenvolvimento e com seu perfil de segurança estabelecido (Pushpakom et al., 2018). Exemplos históricos de reposicionamento de sucesso são o antirretroviral ITRN Zidovudina, desenvolvido inicialmente como quimioterápico e utilizado por décadas na TARV de pacientes com SIDA e Sildenafil, desenvolvido inicialmente como droga anti-hipertensiva e licenciado hoje para tratamento de disfunção erétil (Pushpakom et al., 2018; Wall, Lopez-Ribot, 2020). O aumento na incidência de doenças fúngicas invasivas (especialmente em pacientes imunodeprimidos), aliado ao aumento de resistência aos antifúngicos disponíveis, às dificuldades com toxicidade dos fármacos em uso, e ao alto custo no desenvolvimento de novas drogas têm estimulado estudos para reposicionamento nesta área (Eldesouky et al., 2021; Lohse et al., 2020; Sun et al., 2008; Villanueva-Lozano et al., 2018). Um exemplo de antifúngico reposicionado é 5-flucitosina, desenvolvida como antitumoral e hoje utilizada no tratamento de infecção por *Cryptococcus sp* (Pushpakom et al., 2018; Wall, Lopez-Ribot, 2020). Os inibidores da calcineurina Ciclosporina e Rapamicina vêm sendo estudadas como drogas antifúngicas sinérgicas com azóis (Bastidas et al., 2012; Cruz et al., 2001; Sun et al., 2008) e o antidepressivo Sertralina chegou a estudos de fase 3 como tratamento adjuvante para neurocriptococose mas sua superioridade não foi demonstrada (Villanueva-Lozano et al., 2018).

Para busca de candidatos a reposicionamento de drogas, em especial no campo dos antimicrobianos há duas abordagens bem estabelecidas: *in silico*/computacional e testes experimentais, e as evidências do uso clínico podem servir de âncora para ambas. A abordagem computacional envolve a utilização de “Bibliotecas de Compostos” criadas por laboratórios acadêmicos, que disponibilizam

dados relevantes de milhares de drogas e de patógenos, permitindo modelagem para avaliação de homologia de sítios de ligação e ancoragem e potenciais alvos de ação terapêutica, e, portanto, triagem de candidatos a estudos de reposicionamento (Kim et al., 2020; Pushpakom et al., 2018; Wall, Lopez-Ribot, 2020). Já a abordagem experimental utiliza métodos clássicos de avaliação de atividade antifúngica como os ensaios de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e de sinergismo entre duas ou mais drogas, atividade antibiofilme, ação na variabilidade fenotípica e experimento em animais (Kim et al., 2020; Wall, Lopez-Ribot, 2020).

Os ensaios *in vivo* são essenciais para caracterizar e melhor delinear os achados *in vitro*. Diferentes modelos de animais invertebrados como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori* e *Galleria mellonella* vem sendo utilizados como alternativas aos modelos mamíferos para estudo de infecção por *Candida* (Alarco et al., 2004; Cotter et al., 2000; Junqueira et al., 2012; Pukkila-Worley et al., 2009). Comportando-se como “*mini-hosts*” os invertebrados apresentam várias vantagens como o baixo custo operacional e possibilidade de estudos em larga escala. Soma-se ainda o fato de possuírem a imunidade inata conservada e ferramentas moleculares bem desenvolvidas, possibilitando atuação em plataformas de triagem de drogas e de aprofundamento no estudo de mecanismos de infecção (Chamilos et al., 2007; Chao et al., 2010; Mylonakis et al., 2007). Dentre os modelos, a larva da mariposa *G. mellonella*, vem sendo muito bem aceita na comunidade científica como modelo invertebrado de infecção para diferentes espécies de fungos (Junqueira et al., 2012; Trevijano-Contador, Zaragoza, 2019; Tsai et al., 2016). Esse modelo é capaz de fornecer informações sobre mecanismos de virulência, eficácia de antimicrobianos (Sheehan, Kavanagh, 2018; Trevijano-Contador, Zaragoza, 2019; Tsai et al., 2016), patogênese e características fenotípicas (Jorjão et al., 2018; Junqueira et al., 2012; Segal, Frenkel, 2018; Tsai et al., 2016).

Neste contexto, pode-se notar que vários IPs-HIV são capazes de interferir nos fatores de virulência de *C. albicans*, principalmente na produção enzimática das Saps, e mais recentemente foi evidenciada atividade antibiofilme. Porém, até o presente momento não existem estudos avaliando a atividade antifúngica nos IPs-HIV mais modernos que ainda hoje são utilizados na composição da TARV na prática clínica. Assim, considerando um possível uso clínico dos IPs-HIV como antifúngicos de ação sistêmica, em especial na população vivendo com HIV/SIDA e potencial universal,

conduzimos um estudo de Reposicionamento de Compostos com abordagem experimental *in vivo* e *in vitro*, proposto a partir de evidências da prática clínica e da literatura, para avaliar tais efeitos com DRV e ATV, os dois IPs-HIV oferecidos como arsenal terapêutico pelo Ministério da Saúde do Brasil.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos dos Inibidores da Protease do HIV Atazanavir (ATV) e Darunavir (DRV) em cepas clínicas de *Candida albicans*.

2.2 Objetivos Específicos

- a) determinar a concentração inibitória mínima de ATV e DRV em cepas clínicas de *C. albicans* isoladas de lesões de candidose orofaríngea da cavidade bucal de pacientes portadores de HIV;
- b) verificar a ação antibiofilme de ATV e DRV por meio da contagem do número de células viáveis (UFC/mL) de *C. albicans*;
- c) quantificar a biomassa total de biofilmes de *C. albicans* tratados com ATV ou DRV;
- d) avaliar os efeitos de ATV e DRV na expressão gênica dos genes alvos *BRC1* e *SAP2* em biofilmes de *C. albicans*;
- e) analisar a interferência dos fármacos na morfogênese de *C. albicans*;
- f) estudar o efeito protetor de ATV e DRV na sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas de micro-organismos

Foram utilizadas 2 cepas clínicas de *C. albicans*, sendo uma resistente (CA70) e uma sensível ao fluconazol (CA60), provenientes da cavidade bucal de pacientes portadores de HIV, isoladas de lesões de candidose orofaríngea (Junqueira et al., 2012). Estas cepas estão armazenadas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Bucal do ICT/UNESP de São José dos Campos em estoques congelados em freezer a -80°C (NUAIRE, MN, EUA). Para ativação desses micro-organismos, as cepas foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, MI, EUA) e incubadas a 37°C por 24 h.

3.2 Agentes antirretrovirais e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Sulfato de Atazanavir e Darunavir foram obtidos na forma de substância-referência da Empresa Sigma Aldrich (Sigma, St. Louis, MO, EUA). As substâncias foram diluídas em Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e mantidas congeladas a -20°C como solução estoque.

A determinação da CIM foi realizada pela metodologia de microdiluição em caldo de acordo com as normas NCCLS M27-A2 (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002). As cepas de *C. albicans* foram semeadas em caldo Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, MI, EUA) e incubadas a 37°C por 16 h. O crescimento microbiano no caldo foi centrifugado a 1300 xg durante 10 min e lavado duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS). Uma suspensão padronizada da cepa foi preparada em PBS, na concentração de 10⁶ células/mL (escala de McFarland 0.5) com auxílio de um hemocítômetro. A partir dessa suspensão-padrão, foi realizada diluição 1:50 seguida de diluição 1:20 em meio líquido RPMI 1640 (L-glutamina, sem

bicarbonato de sódio, tamponado com MOPS 0.165, pH 7.0), resultando em uma suspensão de trabalho contendo 10^3 células/mL. Primeiramente, foram colocados 50 µL de RPMI1640 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) em todos os poços da placa de 96 poços. Para determinação da CIM do Fluconazol e dos fármacos antirretrovirais foram testadas concentrações de 1 µg/mL a 1024 µg/mL que foram diluídos em meio RPMI 1640. A seguir, foram acrescentados 50 µL da suspensão de *C. albicans* padronizada em cada diluição dos antifúngicos. No grupo controle foi acrescentado apenas 50 µL da suspensão padronizada com RPMI1640. A cepa de *C. albicans* ATCC 18804 foi adicionada neste ensaio como controle de qualidade do nosso experimento. Houve ainda um ensaio com grupos controle tratados apenas com PBS e DMSO em concentrações seriadas similares às encontradas nos grupos com fármacos. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Após incubação por 48 h a 35°C, as placas foram analisadas usando um leitor de microplaca (Sdorf, São Paulo, SP, Brasil) a 595 nm e o resultado expresso em valor de absorbância. A CIM foi considerada a menor concentração dos antifúngicos testados capaz de inibir o crescimento microbiano em caldo.

3.3 Ação dos fármacos antirretrovirais na formação de biofilme de *C. albicans*

Para esses ensaios foi utilizada a metodologia descrita por Thein et al. (2006) com algumas modificações. A formação do biofilme foi realizada no fundo da placa de microtitulação de 96 poços de fundo chato (Costar Corning, Nova Iorque, NY, EUA). Em cada poço, foi inoculado 100 µL de uma suspensão padronizada de *C. albicans* (10^7 células/mL) em meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB) (Sigma, St Louis, MO, EUA) acrescido de 100 mM de glicose. A placa foi incubada em agitação a 75 rpm (Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 37°C por 90 min para promover a adesão inicial dos micro-organismos. Após essa fase de adesão, a suspensão de células foi aspirada e cada poço lavado duas vezes com PBS para remover as células não aderidas. Em cada poço da placa de 96 poços, foi inoculado 200 µL de meio de cultura YNB acrescido de ATV ou DRV na concentração final de 1536 µg/mL (três vezes a CIM que foi determinada no ensaio 3.2). Nos grupos controle foram inoculados somente

PBS e Fluconazol na concentração final 3 µg/mL no grupo CA60 e 192 µg/mL no grupo CA70 (três vezes a CIM para Fluconazol determinada no ensaio 3.2 em cada grupo). O caldo foi trocado a cada 24 h. As placas foram tampadas e incubadas a 37°C em estufa de incubação com agitação de 75 rpm por 48 h.

