



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

FERNANDO VICTOR MONTEIRO PORTELA

**ANTIBACTERIANOS ESTIMULAM O CRESCIMENTO DOS BIOFILMES E
PRODUÇÃO DE CÉLULAS PERSISTENTES DE *Candida albicans* ISOLADAS DE
FUNGEMIA**

FORTALEZA-CE

2024

FERNANDO VICTOR MONTEIRO PORTELA

**ANTIBACTERIANOS ESTIMULAM O CRESCIMENTO DOS BIOFILMES E
PRODUÇÃO DE CÉLULAS PERSISTENTES DE *Candida albicans* ISOLADAS DE
FUNGEMIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientadora: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro.

Área de concentração: Medicina I.

Linha de pesquisa: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

FORTALEZA-CE

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P877a

Portela, Fernando Victor Monteiro.

Antibacterianos estimulam o crescimento dos biofilmes e produção de células persistentes de *Candida albicans* isoladas de fungemia/ Fernando Victor Monteiro Portela. – 2024.
142 f.: il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2024.

Orientação: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro.

Título
1. *Candida* spp. 2. Candidemia. 3. Virulência. 4. Candidíase invasiva. 5. Células dormentes. I.

CDD 610

FERNANDO VICTOR MONTEIRO PORTELA

**ANTIBACTERIANOS ESTIMULAM O CRESCIMENTO DOS BIOFILMES E
PRODUÇÃO DE CÉLULAS PERSISTENTES DE *Candida albicans* ISOLADAS DE
FUNGEMIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Ana Raquel Colares de Andrade
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. Dr. Lauro Vieira Perdigão Neto
Universidade de São Paulo (USP)

Aos meus pais, Maria Cléia Monteiro e José Augusto Costa Portela, que sempre estiveram presentes nos momentos de dificuldade.

Para minhas avós, Raimunda Valnice Monteiro dos Santos (in memoriam) e Raimunda de Jesus Assunção Costa Portela (in memoriam), que partiram durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre abrir uma janela nos momentos em que a vida fechou uma porta.

À minha família: meus pais, Maria Cléia Monteiro e José Augusto Costa Portela, por acreditar, apoiar, educar e ensinar que o estudo é o caminho para se tornar uma pessoa melhor; e meu irmão, Ítalo Anderson Monteiro Portela, pela companhia, inspiração e suporte. Sem o apoio de vocês, provavelmente eu não teria conseguido.

À minha noiva, Ana Bárbara Guimarães de Souza, que durante todos esses anos me apoiou, compartilhou, dividiu e soube compreender minhas angústias. Obrigado por ser uma companheira maravilhosa e estar sempre ao meu lado.

À esta Universidade, direção, administração e corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (PPGCM) e Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médicas (PPGMM), que contribuíram com a minha jornada acadêmica. Em especial à minha orientadora Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, pela recepção, confiança, brilhante orientação, paciência, ensinamentos, crescimento profissional e disponibilidade. Sempre se mostrou disposta a conversar e ajudar.

Aos amigos, Dra. Ana Raquel Colares de Andrade, Dra. Lívia Maria Galdino Pereira e Dr. José Kleybson de Souza, por contribuírem imensamente com este trabalho. Cada experimento, ponto e vírgula dessa tese, foi com o auxílio de vocês. Jamais esquecerei as conversas e os momentos de descontração. Obrigado por tudo, vocês são grandes amigos. Aos demais colegas do laboratório, que colaboraram de alguma forma com este trabalho.

Agradeço também, aos amigos Dr. Bruno Rocha Amando e Dr. Antônio José de Jesus Evangelista, pela oportunidade em conhecer a microbiologia na prática e à docência, respectivamente. Obrigado por todos os ensinamentos.

Ao professor Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto, por fornecer as cepas empregadas neste estudo.

Aos professores que compuseram as bancas de qualificação e defesa, por contribuírem para o engrandecimento deste trabalho.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPQ, pelo financiamento dessa pesquisa.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho. A todos vocês, meu muito obrigado!

“Teremos coisas bonitas pra contar

E até lá, vamos viver

Temos muito ainda por fazer

Não olhe pra trás

Apenas começamos

O mundo começa agora

Apenas começamos”

Metal Contra as Nuvens - Legião Urbana

RESUMO

A candidemia é uma das principais causas de infecções fúngicas invasivas (IFI) no âmbito hospitalar. Além disso, é considerada uma infecção emergente drasticamente representada pela sua elevada morbi-mortalidade. *Candida albicans* é o principal patógeno identificado, com mortalidade de até 50% em pacientes imunocomprometidos. A virulência de *C. albicans* está diretamente associada às IFI, dada sua capacidade de formar biofilmes em dispositivos médicos invasivos (cateteres e sondas) e produzir células persistentes (CP). São apontados diversos fatores de risco para o surgimento das candidemias, dentre eles podemos destacar a exposição prolongada aos antibacterianos de amplo espectro. A disbiose induzida pelo uso de antibióticos é conhecida como o principal motivo para o surgimento das candidemias oportunistas. Tais perturbações alteram o microbioma e a integridade da barreira mucosa, favorecendo a colonização e disseminação por *Candida* spp. Estudos prévios evidenciaram que os antibióticos também podem estimular diretamente o crescimento e a virulência de patógenos fúngicos. Diante do exposto, este estudo objetivou avaliar a influência dos antibacterianos (ATB) comumente usados no ambiente hospitalar sobre a formação dos biofilmes e produção de CP de *C. albicans* isoladas de fungemia. Para tanto, foram avaliadas seis cepas de *C. albicans* isoladas de fungemia. Os ATB amoxicilina (AMX), cefepime (CEF), vancomicina (VAN), amicacina (AMK), gentamicina (GEN) e ciprofloxacina (CIP) foram testados nas concentrações de pico plasmático (PP) de cada droga. Além disso, visando proporcionar um ambiente de disbiose ocasionado pelo uso de ATB, foi preparado um lisado celular de *Escherichia coli* (LCE). Para obtenção do LCE, a cepa de *E. coli* ATCC 25922 foi tratada com CEF na concentração de PP e filtrada com membrana 0,22µm. Para etapa inicial, foi avaliado o perfil de sensibilidade dos isolados clínicos de *C. albicans* frente ao fluconazol (FLC), itraconazol, voriconazol, caspofungina (CAS) e anfotericina B (AMB), segundo a metodologia descrita pelo CLSI, 2008. Posteriormente, iniciou-se os testes em biofilmes. Os isolados clínicos foram avaliados quanto à sua capacidade de formação de biofilmes em: fraco, médio e fortes produtores. Em seguida, os biofilmes formados em meio suplementado com AMX, CEF, VAN ou LCE foram analisados quanto à viabilidade metabólica (MTT), biomassa, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal (CLSM). Também foi avaliada a tolerância dos biofilmes expostos a AMX, CEF, VAN e LCE frente aos antifúngicos FLZ, CAS e AMB por meio de MTT, cristal violeta (CV) e CLSM. Na segunda etapa do estudo, foi investigado o efeito dos ATB na produção de CP. Para a obtenção das CP, os biofilmes de *C. albicans* foram formados meio livre de ATB ou meio suplementado com AMX, CEF, VAN, AMK, GEN ou CIP na concentração de PP. As CP recuperadas dos biofilmes foram avaliadas quanto ao número de unidades formadora de colônia (UFC/mL), sensibilidade à AMB e características morfológicas por CLSM. Os resultados obtidos para a sensibilidade planctônica, evidenciaram que todas as cepas de *C. albicans* foram sensíveis aos antifúngicos testados. Os isolados foram classificados como forte produtores de biofilme, e os biofilmes formados com AMX, CEF, VAN e LCE elevaram em até 70% sua atividade metabólica e até 48% sua biomassa. Além disso, os biofilmes formados com AMX, CEF, VAN e LCE, se mostraram mais tolerantes ao FLC e CAS, apresentando um aumento de até 50% na atividade metabólica e biomassa, quando comparados aos biofilmes formados apenas com meio de cultivo. Entretanto, não foram observados resultados significativos para AMB. Os resultados obtidos na segunda etapa, evidenciaram que todos os isolados testados foram capazes de formar CP. Além disso, os biofilmes formados com AMX, CEF, VAN, GEN ou CIP, elevaram o número de CP em até 8x quando comparados ao controle. Entretanto, não foram observados resultados significativos para AMK. A sensibilidade de CP frente à AMB demonstrou que as células

isoladas são variantes fenotípicas do tipo selvagem, não mutantes. A partir dos resultados obtidos, infere-se que os biofilmes de *C. albicans* formados com AMX, CEF e VAN podem produzir um biofilme mais robusto, com maior tolerância ao FLC e CAS. Esses resultados podem ter grande repercussão na prática médica, uma vez que a CAS é considerada a primeira opção terapêutica no tratamento das IFI por *Candida* spp. Além disso, infere-se que AMX, CEF, VAN, GEN e CIP são capazes de estimular a produção de CP em biofilmes de *C. albicans*. Esses resultados sugerem que os pacientes em uso de antibioticoterapia prolongada estão mais suscetíveis as IFI devido ao estímulo na produção de biofilme e CP, o que dificulta o tratamento e favorece a recidiva das doenças.