3.3.1 Análise temporal do crescimento de *C. albicans* pela contagem do número de células viáveis

Transcorrido o tempo de formação do biofilme descrito no item 3.3, cada poço foi lavado 2 vezes para remoção das células não aderidas. Posteriormente foram aliquoteados 100 µL de PBS em cada poço e o conteúdo do biofilme homogeneizado através do ultrassônico (Sonopuls HD 2200, Bandelin Electronic, Berlim, BE, Alemanha) com potência de 50 W por 30 s para romper os agregados microbianos. A partir da solução obtida, foram realizadas diluições decimais da suspensão do biofilme, das quais alíquotas de 100 µL foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud (Difco, Detroit, MI, EUA). As placas de ágar foram incubadas a 37°C em estufa por 48 h. Após este período, as colônias foram contadas para o cálculo de UFC/mL.

3.3.2 Análise temporal do biofilme de *C. albicans* por quantificação da biomassa total

A quantificação da biomassa dos biofilmes foi realizada pelo método da absorbância do Cristal Violeta seguindo a metodologia descrita no trabalho de Barbosa et al. (Barbosa et al., 2016). Transcorrido os tempos de formação de biofilme como descrito no item 3.3, 200 µL de metanol a 100% (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) foram adicionados em cada poço para a fixação do biofilme. Passados 15 min, o metanol foi removido e a placa mantida em temperatura ambiente overnight (aproximadamente 16 h). Após o período de incubação, 100 µL de cristal violeta (1%

v/v) foi colocado nos poços e mantido durante 20 min. Em seguida, os poços foram lavados 2 vezes com 200 µL de solução fisiológica (NaCl 0,85%) e ácido peracético (33% v/v) para liberação do excesso de corante. Então, 100 µL do sobrenadante do processo de descoloração foram transferidos para placas de 96 poços. As placas foram colocadas em leitor de microplacas com comprimento de onda de 570 nm para 15 medidas da absorbância.

3.3.3 Avaliação da expressão dos genes *BRC1* e *SAP2* nos biofilmes de *C. albicans*

Esse experimento foi realizado de acordo com Barros et al. (2016).

Considerando maior interesse em evidenciar novas estratégias terapêuticas em cepas de *C. albicans* resistente ao Fluconazol selecionamos a cepa *C. albicans* CA70 para avaliação de expressão de genes relacionados a fatores de virulência quando submetidos a tratamento com os IPs-HIV ATV e DRV. Amostras dos biofilmes de *C. albicans* CA70 formados conforme item 3.3 foram submetidos à avaliação da expressão dos genes alvos *BRC1* e *SAP2* em relação ao gene de referência *RIP1* (Ubiquinol-cytochrome-c reductase). A amostra calibradora do ensaio foi o grupo formado por *C. albicans* sem tratamento (controle). Todos os primers utilizados foram específicos para *C. albicans* e não houve amplificação em nenhum outro tipo de micro-organismo.

3.3.3.1 Extração de RNA

Após o tratamento com os antirretrovirais foi realizada a extração de RNA utilizando-se o Kit Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), conforme protocolo recomendado pelo fabricante. O RNA extraído foi quantificado usando micro-espectrofotômetro Nanodrop 2000c UV- Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante, e os tubos

armazenados no freezer a -80°C.

3.3.3.2 Transcrição Reversa (RT-PCR)

Para cada reação de síntese da primeira fita de cDNA, foi utilizado 400 ng de RNA, previamente tratado com RQ1 RNase-Free DNase (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), utilizando o Kit GoScript™ Reverse Transcription Mix, Random Primers (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. A cada reação foram, então, adicionados: 10 µL do RNA previamente tratado; 4 µL de mix GoScript reaction buffer random; 2 µL de Enzima mix e água livre de RNase suficiente para um volume final de 20 µL de reação. As reações foram incubadas em termociclador (Mastercycler-Eppendorf, Hamburgo, HH, Alemanha) por 5 minutos a 25°C, seguidos por 60 min a 42°C e 15 min a 70°C.

3.3.3.3 Reação em Cadeia Polimerase

Para as reações de qPCR foi utilizado o kit GoTaq® qPCR Master Mix kit (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), conforme as recomendações do fabricante. As reações foram realizadas, em triplicata, no termociclador Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA, EUA), constituindo-se de 10 µL de GoTaq® qPCR Master Mix, 1 µL de ROX (corante de referência), 10 µM de primer forward, 10 µM de primer reverse, 2 µL cDNA alvo, sendo completado com água livre de RNase para um volume final de 20 µL. Os parâmetros de ciclagem para as reações de amplificação foram; 95°C por 2 min; seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 60 s, sendo os dados coletados na última etapa. O nível de expressão gênica foi calculado aplicando-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

3.4 Ensaio de filamentação

Para a realização desse experimento, após um crescimento em caldo Sabouraud de 18 h, cada cepa de *C. albicans* foi lavada e centrifugada para o preparo de suspensões padronizadas contendo 10^7 células/mL com o auxílio de um hemocítmetro. Em uma placa de cultura de células de 24 poços (Costar Corning, Nova Iorque, NY, EUA) foram adicionados 2 mL de água destilada suplementada com 10% de soro fetal bovino para estimular a filamentação e 100 μ L da suspensão padronizada de *C. albicans*. Nos grupos tratados com os fármacos antirretrovirais, foram testados ATV e DRV na concentração 1536 μ g/mL (três vezes a CIM determinada no ensaio 3.2). As placas contendo os inóculos foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica na presença de 5% de CO₂. Após 24 h, 50 μ L do inóculo contido em cada poço da placa de cultura de células de 24 poços foi disperso sobre lâminas de vidro com os campos previamente demarcados no verso da lâmina. O material sobre a lâmina foi recoberto por lamínula e as lâminas de microscopia observadas em microscópio óptico com aumento de 40x. As imagens foram analisadas sob o aspecto morfológico e quantitativo. Para quantificação das hifas presentes, foram analisados 10 campos microscópios em cada lâmina, sendo padronizado o ponto médio de cada campo para a análise. Em cada campo microscópio foi atribuído um escore, de acordo com o número de hifas presente, atribuindo-se os seguintes escores: 0, ausência de hifas; 1, de 1 a 15; 2, de 16 a 30; 3, de 30 a 45 e 4 para mais de 45 hifas por campo.

3.5 Curva de sobrevivência de *G. mellonella*

Para o estudo neste modelo invertebrado foram utilizadas as metodologias descritas por Mylonakis et al.(2005) e Vilela et al. (2015). Foram utilizadas larvas de *G. mellonella* em estágio final da fase larval com peso corporal de aproximadamente 330 ± 25 mg. As larvas foram criadas e mantidas no Laboratório de Microbiologia e

Imunologia Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia – ICT/UNESP conforme descrito por Jorjão et al. (2018).

3.5.1 Análise da toxicidade ATV e DRV em *G. mellonella*

Antes do estudo da avaliação do efeito protetor de ATV e DRV em *G. mellonella* infectada com *C. albicans*, foi realizada uma análise da toxicidade de *G. mellonella* aos fármacos antirretrovirais para determinação da concentração profilática de ATV e DRV nesses insetos. Para isso, foram inoculadas em *G. mellonella* concentrações de ATV e DRV de 10 mg/kg e 20 mg/kg. Para cada concentração inoculada, foi utilizado um grupo de 10 larvas. Um inóculo de 10 µL de cada concentração foi injetado em *G. mellonella* para determinação da curva de sobrevivência.

3.5.2 Preparo da suspensão de *C. albicans*

C. albicans foi cultivada a 37°C por 18 h em caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD- Difco, Detroit, MI, EUA). A seguir, as células foram centrifugadas a 2000 xg por 10 min, sendo o sobrenadante descartado. O depósito foi ressuscitado em PBS e homogeneizado em agitador de tubos por 30 s. Esta lavagem das células foi repetida por mais duas vezes. As densidades celulares de *C. albicans* foram ajustadas em 10⁸ células/mL por meio de hemocítômetro.

3.5.3 Injeção dos fármacos antirretrovirais em *G. mellonella*

Um inóculo de 10 µL dos fármacos ATV e DRV na concentração de 20 mg/kg foi injetado com auxílio de seringas de precisão (Hamilton Inc., Manitowoc, WI, EUA)

na hemolinfa de cada larva através da última *proleg* esquerda. Após duas horas, 10 µL da suspensão padronizada de *C. albicans* foram inoculados na última *proleg* direita. Para cada cepa de *Candida* foi utilizada uma seringa Hamilton. Foram utilizadas 10 larvas em cada grupo de estudo, além de um grupo controle com DMSO na mesma concentração utilizada na diluição dos fármacos estudados e um grupo inoculado apenas com PBS para acompanhar o estado de saúde das larvas de *G. mellonella* durante todo o experimento.

3.5.4 Determinação da curva de sobrevivência de *G. mellonella*

Após a inoculação, as larvas foram armazenadas em placas de Petri e incubadas a 37°C. O número de larvas de *G. mellonella* mortas foi anotado diariamente durante sete dias. As larvas foram consideradas mortas quando não apresentaram nenhum movimento ao toque. A curva de morte e estimativa das diferenças na sobrevivência foi determinada pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox).