Palavras-chaves: *Candida* spp.; candidemia; virulência; candidíase invasiva; células dormentes; antibióticos

ABSTRACT

Candidemia is one of the main causes of invasive fungal infections (IFI) in hospitals. Furthermore, it is considered an emerging infection drastically represented by its high morbidity and mortality. *Candida albicans* is the main identified pathogen, with mortality rates of up to 90% in immunocompromised patients. The virulence of *C. albicans* is directly associated with IFI, given its ability to form biofilms on invasive medical devices (catheters and probes) and produce persistent cells (PC). Several risk factors for the emergence of candidemias are highlighted, among which we can highlight prolonged exposure to broad-spectrum antibacterials. Dysbiosis induced by the use of antibiotics is known as the main reason for the emergence of opportunistic candidemias. Such disturbances alter the microbiome and the integrity of the mucosal barrier, favoring colonization and dissemination by *Candida* spp. Previous studies have shown that antibiotics can also directly stimulate the growth and virulence of fungal pathogens. Given the above, this study aimed to evaluate the influence of antibacterial drugs (ATB) commonly used in the hospital environment on the formation of biofilms and PC production of *C. albicans* isolated from fungemia. To this end, six strains of *C. albicans* isolated from fungemia were evaluated. The ATBs amoxicillin (AMX), cefepime (CEF), vancomycin (VAN), amikacin (AMK), gentamicin (GEN) and ciprofloxacin (CIP) were tested at peak plasma concentrations (PP) of each drug. Furthermore, aiming to provide an environment of dysbiosis caused by the use of ATB, an *Escherichia coli* cell lysate (LCE) was prepared. To obtain the LCE, the *E. coli* ATCC 25922 strain was treated with CEF at a concentration of PP and filtered with a 0.22 μ m membrane. For the initial stage, the sensitivity profile of clinical isolates of *C. albicans* was evaluated against fluconazole (FLC), itraconazole, voriconazole, caspofungin (CAS) and amphotericin B (AMB), according to the methodology described by CLSI. Subsequently, tests on biofilms began. Clinical isolates were evaluated for their ability to form biofilms in: weak, medium and strong producers. Then, the biofilms formed in medium supplemented with AMX, CEF, VAN or LCE were analyzed for metabolic viability (MTT), biomass, scanning electron microscopy (SEM) and confocal microscopy (CLSM). The tolerance of biofilms exposed to AMX, CEF, VAN and LCE against the antifungals FLC, CAS and AMB was also evaluated using MTT, violet Crystal (CV) and CLSM. In the second stage of the study, the effect of ATB on PC production was investigated. To obtain PC, *C. albicans* biofilms were formed in ATB-free medium or medium supplemented with AMX, CEF, VAN, AMK, GEN or CIP at the concentration of PP. PC recovered from biofilms were evaluated for the number of colony-forming units (CFU/mL), sensitivity to AMB and morphological characteristics by CLSM, 2008. The results obtained for planktonic sensitivity showed that all strains of *C. albicans* were sensitive to the antifungals tested. The isolates were classified as strong biofilm producers, and the biofilms formed with AMX, CEF, VAN and LCE increased their metabolic activity by up to 70% and their biomass by up to 48%. Furthermore, biofilms formed with AMX, CEF, VAN and LCE were more tolerant to FLC and CAS, showing an increase of up to 50% in metabolic activity and biomass, when compared to biofilms formed only with culture medium. However, no significant results were observed for AMB. The results obtained in the second stage showed that all tested isolates were capable of forming PC. Furthermore, biofilms formed with AMX, CEF, VAN, GEN or CIP increased the number of PC by up to 8x when compared to the control. However, no significant results were observed for AMK. The sensitivity of PC to AMB demonstrated that the isolated cells are phenotypic variants of the wild type, not mutants. From the results obtained, it is inferred that *C. albicans* biofilms formed with AMX, CEF and VAN can produce a more robust biofilm, with greater tolerance to FLC and CAS. These results could have great repercussions on medical practice,

since CAS is considered the first therapeutic option in the treatment of IFI caused by *Candida* spp. Furthermore, it is inferred that AMX, CEF, VAN, GEN and CIP are capable of stimulating PC production in *C. albicans* biofilms. These results suggest that patients using prolonged antibiotic therapy are more susceptible to IFI due to the stimulation of biofilm and PC production, which makes treatment difficult and favors disease recurrence.

Keywords: *Candida* spp.; candidemia; virulence; invasive candidiasis; dormant cells; antibiotics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	História da candidíase.....	24
Figura 2 –	Aspectos morfológicos de <i>Candida</i> spp. (blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas verdadeiras).....	25
Figura 3 –	Colônias de <i>Candida</i> spp. isoladas de hemocultura.....	26
Figura 4 –	Patogênese da candidíase invasiva.....	28
Figura 5 –	Estratégias de sobrevivência de <i>Candida albicans</i>	30
Figura 6 –	Etapas de formação do biofilme de <i>Candida albicans</i>	34
Figura 7 –	Mecanismos de resistência dos biofilmes de <i>Candida albicans</i>	36
Figura 8 –	Variações geográficas na distribuição de espécies de <i>Candida</i> causadoras de fungemia.....	40
Figura 9 –	Blastoconídeos de <i>Candida albicans</i> em hemocultura.....	44
Figura 10 –	Terapia da candidíase invasiva.....	48
Figura 11 –	Mecanismo de ação dos antibacterianos.....	51
Figura 12 –	Organograma e etapas experimentais deste estudo.....	60
Figura 13 –	Quantificação do biofilme de cepas de <i>C. albicans</i> incluídas neste estudo.....	70
Figura 14 –	Biofilmes de <i>Candida albicans</i> formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos ou lisado celular.....	72
Figura 15 –	Sensibilidade ao Fluconazol (FLC) frente aos biofilmes de <i>Candida albicans</i> formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos ou lisado celular.....	74
Figura 16 –	Sensibilidade a Caspofungina (CAS) frente aos biofilmes de <i>Candida albicans</i> formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos ou lisado celular.....	75
Figura 17 –	Sensibilidade a Anfotericina B (AMB) frente aos biofilmes de <i>Candida albicans</i> formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos ou lisado celular.....	76
Figura 18 –	Imagens de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilmes de <i>Candida albicans</i> formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos.....	78