3.6 Análise estatística

Os ensaios *in vitro* com os biofilmes de *C. albicans* (Contagem de UFC/mL; Análise da biomassa total), a comparação da expressão gênica dos genes de virulência de *C. albicans* foram analisados pelo teste *t* de Student e ANOVA. Os escores obtidos no ensaio de filamentação *in vitro* foram comparados utilizando os testes Kruskal-Wallis e Dunn. As curvas de sobrevivência de *G. mellonella* foram analisadas pelo teste de Log-Rank. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa GraphPad Prism statistical software (GraphPad Software, Inc., California, CA, EUA) e um *p* valor $\leq 0,05$ considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Ensaios *in vitro*

4.1.1 Teste de concentração inibitória mínima

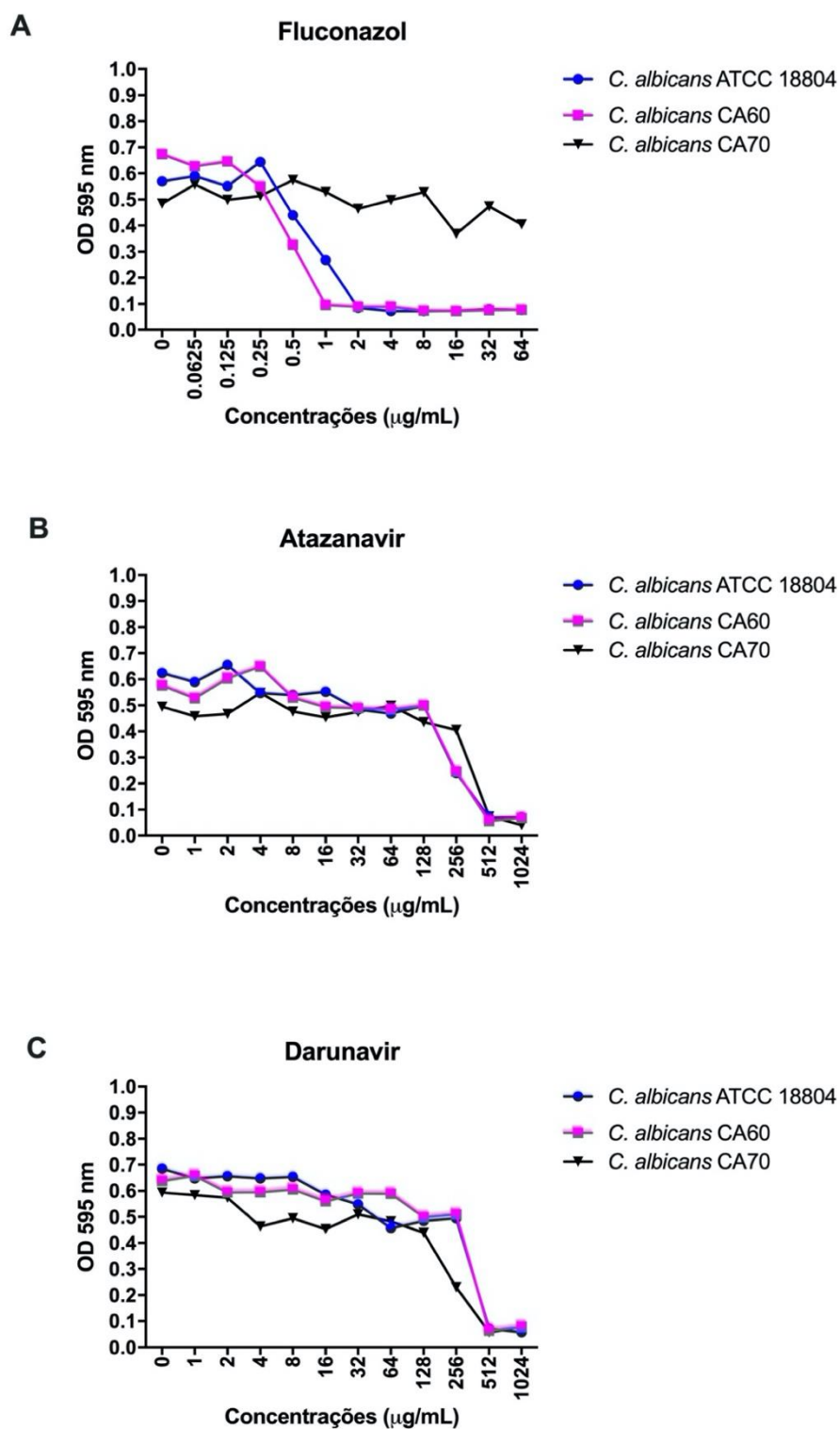
As cepas de *C. albicans* apresentaram perfil de susceptibilidade variando de 1 a ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ para fluconazol. Para ambos os fármacos antirretrovirais o valor de CIM foi de 512 $\mu\text{g/mL}$ para todas as cepas testadas (Quadro 1). Os resultados estão demonstrados na Figura 1.

Quadro 1 - Determinação da CIM para as cepas de *C. albicans*

Cepa	Fluconazol ($\mu\text{g/mL}$)	Atazanavir ($\mu\text{g/mL}$)	Darunavir ($\mu\text{g/mL}$)
ATCC 18804	2	512	512
CA60	1	512	512
CA70	>64	512	512

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 1 - Valor de CIM foi determinado para as diferentes cepas de *C. albicans*



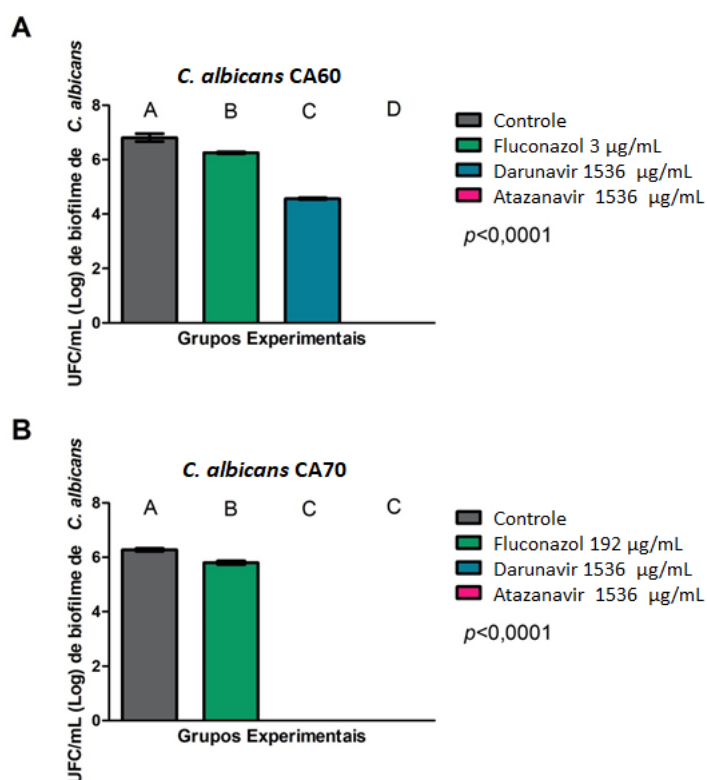
Legenda: a) Fluconazol; b) Atazanavir; c) Darunavir.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.2 Avaliação dos efeitos de ATV e DRV na contagem de UFC/mL em biofilmes de *C. albicans*

ATV e DRV foram testados na formação de biofilmes de *C. albicans*. ATV e DRV reduziram significativamente a UFC ($p < 0,0001$) dos biofilmes, como mostrado na Figura 2. As maiores reduções encontradas foram para a cepa CA70 (6,27 Log de redução), no qual os tratamentos foram capazes de eliminar a viabilidade de todo o biofilme formado. A cepa CA60 apresentou redução média de 2,24 Log com uso de DRV, e com uso de ATV houve inibição total de formação de biofilme.

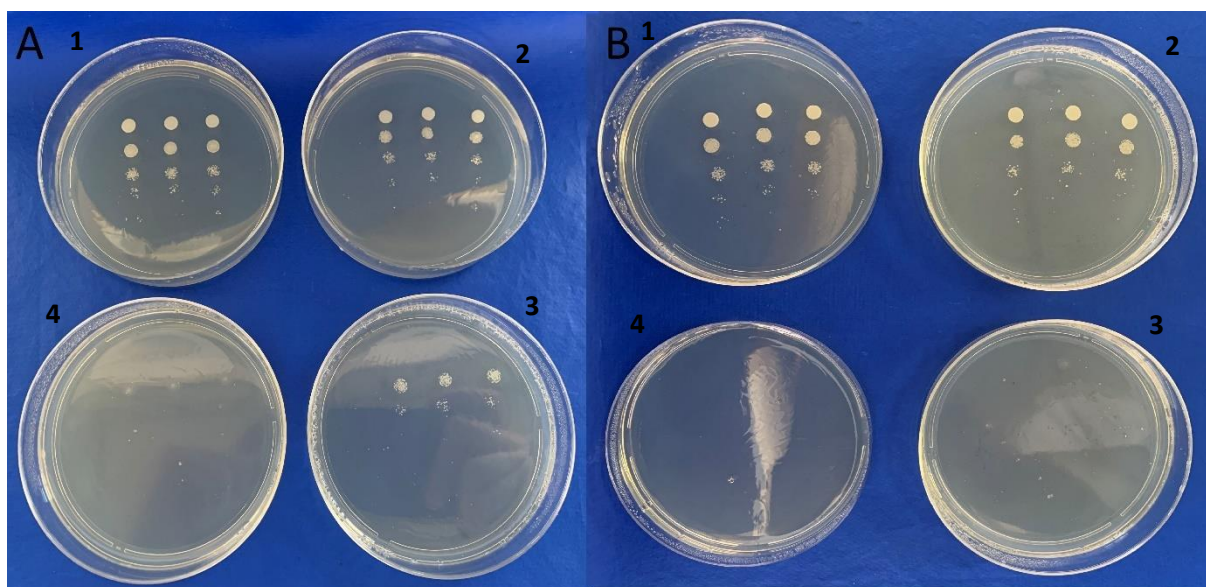
Figura 2 - Médias e desvio padrão da contagem de UFC/mL de biofilme para as diferentes cepas de *C. albicans* tratadas com ATV, DRV ou Fluconazol



Legenda: a) CA60; b) CA70. O nível de significância é de 0,05.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Em relação ao tratamento com o Fluconazol, também foi observada redução estatisticamente significativa comparado ao grupo controle. A maior redução foi observada com a cepa CA60 (0,56 Log). O crescimento das colônias de *C. albicans* nos diferentes grupos de estudo estão demonstrados na Figura 3.