Figura 19 – Efeito dos antibacterianos em face do biovolume e espessura dos biofilmes de <i>Candida albicans</i> formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos.....	79
Figura 20 – Imagens de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) de biofilmes de <i>Candida albicans</i> formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos e posteriormente tratados com Fluconazol ou Caspofungina.	81
Figura 21 – Sensibilidade ao Fluconazol ou Caspofungina em face do biovolume e espessura dos biofilmes de <i>Candida albicans</i> formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos.....	82
Figura 22 – Detecção de células persistentes em biofilmes de <i>C. albicans</i>	83
Figura 23 – Detecção de células persistentes em biofilmes de <i>Candida albicans</i> formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos.....	84
Figura 24 – Imagens de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) de células persistentes em biofilmes de <i>Candida albicans</i> formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Identificação e origem das cepas utilizadas nesse estudo.....	56
Tabela 2	–	Antibacterianos utilizados nesse estudo.....	57
Tabela 3	–	<i>Breakpoints</i> de leitura dos antibacterianos em face de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25213.....	58
Tabela 4	–	<i>Breakpoints</i> de interpretação dos antibacterianos em face de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25213.....	58
Tabela 5	–	<i>Breakpoints</i> de interpretação dos antifúngicos em face de <i>Candida</i> spp.....	62
Tabela 6	–	<i>Breakpoints</i> de leitura dos antifúngicos em face de <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 e <i>Candida krusei</i> ATCC 6258.....	62
Tabela 7	–	<i>Cutoff</i> Epidemiológico ($\mu\text{g/mL}$) para <i>Candida albicans</i>	63
Tabela 8	–	Concentrações inibitórias mínimas (CIM) de cefepime, amoxicilina, vancomicina, ampicacina, gentamicina e ciprofloxacina frente as cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25213.....	69
Tabela 9	–	Concentrações inibitórias mínimas (CIM) de fluconazol, itraconazol, voriconazol, caspofungina e anfotericina B frente aos isolados de <i>Candida albicans</i>	70
Tabela 10	–	Concentrações inibitórias mínimas (CIM) de anfotericina B frente as células planctônicas, células de biofilme e células persistentes de <i>Candida albicans</i> isoladas após contato com antibacterianos: amoxicilina, cefepime, vancomicina, ampicacina, gentamicina e ciprofloxacina.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMX	Amoxicilina
AMK	Amicacina
AMB	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATF	Antifúngicos
CAS	Caspofungina
CEF	Cefepime
CIP	Ciprofloxacina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CDC	<i>Center of Disease Control</i>
CP	Células persistentes
CV	Cristal Violeta
CLSM	Microscopia Confocal de Varredura a Laser
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DO	Densidade Óptica
FLC	Fluconazol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GEN	Gentamicina
ITZ	Itraconazol
IFIs	Infecções fúngicas invasivas
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEC	Matriz extracelular polimérica
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
MOPS	Ácido Morfolinopropanosulfônico
MLSA	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
PP	Pico plasmático
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PAMP's	Padrões moleculares associados a patógenos fúngicos
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RPM	Rotação por minuto
VAN	Vancomicina
VRZ	Voriconazol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS (IFI).....	20
2.2	CANDIDEMIA.....	21
2.3	O GÊNERO <i>Candida</i>	23
2.3.1	Aspectos históricos	23
2.3.2	Aspectos morfofisiológicos	25
2.3.3	Patogênese e fatores de virulência	27
2.3.3.1	Biofilme.....	33
2.3.3.2	Células persistentes.....	36
2.3.4	Epidemiologia da candidemia	38
2.3.5	Diagnóstico da candidemia	43
2.3.6	Tratamento e manejo da candidemia	46
2.3.7	Sensibilidade aos antifúngicos	49
2.4	ANTIBACTERIANOS.....	50
3	HIPÓTESES	54
4	OBJETIVOS	55
4.1	OBJETIVO GERAL.....	55
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
5	MATERIAL E MÉTODOS	56
5.1	LOCAL DE ESTUDO.....	56
5.2	MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	56
5.3	ANTIBACTERIANOS.....	57
5.4	ETAPAS EXPERIMENTAIS.....	58
5.5	TESTE DE SENSIBILIDADE PLANCTÔNICA.....	61
5.6	LISADO CELULAR DE <i>Escherichia coli</i>	63
5.7	TESTES EM BIOFILMES.....	63
5.7.1	Classificação quanto à formação de biofilme	64
5.7.2	Atividade dos antibacterianos e lisado celular no desenvolvimento dos biofilmes de <i>Candida albicans</i>	64

5.7.3	Efeito dos antibacterianos e lisado celular na tolerância dos biofilmes de <i>Candida albicans</i> frente aos antifúngicos.....	65
5.7.4	Ação dos antibacterianos na morfologia e ultraestrutura dos biofilmes produzidos por <i>Candida albicans</i>	65
5.8	CÉLULAS PERSISTENTES.....	66
5.8.1	Detecção de células persistentes em biofilmes de <i>C. albicans</i> formados com antibacterianos.....	67
5.8.2	Sensibilidade de células persistentes frente à AMB.....	67
5.8.3	Estrutura e morfologia das células persistentes.....	68
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
6	RESULTADOS	69
6.1	ANTIBACTERIANOS.....	69
6.2	TESTE DE SENSIBILIDADE PLANCTÔNICA.....	69
6.3	TESTES EM BIOFILMES.....	70
6.3.1	Classificação quanto à formação de biofilme.....	70
6.3.2	Atividade dos antibacterianos e lisado celular no desenvolvimento dos biofilmes de <i>Candida albicans</i>	71
6.3.3	Efeito dos antibacterianos e lisado celular na tolerância dos biofilmes de <i>Candida albicans</i> frente aos antifúngicos.....	73
6.3.4	Ação dos antibacterianos na morfologia e ultraestrutura dos biofilmes produzidos por <i>Candida albicans</i>	77
6.4	CÉLULAS PERSISTENTES.....	82
6.4.1	Detecção de células persistentes em biofilmes de <i>C. albicans</i> formados com antibacterianos.....	83
6.4.2	Sensibilidade de células persistentes frente à AMB.....	85
6.4.3	Estrutura e morfologia das células persistentes.....	85
7	DISCUSSÃO.....	88
8	CONCLUSÃO.....	99
	REFERÊNCIA	100
	APÊNDICES	131

1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas invasivas (IFIs) são consideradas um grande problema de saúde mundial, apresentando elevado risco de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos (REVIE et al., 2018; MARIETTE et al., 2017; BADIEE P, HASHEMIZADEH, 2014). As candidemias constituem as IFIs mais prevalentes em todo o mundo (WEBB et al., 2018; TAGLIAFERRI e MENICHETTI, 2015; FOURNIER et al., 2011). Das espécies fúngicas associadas às infecções sistêmicas em seres humanos, inquestionavelmente, *C. albicans* é o principal agente etiológico, sendo considerada a quarta espécie mais isolada em hemoculturas nos Estados Unidos (MCCARTY et al., 2021; PFALLER et al., 2019; MEDEIROS et al., 2019; KAUR E CHAKRABARTI, 2017; WANG, XU, HSUEH, 2016; PFALLER, 2007).

A candidemia está diretamente associada aos fatores de virulência produzidos pelas espécies de *Candida*, dentre eles podemos destacar a capacidade de formar biofilmes em dispositivos médicos implantados, como cateteres e sondas (LOHSE et al. 2018; NETT, 2016; NOBILE e JOHNSON, 2015). Os biofilmes são comunidades microbianas aderidas irreversivelmente a uma superfície, inerte ou tecido, incorporadas por uma matriz extracelular que fornece proteção frente a agentes externos (PEREIRA et al., 2021; CAVALEIRO e TEIXEIRA, 2018; LOHSE et al. 2018; WALL et al., 2019). Essas comunidades têm sido associadas a falhas na terapia antifúngica, uma vez que podem suportar até 8x a concentração inibitória planctônica (CAVALEIRO e TEIXEIRA, 2018). A literatura descreve que essa resiliência ocorre na fase inicial de desenvolvimento dos biofilmes, aumentando sua atividade metabólica e tolerando elevadas concentrações de fármacos (ALEM et al. 2006). Cepas de *Candida* spp. podem formar biofilmes contendo células persistentes (CP) metabolicamente inativas, dificultando a erradicação dessas comunidades e aumentando a complexidade do manejo terapêutico de pacientes acometidos por esses microrganismos (KOVACS e MAJOROS, 2020; LA FLEUR et al., 2006).

As CP são subpopulações presentes nos biofilmes, responsáveis por sobreviver em situações de estresse com baixa disponibilidade de nutrientes (FRAIHA et al., 2019; WUYTS, DIJCK e HOLTAPPELS, 2018). Além disso, surgem como um possível mecanismo adaptativo, permanecendo dormentes ao serem expostas aos antifúngicos que induzem ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (WUYTS, DIJCK e HOLTAPPELS, 2018). Ao interromper a exposição ao antifúngico, as CPs podem ser

reativadas, iniciando uma nova infecção em hospedeiro suscetível (DEL POZO, 2018; SILVA et al., 2017; POLKE, HUBE, JACOBSEN, 2015; AL-DHAHERI e DOUGLAS, 2008; LA FLEUR et al., 2006). Acredita-se, portanto, que as CPs podem contribuir para a patogênese de diversas infecções, requerendo tratamento prolongado e apresentado elevado risco para pacientes com imunocomprometimento (WUYTS, DIJCK e HOLTAPPELS, 2018; BOJSEN, REGENBERG e FOLKESSON, 2017; COHEN, LOBRITZ e COLLINS, 2013).

As candidemias afetam aproximadamente 750 mil pessoas anualmente, com taxa de mortalidade de 40 a 50% (BONGOMIN et al., 2017). São apontados diversos fatores de risco para o surgimento das candidemias: neutropenia, uso de corticosteroides, diálise, nutrição parenteral, uso de cateteres venosos centrais, ruptura da barreira gastrointestinal induzida por quimioterapia ou cirurgia abdominal, internações prolongadas em UTI e exposição a agentes antibacterianos de amplo espectro (LOPES e LIONAKIS, 2022; THOMAS-RUDEL et al., 2021; SANGUINETTI et al., 2019; PAPPAS et al., 2018; LOHSE et al., 2018). A disbiose induzida pelo uso de antibióticos é conhecida como o principal motivo para o surgimento das candidemias oportunistas. Tais perturbações alteram o microbioma e a integridade da barreira epitelial das mucosas, favorecendo o crescimento, colonização e propagação por *Candida* spp. (TAN et al., 2021; ZHAI et al., 2020; MCCARTY e PAPPAS, 2016; VAUTIER et al., 2015; BASSETTI et al., 2010).

Todavia, estudos conduzidos pelo nosso grupo mostraram que os antibacterianos também podem estimular diretamente o crescimento e a virulência de patógenos fúngicos (CORDEIRO et al., 2021a; CORDEIRO et al., 2021b; CORDEIRO et al., 2019; CORDEIRO et al., 2018), o que poderia ter repercussões durante o processo infeccioso. Nesse contexto, investigou-se a influência dos antibacterianos comumente usados no tratamento e/ou prevenção de infecções no ambiente hospitalar sobre a formação dos biofilmes e produção de células persistentes de *C. albicans* isoladas de fungemia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS (IFI)

As infecções fúngicas invasivas (IFIs) têm emergido nas últimas décadas como um importante causador de enfermidades em humanos. As IFIs são geralmente distinguidas com base no envolvimento de sangue e outros locais estéreis do corpo ou por invasão nos tecidos e órgãos. Além disso, é referida como uma infecção fúngica grave, profunda e sistêmica (WEEB et al., 2018; PFALLER e DIEKEMA, 2010; HOBSON, 2003). Embora as micoses superficiais sejam responsáveis por grande parte da prevalência global de infecção fúngica, as IFIs são consideradas importantes problemas de saúde mundial, sendo relacionadas a índices de mortalidade de até 90% em pacientes imunocomprometidos (WEEB et al., 2018; MARIETTE et al., 2017; HAHN-AST et al., 2010).

Estima-se que aproximadamente 1,9 milhões de pacientes desenvolvam uma IFI a cada ano (TERRERO-SALCEDO e POWERS-FLETCHER, 2020; BONGOMIN et al., 2017). Ademais, além do custo humano dramaticamente representado pela elevada morbimortalidade (RUHNKE et al., 2018), o manejo clínico-terapêutico das IFIs envolve custos elevados, com grandes repercussões econômicas. Somente nos Estados Unidos, uma análise realizada em 2017 estimou o custo médico total das hospitalizações por doenças fúngicas em 4,6 bilhões de dólares, aproximadamente 22,1 bilhões de reais. As infecções por *Candida* spp. foram as responsáveis pela maior parte das internações e custos totais, representando 26.735 hospitalizações e custo total de 1,4 bilhão de dólares (6,8 bilhões de reais) (TERRERO-SALCEDO e POWERS-FLETCHER, 2020; BENEDICT et al., 2019).

Espécies de *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus*, são os principais isolados em IFIs, podendo ocasionar quadros graves com índices de mortalidade variando de 20 à 50%, apesar de potentes antifúngicos estarem disponíveis para o tratamento (PAPON, BOUGNOUX, D'ENFERT, 2020; ZILBERBERG et al., 2018; PAPPAS et al., 2018). Esses gêneros raramente ocasionam infecções graves em pacientes imunocompetentes, porém, em pacientes com sistema imunológico debilitado, são considerados oportunistas e responsáveis por ocasionar IFIs (PAPON, BOUGNOUX, D'ENFERT, 2020; VON LILIENFELD-TOAL et al., 2019).

As infecções da corrente sanguínea ocasionadas por leveduras do gênero *Candida* (denominada como candidemia) são particularmente temidas em pacientes

imunocomprometidos, como por exemplo aqueles que estão em uso de quimioterapia ou transplantados. As espécies de *Candida* são amplamente distribuídas no ambiente, além de fazerem parte da microbiota humana. No entanto, é bem estabelecido que as alterações na microbiota, principalmente imunossupressão, prejudicam a integridade da barreira epitelial, favorecendo o crescimento e disseminação por *Candida* spp. (TAN et al., 2021; PAPON, BOUGNOUX, D'ENFERT, 2020; ZHAI et al., 2020; MCCARTY e PAPPAS, 2016; VAUTIER et al., 2015).

A falha em diagnosticar adequadamente as IFIs aumentam o ônus econômico, contribui para as elevadas taxas de mortalidade, apresentam um efeito substancial sobre o uso de drogas antimicrobianas de amplo espectro e favorecem a resistência bacteriana. Portanto, há uma necessidade de melhorar o manejo relacionado aos testes diagnósticos e tratamento das IFIs, reduzindo o uso inadequado de antibacterianos, hospitalizações prolongadas e favorecendo o prognóstico dos pacientes (TERRERO-SALCEDO e POWERS-FLETCHER, 2020; DENNING et al., 2017; DENNING, 2015).

2.2.CANDIDEMIA

A candidíase é um termo abrangente que se refere a infecções causadas por espécies do gênero *Candida*, podendo acometer o tecido cutâneo, mucosas e órgãos. Entretanto, a candidíase invasiva refere-se a infecções de sítio profundos, como sangue (candidemia), abscesso intra-abdominal, peritonite (inflamação do peritônio, o tecido que reveste a parede interna do abdômen e órgãos abdominais) ou osteomielite (infecção dos ossos, com ou sem candidemia) (PAPPAS et al., 2018). A candidemia é uma das principais causas de IFIs associadas aos cuidados de saúde nos Estados Unidos (ROSSOW et al., 2020; MAGILL et al., 2018). Além disso, é considerada uma infecção emergente amplamente reconhecida como uma das principais causas de morbidade e mortalidade no ambiente de assistência à saúde (THOMAS-RUDDEL et al., 2022; PAPPAS et al., 2018; CLEVELAND et al., 2015; MAGILL et al., 2014).

Pelo menos 15 diferentes espécies de *Candida* foram relatadas como causadoras de infecções invasivas em humanos (MEDEIROS et al., 2019; PAPPAS et al., 2018; PAPPAS et al., 2016; GUINEA, 2014; YAPAR, 2014; PFALLER e DIEKEMA, 2007). Embora *C. albicans* ainda permaneça como o principal agente de infecções fúngicas

hospitalares, as espécies de *Candida* não-*Candida albicans*, também são responsáveis pelo aumento da incidência de infecções invasivas (CORTEGANI MISSERI, e CHOWDHARY, 2019; CORTEGANI et al., 2018; CHOWDHARY; SHARMA e MEIS, 2017). Entretanto, é importante relatar, que em certas partes do mundo, um organismo anteriormente raro, *Candida auris*, emergiu como um importante causador de infecções (PAPPAS et al., 2018; CHOWDHARY et al., 2017; LOCKHART et al., 2017).

A levedura *C. auris* é um patógeno fúngico emergente e multirresistente que ocasionou surtos infecciosos em mais de 45 países, levando a taxas de mortalidade intra-hospitalar de até 72% (CORTEGANI et al., 2018). A principal razão pela qual *C. auris* tem estado em destaque, é a sua notória resistência antifúngica e conseqüentemente o surgimento de infecções crônicas de pior prognóstico (BANDARA e SAMARANAYAKE, 2022). Devido sua rápida disseminação na última década, o *Disease Control and Prevention* (CDC), *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) e *Public Health England* lançaram em 2016 e 2017 um alerta clínico referente a ameaça global de *C. auris* pan-resistente (BANDARA e SAMARANAYAKE, 2022; PHE, 2017; CDC, 2016).