Figura 3 - Crescimento das colônias de *C. albicans* em ágar Sabouraud Dextrose dos ensaios de contagem de UFC/mL em biofilme nos diferentes grupos testados

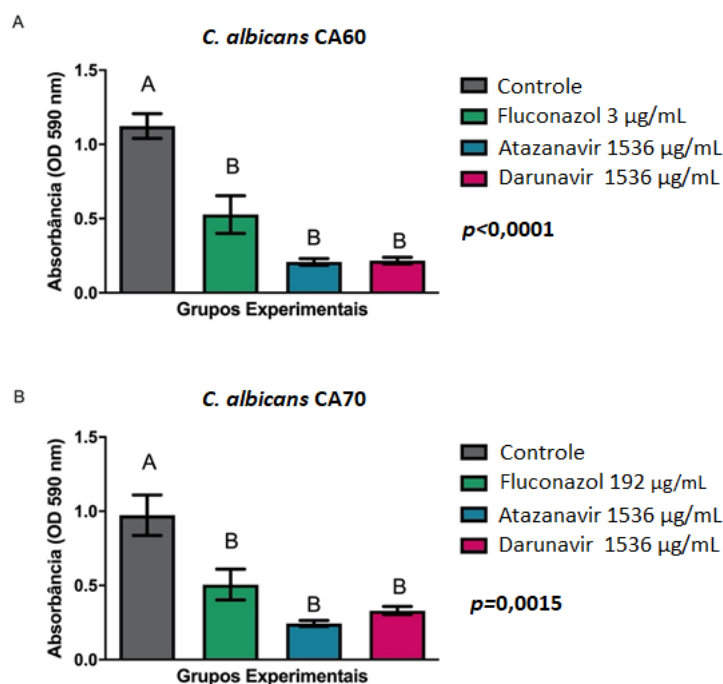


Legenda: a) *C. albicans* CA60 (1: grupo controle, 2: grupo fluconazol, 3: grupo DRV e 4: grupo ATV); b) *C. albicans* CA70 (1: grupo controle, 2: grupo fluconazol, 3: grupo DRV e 4: grupo ATV).
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.3 Avaliação dos efeitos de ATV e DRV na biomassa dos biofilmes de *C. albicans*

A atividade antifúngica dos fármacos antirretrovirais também foi verificada pela mensuração da biomassa total dos biofilmes de *C. albicans*. ATV e DRV foram capazes de reduzir significativamente ($p < 0,05$) a biomassa dos biofilmes das cepas de *C. albicans* testadas. As reduções encontradas foram: ATV - 82%; DRV - 81%; Fluconazol - 53% para CA60 e ATV - 82%; DRV - 67%; Fluconazol - 48% para CA70 (Figura 4).

Figura 4 - Médias e desvio padrão da biomassa dos biofilmes de *C. albicans*



Legenda: a) CA60; b) CA70. O nível de significância é de 0,05.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.4 Efeitos de ATV e DRV na expressão dos genes *BRC1* e *SAP2* nos biofilmes de *C. albicans*

Com a finalidade de elucidar os efeitos dos antirretrovirais sobre a formação do biofilme de *C. albicans* CA70, foi utilizada a qPCR para avaliar o nível de expressão de genes relacionados a formação de biofilme e secreção de protease. Para isso, os biofilmes tratados com ATV e DRV foram submetidos à extração de RNA total e quantificados na concentração de ng/µL. A quantidade obtida e a pureza das amostras, a relação 260/280 nm foram maiores que 1,80, sendo assim, adequadas para o processo de transcrição reversa como indicado no Quadro 2.

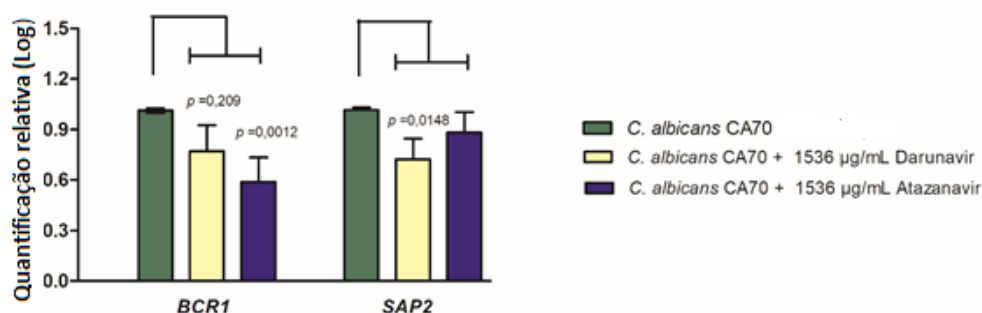
Quadro 2 – Concentração e grau de pureza de RNA após a extração dos biofilmes

Amostra	Concentração (ng/ μ L)	260/280 nm	260/230 nm
CA70 Controle	1610,5	2,01	1,77
CA70 ATV	38,9	1,8	0,48
CA70 DRV	107,3	1,81	0,34

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os genes *BCR1* e *SAP2* relacionados a virulência de *C. albicans* foram quantificados em relação ao gene de referência *RIP1*. O grupo tratado com 1536 μ g/mL de ATV diminuiu significativamente a expressão de *BRC1* em 1,72 vezes ($p=0,0012$) em comparação ao grupo controle de *C. albicans*, enquanto o gene *SAP2* também foi regulado negativamente (1,13 vezes) porém sem diferença significativa. Já o tratamento com 1536 μ g/mL de DRV diminuiu significativamente somente a expressão de *SAP2* em (1,4 *fold decrease*, $p=0,0148$) e apesar de *BRC1* ter apresentado um *fold decrease* de 1,3 ($p=0,209$) não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (Figura 5).

Figura 5 - Média e desvio padrão da quantificação relativa (log) da expressão dos genes *BCR1* e *SAP2* envolvidos na virulência em biofilmes tratados com Darunavir e Atazanavir por meio do PCR quantitativo em tempo real, em relação ao controle (*C. albicans*)



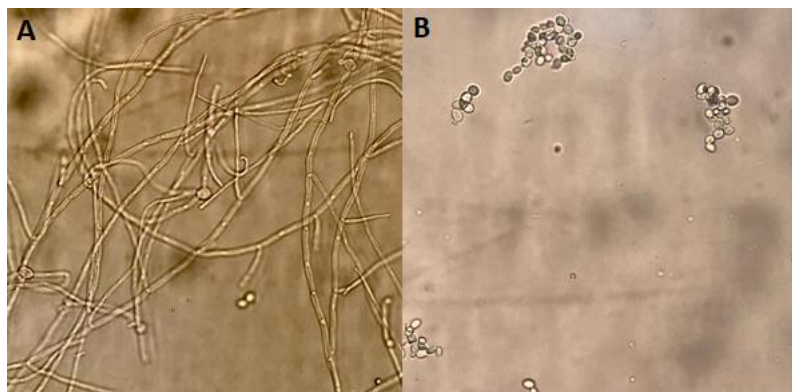
Legenda: controle *C. albicans* CA70; *C. albicans* CA70 tratado com 1536 μ g/mL de Darunavir; *C. albicans* CA70 tratado com 1536 μ g/mL de Atazanavir. Cada coluna apresenta a média de três experimentos independentes. Valores são expressos pela média e desvio padrão. Teste *t-Student* foi utilizado na quantificação relativa da expressão gênica. (* $p \leq 0.05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.5 Efeitos de ATV e DRV sobre a filamentação *in vitro* de *C. albicans*

A presença de hifas de *C. albicans* nos diferentes grupos experimentais foi analisada quanto aos aspectos morfológicos e quantitativos. Quanto à morfologia, analisando as imagens do grupo controle *C. albicans* podemos verificar uma grande quantidade de hifas em detrimento a presença de leveduras (Figura 6). O ensaio mostrou redução significativa da filamentação em ambas as cepas CA60 ($p=0,0183$) e CA70 ($p=0,0183$) com as drogas estudadas em relação ao grupo controle (Figura 7). DRV foi capaz de reduzir significativamente a filamentação das cepas. Já ATV foi capaz de inibir totalmente a filamentação em ambas as cepas. Vale ressaltar que não foram visualizadas nem mesmo formas leveduriformes nas lâminas testadas com ATV.

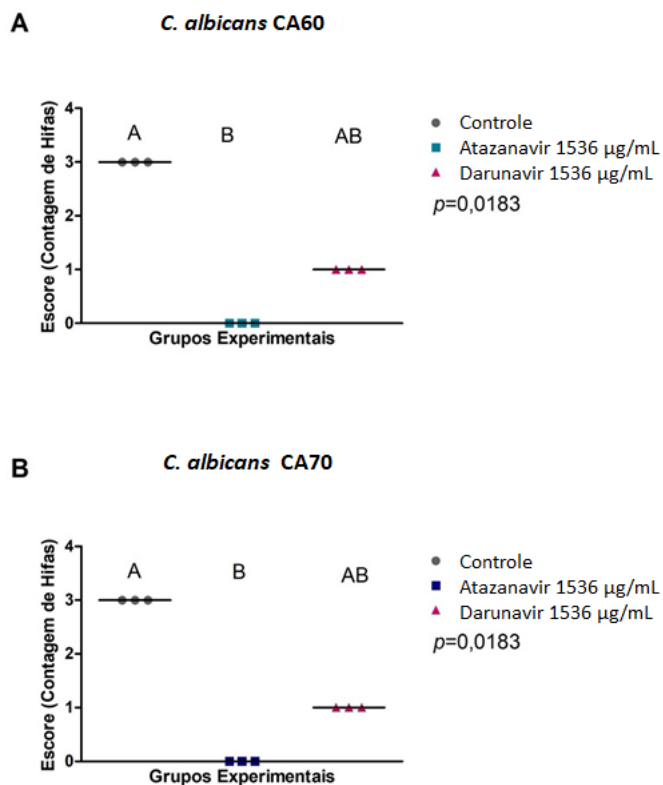
Figura 6 – Filamentação encontrada no grupo *C. albicans* CA60



Legenda: a) filamentação abundante encontrada no grupo controle de *C. albicans* CA60; b) no grupo tratado com Darunavir 1536 $\mu\text{g/mL}$ a filamentação foi inibida, encontramos predominância de estruturas leveduriformes; no grupo tratado com Atazanavir nenhuma estrutura fúngica foi observada (dados não mostrados). Aumento original: 40x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 7 - Escores obtidos pela determinação do número de hifas no ensaio de filamentação *in vitro* de *C. albicans* quando tratado com ATV ou DRV para as cepas CA60 e CA70



Legenda: a) CA60; b) CA70. Teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