As candidemias afetam aproximadamente 750 mil pessoas anualmente em todo o mundo, com taxa de mortalidade de 40 a 50% (TAN et al., 2021; BONGOMIN et al., 2017). A colonização por *Candida* spp. é considerada um pré-requisito para o surgimento da infecção, tendo em vista que uma colonização aumentada em conjunto com uma falha no sistema imunológico do hospedeiro, favorece o crescimento, colonização e disseminação do microrganismo (MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021; PAPPAS et al., 2018). Além disso, são apontados diversos fatores de risco para o surgimento das candidemias: neutropenia, uso de corticosteroides, diálise, nutrição parenteral, uso de cateteres venosos centrais, ruptura da barreira gastrointestinal induzida por quimioterapia ou cirurgia abdominal, internações prolongadas em UTI e exposição a agentes antibacterianos de amplo espectro (LOPES e LIONAKIS, 2022; THOMAS-RUDEL et al., 2022; LOHSE et al., 2018; PAPPAS et al., 2018).

Os principais desafios para o manejo da candidemia incluem a prevenção, diagnóstico precoce e início rápido na terapia antifúngica sistêmica. Devido à ausência de testes diagnósticos rápidos para candidíase invasiva, a maioria dos médicos contam com culturas fúngicas de rotina e evidências empíricas (por exemplo, febre inexplicada ou sepse em paciente na unidade de terapia intensiva (UTI) com exposição prévia a agentes

antibacterianos, uso de cateter venoso central e cirurgia abdominal recente) para estabelecer um diagnóstico. Essa abordagem pode levar ao uso desnecessário de antifúngicos em indivíduos sem candidíase invasiva e demora na intervenção com terapia antifúngica eficaz para aqueles que estão infectados. Esses atrasos no diagnóstico precoce e tratamento adequado, podem levar a resultados clínicos graves, com piora do prognóstico e aumento no índice de mortalidade (PAPPAS et al., 2018).

2.3.O GÊNERO *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales e família Saccharomycetacea (LEVETIN et al., 2016; CHAY, DENNING e WARN, 2010). São leveduras ubíquas que podem ser isoladas do ambiente e da microbiota dos homens e animais (CORDEIRO et al., 2015; GOUBA e DRANCOURT, 2015; VADKERTIOVÁ e SLÁVIKOVÁ, 2006). No homem, *Candida* spp. são encontrados como comensais da pele e dos tratos gastrointestinal, geniturinário e respiratório superior (D'ENFERT et al., 2021; SAFAVIEH et al., 2017; CAUCHIE et al., 2017; KRAUSE et al., 2016; MERSEGUEL et al., 2015; UNDERHILL e ILIEV, 2014; PAPON et al., 2013). Entretanto, quando o sistema imunológico do hospedeiro está debilitado, essas leveduras podem passar do estado comensal para o estado parasitário, causando desde infecções cutâneas até infecções invasivas (MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021; PAPPAS et al., 2018); SINGH; FATIMA e HAMEED, 2015).

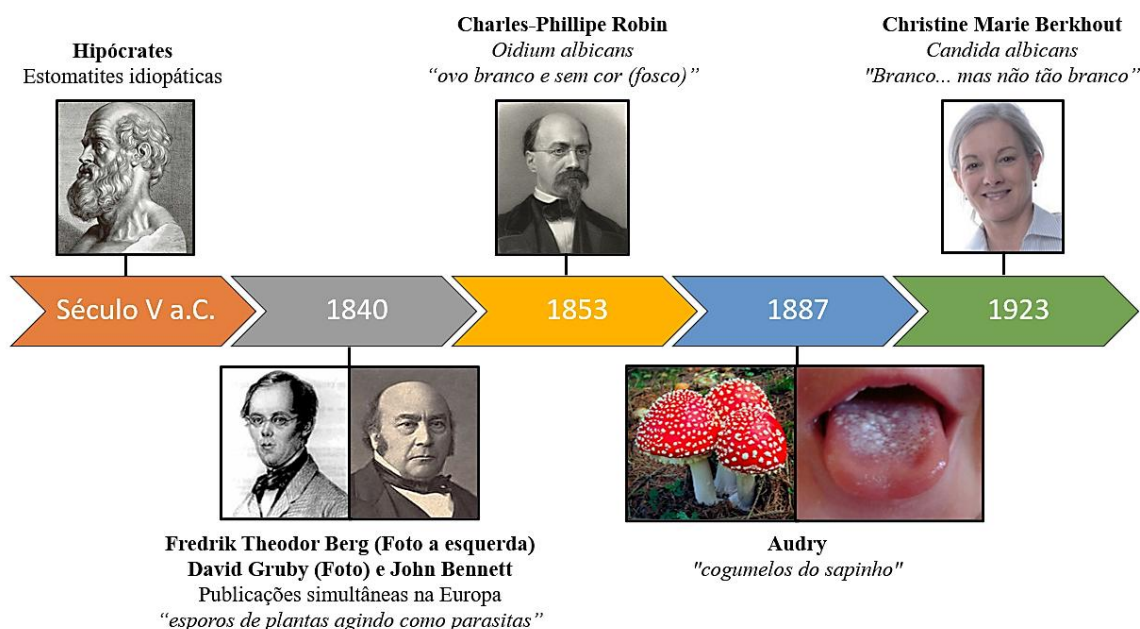
Foram catalogadas mais de 200 espécies de *Candida*, sendo que aproximadamente 30 destas espécies são mais frequentemente isoladas como causadoras de infecções em humanos (MERSEGUEL et al., 2015; BRANDT e LOCKHART, 2012). Dentre essas espécies, destacam-se *C. albicans*, Complexo *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, responsáveis por cerca de 95% das infecções (PAPPAS et al., 2018; SAFAVIEH et al., 2017; POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015; YAPAR, 2014).

2.3.1. Aspectos históricos

A história da candidíase (**Figura 1**) começou com o médico grego Hipócrates em meados do século V a.C., descrevendo a presença de estomatites (aftas), porém sem causa aparente. Na segunda metade do século XIX, os fungos foram negligenciados como

contaminantes sem relevância para a saúde. No entanto, em 1840 a busca pelo agente etiológico de placas esbranquiçadas na cavidade oral, muito comum em recém-nascidos, colocou as leveduras em evidência (LEDERMANN, 2017). Diante disso, Fredrik Theodor Berg, David Gruby e John Bennett publicaram simultaneamente seus trabalhos na Europa, todos confundindo o agente causador desconhecido com “esporos de plantas agindo como parasitas” (BARNETT, 2008; BENNET, 1844; GRUBY, 1842; BERG, 1841). Entretanto, quatro décadas depois, o francês Audry, referiu-se, com razão, aos "cogumelos do sapinho" (LEDERMANN, 2017; AUDRY, 1887).

Figura 1 – História da candidíase



Fonte: Adaptado de LEDERMANN, 2017 e BARNETT, 2008.

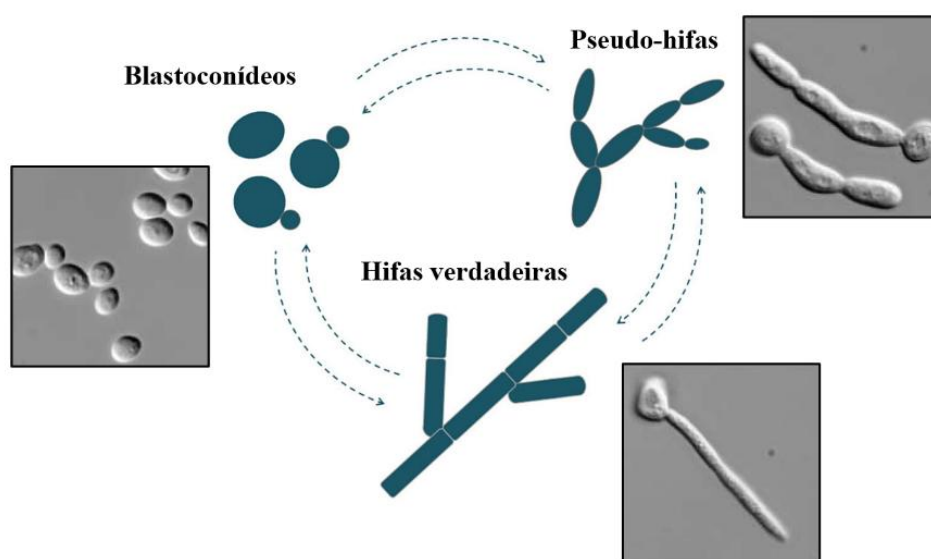
Em 1853, veio a descrição decisiva pelo médico francês Charles-Phillipe Robin, descrevendo de forma clara, extensa e precisa, a biologia do fungo e nomeando o agente causador como *Oidium albicans*. O nome é derivado do latim que significa “ovo branco e sem cor (fosco)” (BARNETT, 2008; OIDIUM, 1990; ROBIN, 1853). Outros estudiosos tentaram mover as espécies de *albicans* para o gênero *Sacharomyces*, até com relativo sucesso por um limitado período. Porém, em meados do século XX, a micologista holandesa Christine Marie Berkhout (1893-1936) apresentou sua tese de doutorado na Universidade de Utrecht (Países baixos da Europa) em 1923, descrevendo em detalhes o gênero que

chamou de *Candida*, do latim *Candidus*, que significa "branco brilhante". Diante disso, os isolados passaram a ter um nome latino iterativo de *Candida albicans*, que significa "branco-branco". Talvez, com um fino senso de humor, ela tenha combinado as palavras para reforçar o seu significado, porque "*Candida*" significa um branco brilhante e "*albicans*" um branco fosco, dizendo "Branco... mas não tão branco" (LEDERMANN, 2017).

2.3.2. Aspectos morfofisiológicos

As espécies de *Candida* são leveduras pleomórficas que microscopicamente se apresentam na forma de blastoconídeos, pseudo-hifas e/ou hifas verdadeiras (**Figura 2**) (TALAPKO et al., 2021). Os blastoconídeos são células arredondadas ou ovais, medindo de 2 a 5 µm, que se dividem por brotamento ou fissão binária (TALAPKO et al., 2021; CHEN et al., 2020; WALKER e WHITE, 2017; JAYATILAKE, 2011; MOLERO et al., 1998). Já as pseudo-hifas, representam a forma de crescimento entre leveduras e hifas, formando cadeias de brotamentos alongados, caracterizados pelas constrições em seus septos (KIM e SUDBERY, 2011). As hifas de *C. albicans* são mais delgadas que as pseudo-hifas, formam-se a partir de um processo de invaginação e alongamento contínuo do tubo germinativo (BERMAN, 2006).

Figura 2 – Aspectos morfológicos de *Candida* spp. (blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas verdadeiras)

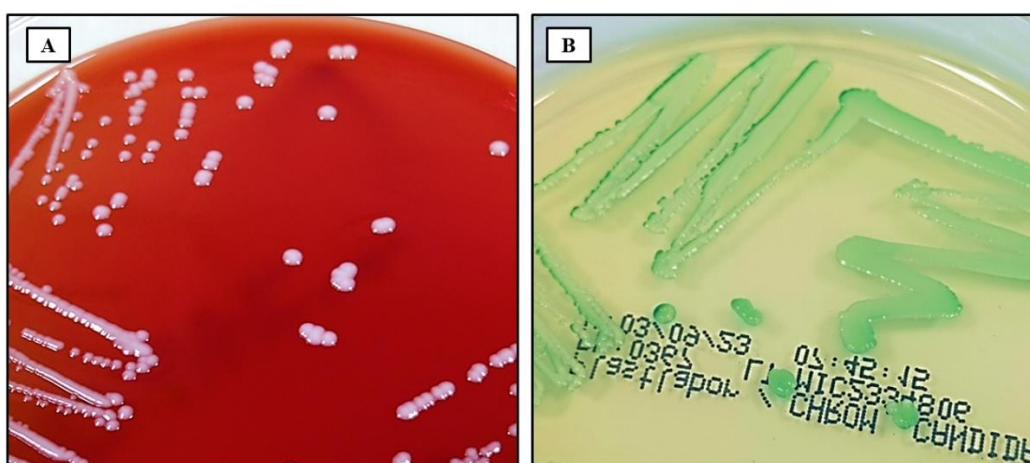


Fonte: Adaptado de TALAPKO et al., 2021 e WIGHTMAN et al., 2004.

As hifas podem promover dano tecidual por ação mecânica, além de possuírem maior resistência à fagocitose (SILVA et al., 2012). Entretanto, o blastoconídeo apresenta maior facilidade para disseminação sistêmica. Essas mudanças morfológicas são estimuladas por sinais ambientais que se assemelham às condições de crescimento desfavoráveis ou presença de um ambiente hostil (LIM et al., 2012). Os principais fatores que favorecem o surgimento de hifas são: temperaturas elevadas, ausência de nutrientes, variações nas concentrações de CO₂ e O₂, e contato com as superfícies físicas. Porém, temperaturas baixas, pH ácido e concentrações elevadas de glicose, favorecem a forma de blastoconídeos (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015).

As colônias de *C. albicans* crescem em temperatura ambiente (25 a 30 °C), atingindo a maturidade em até três dias (24 a 72 horas). Em meios de cultura sólido, seu crescimento é observado com textura glabra e relevo convexo, apresentando coloração branco-amarelado no verso e reverso (**Imagem 3A**) (SIDRIM e ROCHA, 2004). Nos meios de cultura contendo substratos cromogênicos específicos para *Candida* spp. (CHROM *Candida*®) é possível observar as colônias de *C. albicans* com coloração esverdeada (**Imagem 3B**), auxiliando com uma identificação presuntiva e triagem (MIMICA et al., 2009; BOUCHARA et al., 1996).

Figura 3 – Colônias de *Candida* spp. isoladas de hemocultura



Fonte: Autor.

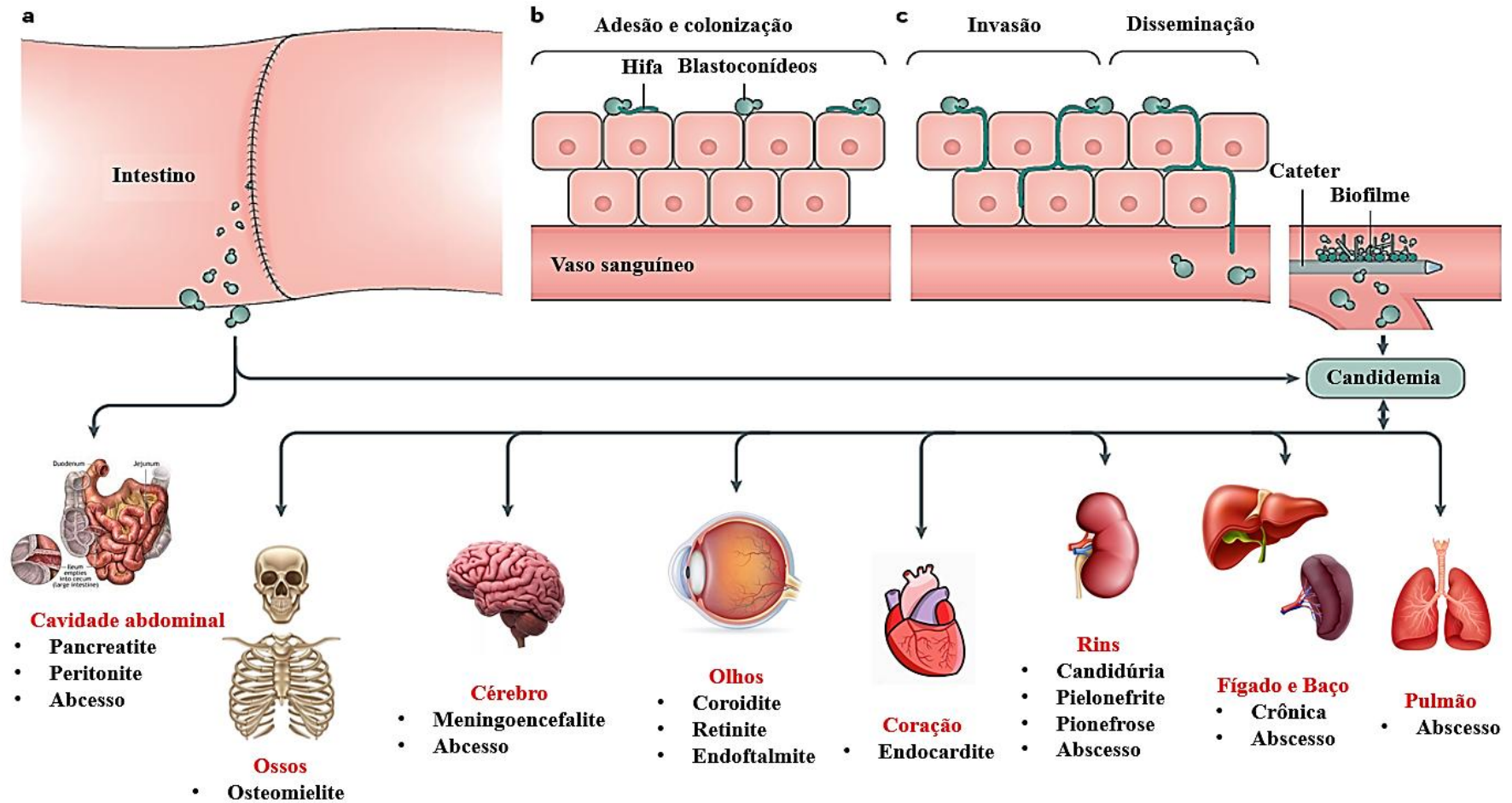
Nota: Crescimento em Ágar Sangue (a) e CHROM *Candida*® (b).