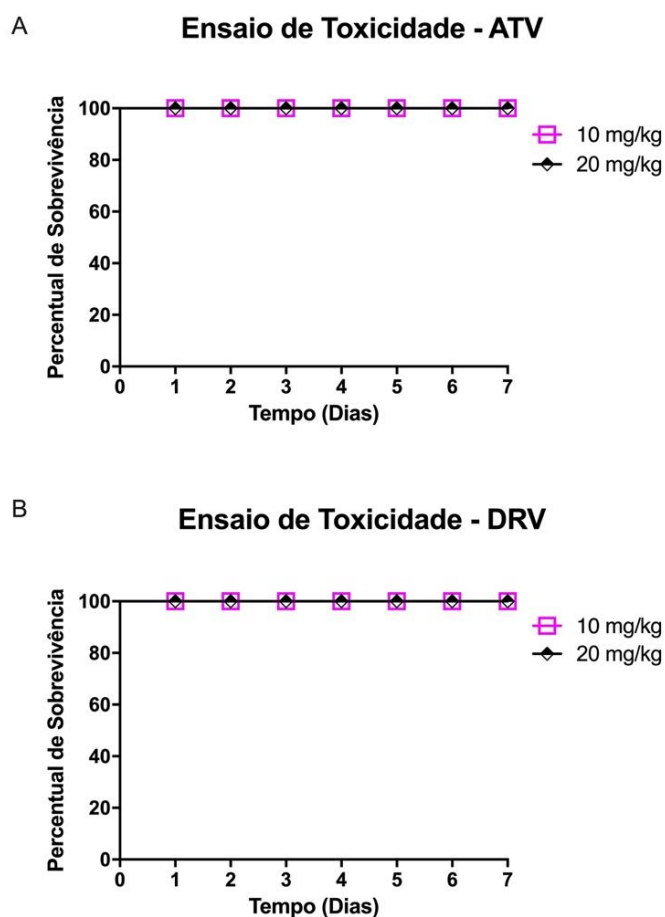
4.2 Ensaios *in vivo*

Baseado nos resultados *in vitro*, expandimos este estudo para o modelo de *G. mellonella* a fim de verificar a habilidade de ATV e DRV em prolongar a vida das larvas infectadas por *C. albicans*.

4.2.1 Toxicidade de ATV e DRV em *G. mellonella*

Inicialmente, foi realizado um ensaio de toxicidade em *G. mellonella*, no qual duas concentrações de ATV e DRV foram administradas e seus efeitos avaliados em um período de sete dias, observando-se que nenhuma das concentrações foi capaz de matar as larvas (Figura 8). Portanto, ATV e DRV não apresentaram toxicidade para *G. mellonella* nas concentrações testadas. A partir desses resultados, a concentração de 20 mg/kg foi escolhida para o uso associado com a infecção por *C. albicans*.

Figura 8 – Suscetibilidade de *G. mellonella* à ATV e DRV



Legenda: a) ensaio de toxicidade com ATV; b) ensaio de toxicidade com DRV. Concentrações seriadas de ATV e DRV foram injetadas nas larvas para observar a longevidade dos animais.

Fonte: Elaborada pelo autor.

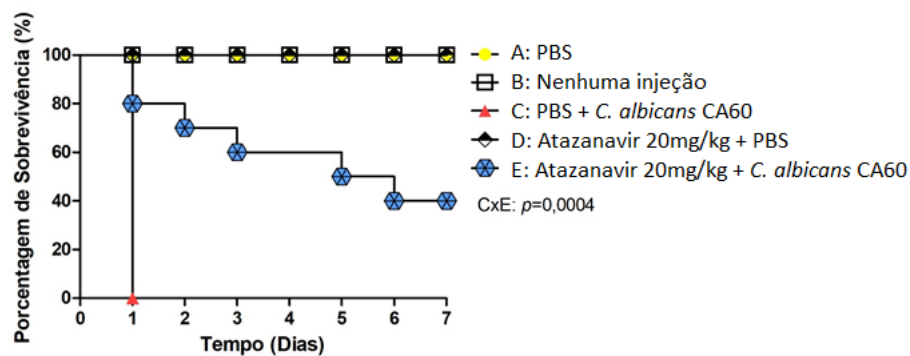
4.2.2 Efeitos de ATV e DRV na candidose experimental em *G. mellonella*

Para investigar os efeitos antifúngicos de ATV e DRV em *G. mellonella*, testamos sua eficácia na profilaxia em larvas infectadas por *C. albicans*. ATV e DRV foram injetados nas larvas duas horas antes da infecção fúngica na concentração de 20 mg/kg. Nos grupos controles, a infecção por *C. albicans* sem ATV ou DRV causou morte em 100% das larvas após 24 h. Quando as larvas receberam o tratamento profilático, a taxa de sobrevivência das larvas infectadas foi significativamente prolongada ($p < 0,05$) comparada ao grupo controle de *C. albicans*.

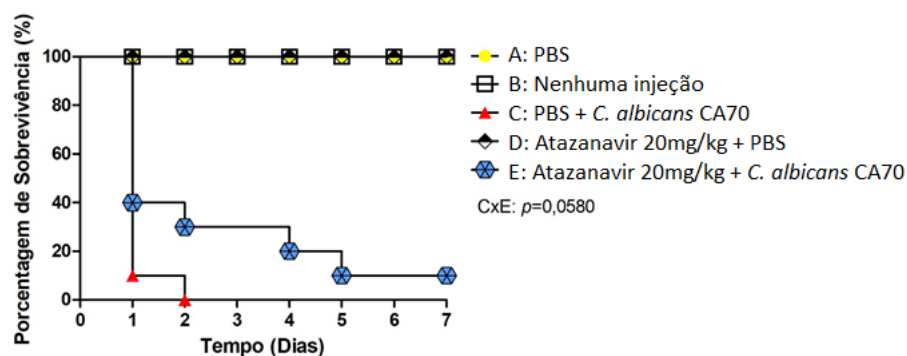
O uso profilático de ATV em *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* prolongou em até 40% a sobrevivência das larvas ($p = 0,0004$) para CA 60 e em 10% para CA70 ($p = 0,0580$) quando comparados ao grupo controle (Figura 9). Já para DRV, seu uso profilático também prolongou em até 40% a sobrevivência das larvas ($p = 0,0043$) para CA60 e em 20% para CA70 ($p = 0,0031$) conforme Figura 10.

Figura 9 – Tratamento profilático com ATV prolonga a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* variando a taxa de sobrevivência de acordo com a cepa estudada

A



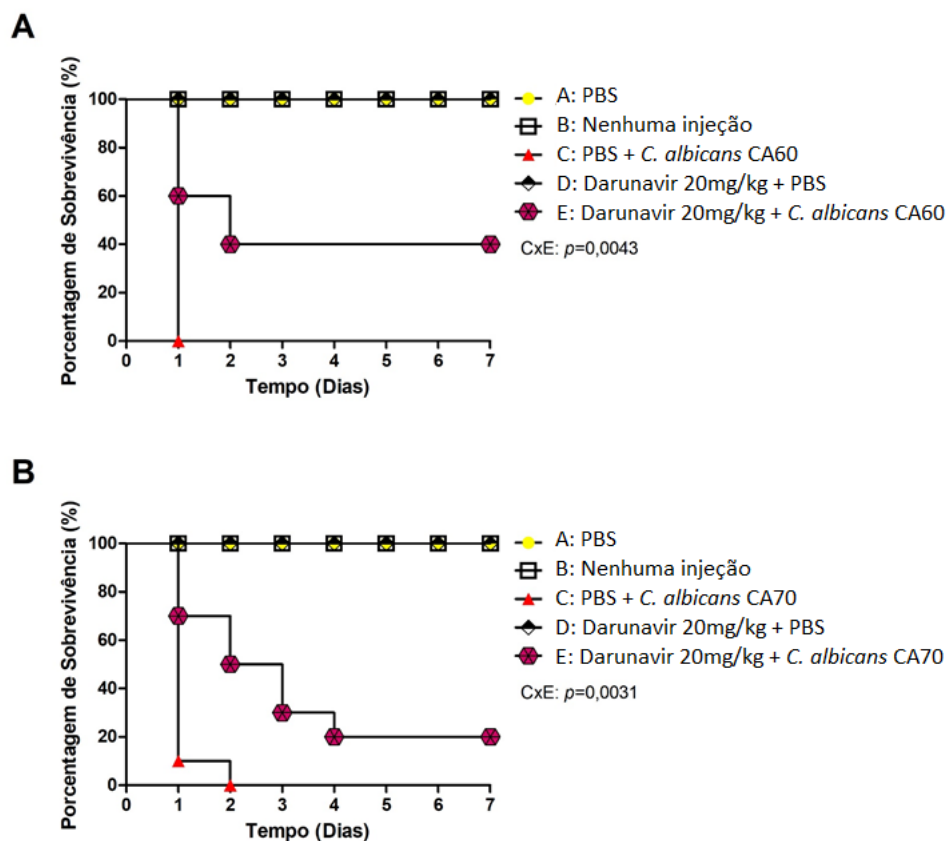
B



Legenda: a) grupo infectado com cepa CA60; b) grupo infectado com cepa CA70. Teste de Log-Rank, $p \leq 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10 – Tratamento profilático com DRV prolonga a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* variando a taxa de sobrevivência de acordo com a cepa estudada



Legenda: a) grupo infectado com cepa CA60; b) grupo infectado com cepa CA70. Teste de Log-Rank, $p \leq 0,05$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Os IPs-HIV têm ganhado atenção especial devido a sua atividade antimicrobiana em diferentes espécies fúngicas (Brilhante et al., 2020; Eldesouky et al., 2021; Lohse et al., 2020; Palmeira et al., 2018). Neste estudo foi observado que ATV e DRV possuem atividade antifúngica contra *C. albicans*, podendo ser uma estratégia promissora no tratamento das infecções por *Candida*. Nos resultados obtidos nesse estudo os IPs-HIV alteraram o padrão de filamentação, formação de biofilme e expressão de genes de virulência de *C. albicans*.

Primeiramente este estudo evidenciou atividade antifúngica na CIM dos IPs-HIV DRV a ATV a todas as cepas de *C. albicans* testadas (512 µg/mL). Resultados semelhantes foram encontrados para as espécies de leveduras *C. neoformans* e *C. gattii* utilizando DRV para o qual valor de CIM variou entre 256 e 512 µg/mL (Brilhante et al., 2020). Eldesouky et al. (2021) também avaliaram a atividade antifúngica de um IP-HIV, Lopinavir, em *C. auris* e obtiveram um valor de CIM maior que 128 µg/mL.