2.3.3. Patogênese e fatores de virulência

As alterações na microbiota, bem como o enfraquecimento do sistema imune do hospedeiro, favorecem os fatores de virulência presentes nas espécies de *Candida*, levando à sua transição da forma comensal para forma oportunista. Existem três condições do hospedeiro principais que predisõem à infecção invasiva: uso prolongado e repetitivo de antibióticos de amplo espectro, ruptura das barreiras de proteção (gastrointestinais e cutâneas) e imunossupressão (PAPPAS et al., 2018; FAN et al., 2015; KULLBERG e ARENDRUP, 2015; GOW et al., 2011).

O uso prolongado e repetitivo de antibióticos de amplo espectro, confere uma vantagem seletiva frente às bactérias presentes na microbiota intestinal. As bactérias exercem um fator competitivo, induzindo a liberação de anticorpos, fatores de proteção da mucosa intestinal e auxiliando no controle populacional das espécies de *Candida* (PAPPAS et al., 2018; MCCARTY e PAPPAS, 2016; KULLBERG e ARENDRUP, 2015; POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015). A eliminação da microbiota bacteriana induzida por antibacterianos, removem os fatores de proteção, favorecendo a adaptação, crescimento e disseminação por *Candida* spp. Outro fator predisponente é a quebra das barreiras gastrointestinais e cutâneas, podendo ser induzida por inflamação, cirurgia gastrointestinal e/ou uso de cateteres venosos centrais, que coletivamente possibilitam o acesso à corrente sanguínea. Por fim, mas não menos importante, podemos citar a imunossupressão (TAN et al., 2021; ZHAI et al., 2020; MCCARTY e PAPPAS, 2016; VAUTIER et al., 2015; SAMONIS et al., 2013; BASSETTI et al., 2010). A neutropenia induzida por quimioterapia para tratamento de neoplasias ou terapia com corticosteroides, prejudicam as defesas imunes inatas nos tecidos e, assim, facilitam a infecção e invasão por *Candida* spp. na corrente sanguínea, podendo afetar órgãos como fígado, baço, rins, coração, pulmão, ossos e cérebro (**Figura 4**) (PAPPAS et al., 2018; MCCARTY e PAPPAS, 2016; KULLBERG e ARENDRUP, 2015).

Figura 4 – Patogênese da candidíase invasiva



Fonte: Traduzido e adaptado de PAPPAS et al., 2018.

Nota: Trato gastrointestinal (a), Adesão e colonização por *Candida* spp. (b) e Invasão e disseminação (c).

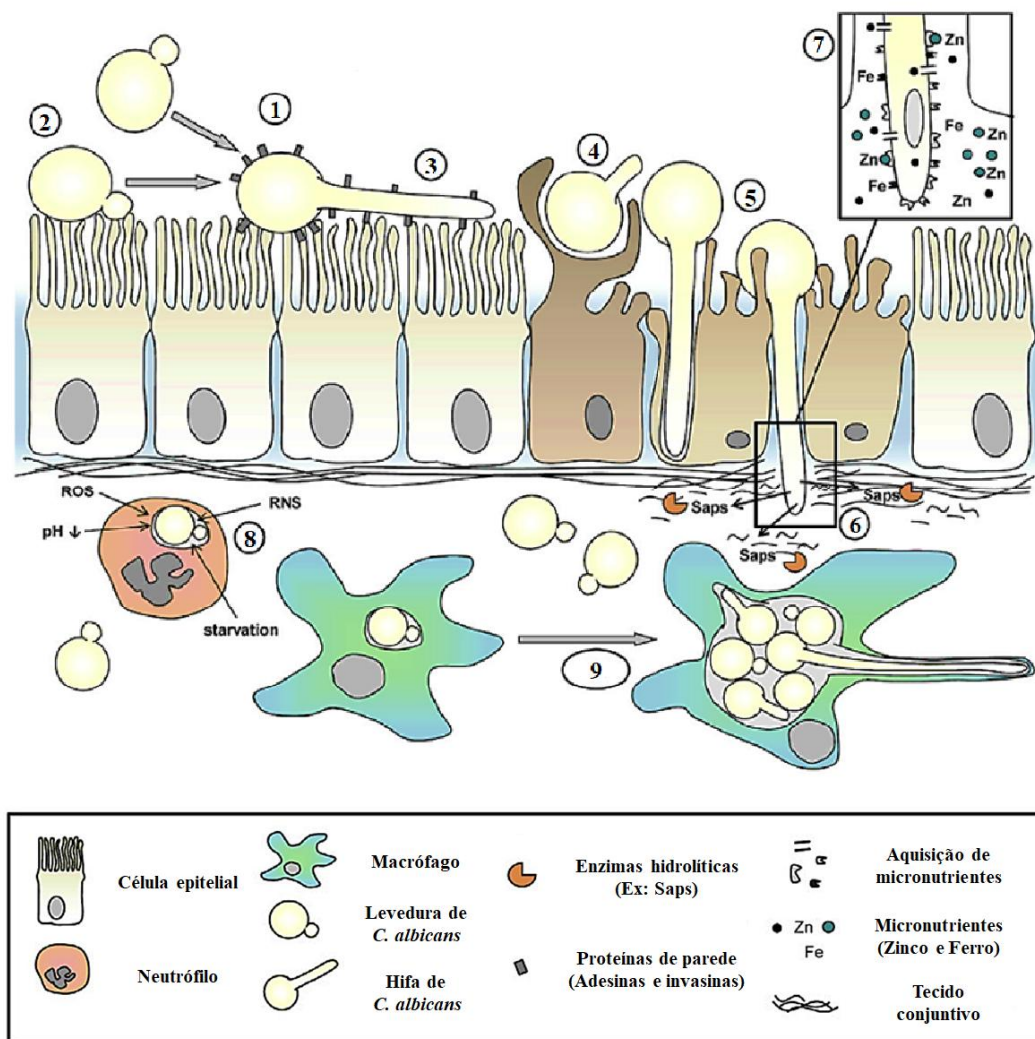
C. albicans passa por diversos desafios quando entra em contato com as células do hospedeiro. Dentre eles podemos destacar as barreiras microbianas (competição por sítios de adesão, nutrientes e contato com moléculas inibidoras de *quórum sensing*), barreiras mecânicas (muco, tecido epitelial e fluxo de fluidos, principalmente nos vasos sanguíneos), sistema imune do hospedeiro (neutrófilos e macrófagos) e por fim, os estresses físicos e químicos encontrados, como as mudanças de pH, escassez de nutrientes, espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) (POLKE, HUBE e JACOBSEN, 2015). Diante disso, e buscando superar as adversidades encontradas durante o processo de colonização, *C. albicans* apresenta uma ampla variedade de fatores de virulência (**Figura 5**), que eventualmente favorecem o processo de infecção (LIM et al., 2021; PAPPAS et al., 2018; POLKE, HUBE e JACOBSEN, 2015).