Os biofilmes de *Candida* podem se tornar mais resistentes aos antifúngicos convencionais (Barros et al., 2020; Cavalheiro, Teixeira, 2018; Kean et al., 2018). Por exemplo, após 4 horas de formação de biofilme foi verificado um aumento de 16 vezes o valor de CIM para Miconazol e 4 vezes o valor de CIM para Anfotericina B quando comparado com o tempo zero de formação de biofilme (Kean et al., 2018). Isso se deve a fatores intrínsecos da estrutura do biofilme, como a dificuldade de difusão das drogas na matriz extracelular polissacarídica, associado a alta atividade metabólica no início do desenvolvimento do biofilme. Além disso a expressão gênica própria do biofilme, como de genes de bombas de efluxo e outros que interferem na ação de antifúngicos sistêmicos podem ser cruciais na resposta às drogas (Donlan, 2001; Sherry et al., 2017). Células persistentes (“*persisters*”) são células dormentes que não se multiplicam e justamente por isso se comportam como tolerantes a muitas drogas antifúngicas e já foram descritas em biofilmes de *C. albicans* e apontadas como um dos fatores contribuintes para a dificuldade em eliminação dos biofilmes (Cavalheiro, Teixeira, 2018; Finkel, Mitchell, 2011). Tal perfil de resistência impõe dificuldades no tratamento de infecções clínicas relacionadas a biofilmes, fazendo-se necessário aumento de doses de antifúngicos, o que está associado a toxicidade, e mesmo em

altas doses muitas drogas atualmente disponíveis ainda são ineficazes, fazendo-se necessária associação de fármacos e evidenciando as limitações do arsenal terapêutico hoje disponível (Donlan, 2001). Tendo em vista a escassez de novas drogas em desenvolvimento, o reposicionamento de fármacos emerge como uma ferramenta interessante e promissora para trazer opções de tratamento contra biofilmes (Pushpakom et al., 2018; Wall, Lopez-Ribot, 2020).

Demonstramos também os efeitos antibiofilme dos IPs-HIV estudados numa concentração de 1536 µg/mL utilizando as metodologias de contagem de UFC e avaliação da biomassa. ATV e DRV foram capazes de reduzir os biofilmes em até 6,81 Log de UFC e em até 82% da biomassa dos biofilmes de *Candida albicans*, concordando com outros estudos na literatura. Lohse et al. (2020) avaliaram diferentes inibidores de protease escolhidos a partir de bibliotecas de compostos, dentre eles os IPs-HIV DRV e ATV, quanto a capacidade de inibir formação de biofilme e capacidade de ruptura de biofilme formado de *C. albicans* utilizando a concentração de 40 µM, e apesar dos grupos tratados com DRV e ATV terem promovido redução na densidade óptica em relação aos controles, estas diferenças não foram significantes nos dois testes estatísticos avaliados. O IP-HIV Nelfinavir, no entanto, foi capaz de inibir a formação de biofilme (mas não causar ruptura), sendo a Concentração Inibitória de Biofilme (BIC) determinada em 50 µM. Braga-Silva et al. (2010) demonstraram efeito antibiofilme do IP-HIV Amprenavir em biofilmes de *C. albicans* nas concentrações 100 µM e 200 µM e encontraram redução de 25% e 50% respectivamente. Brilhante et al. (2020) avaliaram os efeitos de DRV em diferentes concentrações em biofilmes de *Cryptococcus* e encontraram redução na atividade metabólica por ensaio de XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) e na biomassa dos biofilmes formados na presença de DRV em concentrações crescentes a partir de 32 µg/mL e também em biofilmes maduros em concentrações crescentes a partir de 256 µg/mL. Até o presente momento este é o primeiro estudo avaliando o uso de DRV em *C. albicans*, e de ATV em monoterapia.

Outro importante fator de virulência de *C. albicans* é a capacidade de filamentação, que representa um alvo atraente para novos tratamentos e no desenvolvimento de abordagens terapêuticas contra a candidíase. As hifas e pseudo-hifas deste fungo são consideradas formas invasivas, isto é, penetram no tecido do hospedeiro causando lesão tecidual e também são responsáveis pela colonização de

órgãos intracavitários (Sudbery et al., 2004). Este estudo avaliou a capacidade de filamentação de cepas de *C. albicans* suplementadas com sangue fetal bovino expostas a DRV e ATV em concentrações de 1536 µg/mL demonstrando clara inibição no processo de filamentação das cepas avaliadas. Tal efeito já havia sido demonstrado com outros fármacos da mesma família. Gruber et al. (1999) estudaram os efeitos de Indinavir, um IP-HIV de primeira geração, na elongação das hifas de *C. albicans* por microscopia óptica, utilizando doses crescentes da droga (0,05 mg/mL, 0,5 mg/mL e 5 mg/mL), observando resultados significantes somente na maior concentração avaliada (5 mg/mL). Já o IP-HIV Amprenavir foi capaz de inibir a formação de tubos germinativos em *C. albicans* em meio suplementado com sangue fetal bovino em mais de 50% em concentrações a partir de 12,5 µM (Braga-Silva, Santos, 2011). Esses resultados levantam a hipótese de que este mecanismo também pode estar envolvido no efeito antibiofilme.

Para elucidar os possíveis mecanismos genéticos relacionados ao impacto das drogas estudadas sobre biofilmes resistentes ao Fluconazol, analisamos a influência de DRV e ATV na expressão gênica de *SAP2* e *BRC1* em *C. albicans* CA70. As 10 Saps conhecidas são diferentemente expressas dependendo da cepa e do ambiente, e tem regiões promotoras dos seus genes distintas, permitindo a regulação por vários fatores transcricionais como também sua expressão coordenada com outros atributos de virulência como a filamentação e mudança fenotípica (Hube, Naglik, 2001). A importância das Saps na patogenicidade de *C. albicans* já está bem estabelecida, como demonstrado em modelos experimentais murinos infectados com cepas com mutantes nos genes *SAP1-3* que tiveram sua mortalidade atenuada (Hube et al., 1997), assim como um modelo de infecção em epitélio humano reconstituído também deixou clara a associação das Saps1 a 3 com a agressão tecidual em mucosas (Schaller et al., 1999). A redução na expressão do gene *SAP2* encontrada em nosso estudo especialmente no grupo submetido ao tratamento com DRV é concordante com evidências dos primeiros estudos que exploraram os mecanismos de atividade antifúngica dos IPs-HIV de primeira geração demonstrando que Ritonavir, Nelfinavir, Saquinavir e Indinavir proporcionaram intenso bloqueio de atividade hidrolítica direta das enzimas Sap1 a 3 (Borg-von Zepelin et al., 1999; Cassone et al., 1999; Gruber et al., 1999; Korting et al., 1999) e posteriormente também o IP-HIV de segunda geração Amprenavir (Braga-Silva et al., 2010; Schaller et al., 2003). Além do bloqueio direto,

Indinavir, Tipranavir, e Ritonavir se mostraram potentes inibidores na produção de Saps em cultura de *C. albicans* em meio pobre em nitrogênio e pH ácido (Cassone et al., 1999; Cenci et al., 2008), enquanto Amprenavir e Indinavir reduziram a expressão de antígenos de Saps ligados a parede celular avaliados por citometria de fluxo e microscopia por fluorescência com anticorpos policlonais anti-Sap 1 a 3 (Braga-Silva et al., 2010; Gruber et al., 1999). Nosso estudo foi o primeiro a incluir avaliação de expressão dos genes SAP, apontando, portanto, para uma atividade inibitória direta na expressão gênica dessas enzimas pelo IP-HIV DRV.

O fator de transcrição *bcr1* vem sendo cada vez mais explorado e sua importância evidenciada na regulação da formação de biofilme (Guan et al., 2013; Jung et al., 2013; Nobile and Mitchell, 2005). Nobile et al. (2006) usaram modelos de *C. albicans* mutantes com defeitos nos alelos *bcr1* e demonstraram a incapacidade de formação de biofilme, estabelecendo a ação deste na fase inicial do processo. Outros estudos demonstraram a participação deste fator na filamentação de células no estado opaco (Guan et al., 2013). Nosso trabalho mostrou que a cepa CA70 submetida a ação dos IPs-HIV ATV e DRV apresentaram redução na expressão de *BRC1*, o que pode estar relacionado tanto com os efeitos antibiofilme quanto com a redução da filamentação.

Considerando os resultados de inibição do biofilme com ambas as drogas, especialmente a inibição total de contagem de UFC com ATV nas duas cepas estudadas, aliado aos dados da literatura expostos, a maioria publicados durante o desenvolvimento deste trabalho, é possível supor que concentrações inferiores de ATV e DRV também seriam efetivas. Outros estudos, avaliando concentrações menores e estabelecendo a BIC seriam relevantes para correlacionar com nível sérico e a viabilidade de estudos clínicos *a posteriori*. Uma vez que tais drogas já têm seu perfil de segurança e interações medicamentosas bem estabelecidos durante anos de uso em TARV no pacientes portadores de HIV, associado a dados de sinergismo de outros IPs-HIV com antifúngicos tradicionais já descritos em diferentes espécies de *Candida* (Eldesouky et al., 2021) e em biofilme de *C. albicans* (Lohse et al., 2020) se estabelecida a BIC, e a dose sistêmica correlacionada fosse viável, seria possível formular um estudo clínico de uso combinado de antifúngico sistêmico com DRV ou ATV no tratamento de infecções sistêmicas por *C. albicans*, associadas ou não a dispositivos invasivos em portadores de HIV como população alvo inicial.

Com base nos resultados *in vitro*, o modelo invertebrado de *G. mellonella* foi utilizado para avaliar os efeitos protetores de ATV e DRV na candidíase experimental. Primeiramente, as larvas foram injetadas com diferentes concentrações de ATV e DRV para verificar a toxicidade sistêmica (10 e 20 mg/kg) e nenhuma morte das larvas foi verificada após sete dias. Além disso, quando injetados em *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* foi verificado um aumento na sobrevida de até 40% comparado ao grupo controle. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo utilizando *C. elegans* infectados com *C. auris* AR0390 e tratados com a combinação Lopinavir a 10 µg/mL e Itraconazol 1 µg/mL (concentração igual a CIM) observando-se aumento da sobrevida dos nematodos em cerca de 90% após 5 dias de infecção (Lohse et al., 2020). Neste modelo, no entanto, Lopinavir em monoterapia na concentração 10 µg/mL não promoveu aumento na sobrevida das larvas.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que os IPs-HIV ATV e DRV possuem atividade *in vitro* antibiofilme e na inibição da filamentação em cepas clínicas de *C. albicans* utilizando concentração 1536 µg/mL e propõem a inibição da expressão de genes relacionados a fatores de virulência, como o gene responsável pela produção de Sap2 e reguladores da formação biofilme (*BRC1*), como mecanismos de ação.

Já os estudos *in vivo* demonstraram efeito na prevenção de morte por infecção por *C. albicans* em modelo de *G. mellonella* utilizando a dose 20 mg/kg de ATV e DRV.

Mais estudos tornam-se necessários para avaliar tantos aspectos *in vitro* (mínima concentração eficaz, sinergismo com outros fármacos, o exato mecanismo de ação desses IPs-HIV em *Candida*,) como *in vivo* (ensaios de pré-clínicos e clínicos) do DRV e ATV e assim consolidar seu uso como uma alternativa na prática clínica.

REFERÊNCIAS*

- Alarco A-M, Marcil A, Chen J, Suter B, Thomas D, Whiteway M. Immune-Deficient *Drosophila melanogaster*: A Model for the Innate Immune Response to Human Fungal Pathogens. *J Immunol*. 2004;172(9):5622–8. doi: 10.4049/jimmunol.172.9.5622. PMID: 15100306.
- Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SFG, De Alvarenga JA, Velloso MDS, De Azevedo Prata MC, et al. *Streptococcus mutans* can modulate biofilm formation and attenuate the virulence of *Candida Albicans*. *PLoS One*. 2016;11(3):1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0150457.
- Barros PP, Ribeiro FC, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AOC. Influence of *Candida krusei* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* gene expression in in vitro biofilms. *Arch Oral Biol*. 2016;64:92–101. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.01.005. PMID: 26803674.
- Barros PP, Rossoni RD, de Souza CM, Scorzoni L, Fenley JDC, Junqueira JC. *Candida* Biofilms: An Update on Developmental Mechanisms and Therapeutic Challenges. *Mycopathologia*. 2020;185(3):415–24. doi: 10.1007/s11046-020-00445-w. PMID: 32277380.
- Bastidas RJ, Shertz CA, Lee SC, Heitman J, Cardenas ME. Rapamycin exerts antifungal activity in vitro and in vivo against *mucor circinelloides* via FKBP12-dependent inhibition of tor. *Eukaryot Cell*. 2012;11(3):270–81. doi: 10.1128/EC.05284-11. PMID: 22210828.
- Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9(6):588–94. doi: 10.1016/j.mib.2006.10.003. PMID: 17055772.
- Borg-von Zepelin M, Meyer I, Thomssen R, Würzner R, Sanglard D, Telenti A, et al. HIV-protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. *J Invest Dermatol*. 1999;113(5):747–51. doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00747.x.
- Braga-Silva LA, Mogami SSV, Valle RS, Silva-Neto ID, Santos ALS. Multiple effects of amprenavir against *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*. 2010;10(2):221–4. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00595.x.
- Braga-Silva LA, Santos ALS. Aspartic Protease Inhibitors as Potential Anti-*Candida albicans* Drugs: Impacts on Fungal Biology, Virulence and Pathogenesis. *Curr Med Chem*. 2011;18(16):2401–19. doi: 10.2174/092986711795843182.
- Brilhante RSN, Silva JAT, Dos Santos Araújo G, Pereira VS, Gotay WJP, De Oliveira JS, et al. Darunavir inhibits *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species

*Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

complex growth and increases the susceptibility of biofilms to antifungal drugs. *J Med Microbiol*. 2020;69(6):830–7. doi: 10.1099/jmm.0.001194. PMID: 32459616.

Cassone A, De Bernardis F, Torosantucci A, Tacconelli E, Tumbarello M, Cauda R. In Vitro and In Vivo Anticandidal Activity of Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitors. *J Infect Dis*. 1999;180(2):448–53. doi: 10.1086/314871.

Cassone A, Tacconelli E, De Bernardis F, Tumbarello M, Torosantucci A, Chiani P, et al. Antiretroviral Therapy with Protease Inhibitors Has an Early, Immune Reconstitution–Independent Beneficial Effect on Candida Virulence and Oral Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus–Infected Subjects. *J Infect Dis*. 2002;185(2):188–95. doi: 10.1086/338445.

Cauda R, Tacconelli E, Tumbarello M, Morace G, De Bernardis F, Torosantucci A, et al. Role of protease inhibitors in preventing recurrent oral candidosis in patients with HIV infection: a prospective case-control study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1999;21(1):20–5.

Cavalheiro M, Teixeira MC. Candida Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. *Front Med*. 2018;5(FEB):1–15. doi: 10.3389/fmed.2018.00028.

Cenci E, Francisci D, Belfiori B, Pierucci S, Baldelli F, Bistoni F, et al. Tipranavir exhibits different effects on opportunistic pathogenic fungi. *J Infect*. 2008;56(1):58–64. doi: 10.1016/j.jinf.2007.08.004. PMID: 17905438.

Chamilos G, Lionakis MS, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(1):42–55. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70686-7. PMID: 17182343.

Chanda W, Joseph TP, Wang W, Padhiar AA, Zhong M. The potential management of oral candidiasis using anti-biofilm therapies. *Med Hypotheses*. 2017;106:15–8. doi: 10.1016/j.mehy.2017.06.029.

Chao CC, Hsu PC, Jen CF, Chen IH, Wang Chieh Huei, Chan HC, et al. Zebrafish as a model host for *Candida albicans* infection. *Infect Immun*. 2010;78(6):2512–21. doi: 10.1128/IAI.01293-09. PMID: 20308295.

Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(5):599–607.

Colombo AL, Guimarães T, Camargo LFA, Richtmann, Rosana Queiroz-Telles F de, Salles MJC, Cunha CA da, et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Brazilian J Infect Dis*. 2013;17(3):283–312. doi: 10.1016/j.bjid.2013.02.001.

Corrêa JCR, Serra CH dos R, Salgado HRN. Stability Study of Darunavir Ethanolate

Tablets Applying a New Stability-Indicating HPLC Method. *Chromatogr Res Int*. 2013;2013:1–7. doi: 10.1155/2013/834173.

Costa ACBP, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AOC. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed in vitro. *Mycoses*. 2013;56(6):614–22. doi: 10.1111/myc.12092. PMID: 23710618.

Cotter G, Doyle S, Kavanagh K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;27(2):163–9. doi: 10.1016/S0928-8244(99)00185-6. PMID: 10640612.

Cruz MC, Goldstein AL, Blankenship J, Del Poeta M, Perfect JR, McCusker JH, et al. Rapamycin and less immunosuppressive analogs are toxic to *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* via FKBP12-dependent inhibition of TOR. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(11):3162–70. doi: 10.1128/AAC.45.11.3162-3170.2001. PMID: 11600372.

da Silva Dantas A, Lee KK, Raziunaite I, Schaefer K, Wagener J, Yadav B, et al. Cell biology of *Candida albicans*–host interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2016;34:111–8. doi: 10.1016/j.mib.2016.08.006.

De Bernardis F, Sullivan PA, Cassone A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Med Mycol*. 2001;39(4):303–13. doi: 10.1080/mmy.39.4.303.313. PMID: 11556759.

Dios PD, Ocampo A, Miralles C, Otero I, Iglesias I, Rayo N. Frequency of oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients on protease inhibitor therapy. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 1999;87(4):437–41. doi: 10.1016/S1079-2104(99)70242-8.

Donlan RM. Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*. 2001;33(8):1387–92. doi: 10.1086/322972. PMID: 11565080.

Eldesouky HE, Salama EA, Lanman NA, Hazbun TR, Seleem MN. Potent synergistic interactions between lopinavir and azole antifungal drugs against emerging multidrug-resistant *Candida auris*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(1):1–17. doi: 10.1128/AAC.00684-20. PMID: 33046487.

Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(2):109–18. doi: 10.1038/nrmicro2475. PMID: 21189476.

François LM, Duncan W, Bernhard H. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119–28. doi: 10.4161/viru.22913. PMID: 23302789.

Ghosh AK, Kincaid JF, Cho W, Walters DE, Krishnan K, Hussain KA, et al. Potent HIV protease inhibitors incorporating high-affinity P2-ligands and (R)-(hydroxyethylamino)sulfonamide isostere. *Bioorganic Med Chem Lett*.

1998;8(6):687–90. doi: 10.1016/S0960-894X(98)00098-5. PMID: 9871583.

Gruber A, Speth C, Lukasser-Vogl E, Zangerle R, Borg-Von Zepelin M, Dierich MP, et al. Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor attenuates *Candida albicans* virulence properties in vitro. *Immunopharmacology*. 1999;41(3):227–34. doi: 10.1016/S0162-3109(99)00035-1.

Guan, G; Xie J; Nobile CJ, Sun Y; Cao C; Tong Y; Huang G. Bcr1 plays a central role in the regulation of opaque cell filamentation in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 2013;89(4):732–50. doi: 10.1111/mmi.12310.

Hoeg L, Thoma-Greber E, Röcken M, Korting HC. HIV protease inhibitors influence the prevalence of oral candidosis in HIV-infected patients: a 2-year study. *Mycoses*. 2009;41(7–8):321–5. doi: 10.1111/j.1439-0507.1998.tb00345.x.

Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: Resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*. 2001;147(8):1997–2005. doi: 10.1099/00221287-147-8-1997. PMID: 11495978.

Hube B, Sanglard D, Odds FC, Hess D, Brown AJP, Gow NAR, et al. Disruption of Each of the Secreted Aspartyl Proteinase Genes Attenuates Virulence. *Infect Immun*. 1997;65(9):3529–38.

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. PMID: 29130369.

Jung SI, Finkel JS, Solis NV, Chaili S, Mitchell AP, Yeaman MR, et al. Bcr1 functions downstream of *ssd1* to mediate antimicrobial peptide resistance in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2013;12(3):411–9. doi: 10.1128/EC.00285-12. PMID: 23314964.

Junqueira JC, Vilela SFG, Rossoni RD, Barbosa JO, Costa ACBP, Rasteiro VMC, et al. Colonização oral por leveduras em pacientes HIV-positivos no Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2012;54(1):17–24. doi: 10.1590/S0036-46652012000100004.

Kean R, Delaney C, Sherry L, Borman A, Johnson EM, Richardson MD. Reveals Novel Insights into Biofilm-Mediated Resistance 2018;3(4):1–14.

Kim JH, Cheng LW, Chan KL, Tam CC, Mahoney N, Friedman M, et al. Antifungal drug repurposing. *Antibiotics*. 2020;9(11):1–29. doi: 10.3390/antibiotics9110812.

Korting HC, Schaller M, Eder G, Hamm G, Böhmer U, Hube B. Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(8):2038–42.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8. doi:

10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.

Lohse MB, Gulati M, Craik CS, Johnson AD, Nobile CJ. Combination of Antifungal Drugs and Protease Inhibitors Prevent *Candida albicans* Biofilm Formation and Disrupt Mature Biofilms. *Front Microbiol.* 2020;11(May):1–12. doi: 10.3389/fmicb.2020.01027.

Mastrolorenzo A, Rusconi S, Scozzafava A, Barbaro G, Supuran CT. Inhibitors of HIV-1 protease: current state of the art 10 years after their introduction. From antiretroviral drugs to antifungal, antibacterial and antitumor agents based on aspartic protease inhibitors. *Curr Med Chem.* 2007;14(26):2734–48. PMID: 18045120.

Mello TP de, Ramos L de S, Braga-Silva, Lys Adriana Branquinha MH, Santos ALS dos. Fungal Biofilm – A Real Obstacle Against an Efficient Therapy: Lessons from *Candida*. *Curr Top Med Chem.* 2017;17(17):1987–2004. doi: 10.2174/1568026617666170105145227.

Ministério da Saúde (Brasil). Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Manejo da infecção pelo HIV em adultos. 2018a. doi: 10.1016/j.bone.2016.04.028. PMID: 27143110.

Ministério da Saúde (Brasil). Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da infecção pelo HIV em crianças e adolescentes. 2018b.

Monod M, Borg-von Zepelin M, Telenti A SD. The inhibition of *Candida albicans*-secreted proteases by three different HIV Protease Inhibitors. *Dermatology.* 1999;198(4):412–14. PMID: 10490300

Motaung TE, Ells R, Pohl CH, Albertyn J, Tsilo TJ. Genome-wide functional analysis in *Candida albicans*. *Virulence.* 2017;8(8):1563–79. doi: 10.1080/21505594.2017.1292198. PMID: 28277904.

Munro CA, Hube B. Anti-fungal therapy at the HAART of viral therapy. *Trends Microbiol.* 2002;10(4):173–7. doi: 10.1016/S0966-842X(02)02330-2.

Mylonakis, E, Moreno R, El Khoury J, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, Ausubel FM, et al. *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Cryptococcus neoformans* Pathogenesis. *Infect Immun.* 2005;73(7):3842–50. doi: 10.1128/IAI.73.7.3842. PMID: 15972469.

Mylonakis E, Casadevall A, Ausubel FM. Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. *PLoS Pathog.* 2007;3(7):0859–65. doi: 10.1371/journal.ppat.0030101. PMID: 17676994.

Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol.* 2004;6(10):915–26. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00439.x. PMID: 15339267.

National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts ; Approved Standard — Second Edition: NCCLS document M27-A2. Pensilvânia: NCCLS, 2002.

Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, Smith FJ, Yue F, Phan QT, et al. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS Pathog.* 2006;2(7):0636–49. doi: 10.1371/journal.ppat.0020063. PMID: 16839200.

Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol.* 2006;8(9):1382–91. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00761.x. PMID: 16848788.

Nobile CJ, Mitchell AP. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Curr Biol.* 2005;15(12):1150–5. doi: 10.1016/j.cub.2005.05.047. PMID: 15964282.

Palmeira VF, Goulart FRV, Granato MQ, Alviano DS, Alviano CS, Kneipp LF, et al. *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells: Secretion of aspartic-type peptidase and susceptibility to peptidase inhibitors. *Front Microbiol.* 2018;9(JUN):1–9. doi: 10.3389/fmicb.2018.01383.

Pukkila-Worley R, Peleg AY, Tampakakis E, Mylonakis E. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Eukaryot Cell.* 2009;8(11):1750–8. doi: 10.1128/EC.00163-09. PMID: 19666778.

Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;18(1):41–58. doi: 10.1038/nrd.2018.168. PMID: 30310233.

Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. Our Current Understanding of Fungal Biofilms. *Crit Rev Microbiol.* 2009;35(4):340–55. doi: 10.3109/10408410903241436. PMID: 19863383.

Samaranayake LP. Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol.* 1992;73(2):171–80. doi: 10.1016/0030-4220(92)90191-R.

Samaranayake LP, Keung Leung W, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol 2000.* 2009;49(1):39–59. doi: 10.1111/j.1600-0757.2008.00291.x.

Sangeorzan JA, Bradley SF, He X, Zarins LT, Ridenour GL, Tiballi RN, et al. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: Colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am J Med.* 1994;97(4):339–46. doi: 10.1016/0002-9343(94)90300-X.

Santos ALS. Aspartic Proteases of Human Pathogenic Fungi are Prospective Targets for the Generation of Novel and Effective Antifungal Inhibitors. *Curr Enzym Inhib.* 2011;7(2):96–118. doi: 10.2174/157340811796575281.

Santos ALS, Braga-Silva LA. Aspartic Protease Inhibitors: Effective Drugs against

the Human Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Mini-Reviews Med Chem*. 2013;13(1):155–62. doi: 10.2174/1389557511307010155.

Santos ALS, Galdino ACM, Mello TP, Ramos LS, Branquinha MH, Bolognese AM, et al. What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective! *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(9):e180212. doi: 10.1590/0074-02760180212.

Schaller M, Korting HC, Schäfer W, Bastert J, Chen WC, Hube B. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol Microbiol*. 1999;34(1):169–80. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01590.x. PMID: 10540295.

Schaller M, Krnjaic N, Niewerth M, Hamm G, Hube B, Korting HC. Effect of antimycotic agents on the activity of aspartyl proteinases secreted by *Candida albicans*. *J Med Microbiol*. 2003;52(3):247–9. doi: 10.1099/jmm.0.05048-0. PMID: 12621090.

Segal E, Frenkel M. Experimental in vivo models of Candidiasis. *J Fungi*. 2018;4(1). doi: 10.3390/jof4010021.

Sekar V, Kestens D, Spinosa-Guzman S, De Pauw M, De Paepe E, Vangeneugden T, et al. The effect of different meal types on the pharmacokinetics of darunavir (TMC114)/ritonavir in HIV-negative healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2007;47(4):479–84. doi: 10.1177/0091270006298603. PMID: 17389557.

Sheehan G, Kavanagh K. Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Virulence*. 2018;9(1):163–72. doi: 10.1080/21505594.2017.1370174. PMID: 28872999.

Sherry L, Ramage G, Kean R, Borman A, Johnson EM, Richardson MD, et al. Biofilm-forming capability of highly virulent, multidrug-resistant *Candida auris*. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(2):328–31. doi: 10.3201/eid2302.161320. PMID: 28098553.

Souza MVN, Almeida MV. Drogas anti-VIH: passado, presente e perspectivas futuras. *Quim Nova*. 2005;26(3):366–72. doi: 10.1590/s0100-40422003000300014.

Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004;12(7):317–24. doi: 10.1016/j.tim.2004.05.008. PMID: 15223059.

Sun S, Li Y, Guo Q, Shi C, Yu J, Ma L. In vitro interactions between tacrolimus and azoles against *Candida albicans* determined by different methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(2):409–17. doi: 10.1128/AAC.01070-07. PMID: 18056277.

Ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, De Groot PWJ. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J Dent Res*. 2009;88(2):105–15. doi: 10.1177/0022034508329273. PMID: 19278980.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol*. 2006;51(8):672–80. doi: 10.1016/j.archoralbio.2006.02.005.

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. PMID: 30587801.

Tsai CJY, Loh JMS, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*. 2016;7(3):214–29. doi: 10.1080/21505594.2015.1135289. PMID: 26730990.

Tsang CSP, Hong I. HIV protease inhibitors differentially inhibit adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Mycoses*. 2010;53(6):488–94. doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01743.x.

Van Gyseghem E, Stokbroekx S, de Armas HN, Dickens J, Vanstockem M, Baert L, et al. Solid state characterization of the anti-HIV drug TMC114: Interconversion of amorphous TMC114, TMC114 ethanolate and hydrate. *Eur J Pharm Sci*. 2009;38(5):489–97. doi: 10.1016/j.ejps.2009.09.013. PMID: 19782132.

Vilela SFG, Barbosa JO, Rossoni RD, Santos JD, Prata MCA, Anbinder AL, et al. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. Albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence*. 2015;6(1):29–39. doi: 10.4161/21505594.2014.981486.

Villanueva-Lozano H, Treviño-Rangel R de J, González GM, Hernández-Rodríguez PA, Camacho-Ortiz A, Castillo-Reyna L, et al. Clinical evaluation of the antifungal effect of sertraline in the treatment of cryptococcal meningitis in HIV patients: a single Mexican center experience. *Infection*. 2018;46(1):25–30. doi: 10.1007/s15010-017-1059-3. PMID: 28815430.

Wall G, Lopez-Ribot JL. Screening repurposing libraries for identification of drugs with novel antifungal activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(9):1–10. doi: 10.1128/AAC.00924-20. PMID: 32660991.

Wlodawer A, Erickson JW. Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu Rev Biochem*. 1993;62:543–85.

Zingman BS. Resolution of refractory AIDS-Related mucosal Candidiasis after initiation of didanosine plus saquinavir. *J New Engl J Med*. 1996;334(25):1674–5. PMID: 10279367.