Um dos principais fatores de virulência de *C. albicans* é sua capacidade de alternar entre as formas de crescimento de blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas. As hifas são invasivas e podem penetrar nas barreiras da mucosa do hospedeiro, escapando das células fagocíticas e favorecendo a disseminação de leveduras pela corrente sanguínea (LOPES e LIONAKIS, 2022; TAN et al. 2021). Vários estímulos ambientais afetam o estado morfológico de *C. albicans*, incluindo a temperatura do hospedeiro, pH, disponibilidade de nutrientes ou mecanismos de detecção de *quórum-sensing*. Além disso, *C. albicans* secreta uma variedade de enzimas que favorecem a infecção invasiva, incluindo aspartil proteases e fosfolipases, importantes na aquisição de nutrientes extracelulares, dano e invasão tecidual (LOPES e LIONAKIS, 2022; PAPPAS et al., 2018; GABRIELLI et al., 2016).

A aspartil protease (Sap) é uma hidrolase composta por dez membros, alguns dos quais são secretados (Sap1-8) e alguns permanecem ligados à superfície celular (Sap9-10). Foi demonstrado que a secreção de Saps desempenham papéis *in vitro* e *in vivo*, induzindo danos às células epiteliais, promovendo assim a virulência fúngica, o recrutamento de neutrófilos e a indução de respostas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF- α (LOPES e LIONAKIS, 2022; LIM et al., 2021; BRYAN e DEL POETA, 2016; PERICOLINI et al., 2015). As fosfolipases são secretadas extracelularmente e agem na ruptura das membranas celulares do hospedeiro. As lipases (Lip) também são compostas por dez membros (Lip1-10) de hidrolases, e já demonstraram um papel importante na

virulência para o surgimento da candidíase invasiva. (LOPES e LIONAKIS, 2022; GACSER et al., 2007).

Figura 5 – Estratégias de sobrevivência de *Candida albicans*



Fonte: Traduzido e adaptado de POLKE, HUBE e JACOBSEN, 2015.

Nota: (1) Flexibilidade morfológica; (2) Filamentação induzida por contato; (3) Expressão de adesinas associada a hifas; (4) Invasão em células hospedeiras por endocitose induzida ou penetração ativa (5); (6) Liberação de enzimas hidrolíticas, por exemplo, secreção de aspartil protease (Saps) que suportam a penetração e a degradação do material tecidual; (7) Aquisição de nutrientes e micronutrientes de células hospedeiras, por exemplo, sistemas de absorção de zinco e ferro; (8) Vias de resposta ao estresse que facilitam a resistência a condições ambientais adversas, por exemplo, espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS), baixo pH e escassez de nutrientes; (9) modificação ativa do fagossoma para promover o crescimento das hifas, facilitando o dano tecidual e a fuga dos macrófagos.

Uma toxina secretada por *Candida* spp. e que vem sendo abordada com frequência pela literatura, é a candidalísina, uma toxina peptídica citolítica responsável por

induzir danos às células epiteliais. Em altas concentrações, candidalisina interage com a membrana celular para formar estruturas semelhantes a poros, gerando influxo de cálcio, estresse oxidativo e resultando na morte celular por necrose (BLAGOJEVIC et al., 2021; NAGLIK, GAFFEN e HUBE, 2019; MOYES et al., 2016). No entanto, seu papel na colonização, invasão de mucosas para a corrente sanguínea e desenvolvimento de infecções profundas, não está bem estabelecida em *Candida* spp. (PAPPAS et al., 2018; MOYES et al., 2016). Um possível mecanismo de proteção imune frente aos danos prolongados por candidalisina, envolve a neutralização da toxina por meio de interações hidrofóbicas com a albumina. A albumina é uma proteína sérica abundante, mas também é excretada nas superfícies das mucosas e entra nos tecidos quando a inflamação aumenta a permeabilidade vascular. Durante a inflamação, os níveis séricos de albumina diminuem drasticamente, e baixos níveis de albumina estão associados a um pior prognóstico do paciente (AUSTERMEIER et al., 2021).

Outro importante fator de virulência presente em *Candida* spp. é sua capacidade de adaptação metabólica e aquisição de nutrientes. A glicose é a fonte de carbono preferida para *C. albicans*, porém na maioria dos locais de colonização, o crescimento fúngico ocorre em condições limitantes de glicose. Nessas circunstâncias, *C. albicans* se adapta regulando positivamente as vias alternativas de utilização de carbono, usando o lactato como fonte de energia (WILLIAMS e LORENZ, 2020; MAN et al., 2017). Os múltiplos estresses impostos pelas células do hospedeiro e a variação do microambiente, requerem uma indução adaptativa por *Candida* spp. As células imunes inatas do hospedeiro produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), ocasionando uma explosão oxidativa para destruir patógenos microbianos invasores. Diante disso, para escapar da morte oxidativa por células do sistema imune, *C. albicans* possui seis tipos de superóxido dismutases, que estão todos envolvidos na desintoxicação celular (LOPES e LIONAKIS, 2022; POLKE, HUBE e JACOBSEN, 2015; FROHNER et al., 2009).

Muitas das adaptações de espécies de *Candida* ao estresse presente no ambiente de colonização/infecção (mudanças de pH e temperatura, variação de osmolaridade e ação dos antifúngicos) são moduladas por proteínas de choque térmico (Hsps), particularmente Hsp90 (LOPES e LIONAKIS, 2022; DANHOF et al., 2016; MIRAMON et al., 2012; LEACH et al., 2012; ENJALBERT et al., 2006). A Hsp90 é uma chaperona essencial que tem papel crucial no enovelamento de proteínas e modula as atividades de reguladores-

chave, estabilizando a célula fúngica, favorecendo a virulência e a resistência aos antifúngicos (O'MEARA, ROBBINS e COWEN, 2017). Em *Candida* spp. a interrupção de Hsp90 incluem a redução da tolerância a respostas de estresse e indução de transição morfológica de crescimento de levedura para hifa (LOPES e LIONAKIS, 2022; DANHOF et al., 2016; MIRAMON et al., 2012; LEACH et al., 2012; ENJALBERT et al., 2006).

A parede celular de *C. albicans* é composta por quitina, β -glucanos e manoproteínas, que são reconhecidos pelos padrões celulares epiteliais e imunes do hospedeiro, e são importantes para a indução de respostas pelo sistema imunológico. Para evitar a ativação de vias imunes que desencadeiam respostas do hospedeiro, as células de *C. albicans* podem minimizar sua exposição aos PAMP's (padrões moleculares associados a patógenos) modificando os componentes da parede celular em resposta a estímulos metabólicos e promovendo a evasão imune (PRADHAN et al., 2021; GOW e HUBE, 2012).

A adesão celular efetiva e invasão de *Candida* spp. nas células endoteliais e epiteliais, possibilitam sua disseminação na corrente sanguínea (SHEPPARD e FILLER, 2014). As adesinas são as principais proteínas presentes na superfície fúngica, dentre elas, podemos destacar as glicoproteínas de superfície celular (Als). As Als são tidas como as principais moléculas de adesão e invasão por *C. albicans*, sendo classificadas como o principal ligante à célula do hospedeiro (PAPPAS et al., 2018). Além disso, é descrito na literatura que a capacidade de adesão facilita a formação de biofilme em dispositivos médicos implantados (cateteres venosos centrais), representando um importante risco de candidemia a longo prazo (LIM et al., 2021; HOYER e COTA, 2016; MCCARTY e PAPPAS, 2016; POLKE, HUBE e JACOBSEN, 2015; KULLBERG e ARENDRUP, 2015). Muitos trabalhos caracterizaram os circuitos regulatórios fúngicos cruciais para a formação do biofilme, que incluem a regulação e transcrição de genes-alvo envolvidos na adesão e filamentação (PAPPAS et al., 2018; DESAI, MITCHELL e ANDES, 2014).

A capacidade de *Candida* para formar biofilme é um aspecto importante no desenvolvimento de resistência aos antifúngicos, isso ocorre por dois mecanismos diferentes (KOVACS e MAJOROS, 2020; POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015; RAMAGE et al., 2012). O primeiro é a diminuição da capacidade dos agentes antifúngicos de penetrar no biofilme, juntamente com a regulação dos mecanismos de resistência aos antifúngicos. O segundo é o desenvolvimento de células persistentes (CP). Essas células reduzem o seu metabolismo e usam uma variedade de mecanismos para lidar com o estresse reativo da

oxidase, sobrevivendo a elevadas concentrações de drogas fungicidas (MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021; NETT e ANDES, 2020; WUYTS, VAN DIJCK e HOLTAPPELS, 2018; RAMAGE et al., 2012; LAFLEUR, KUMAMOTO e LEWIS, 2006).

2.3.3.1. Biofilmes

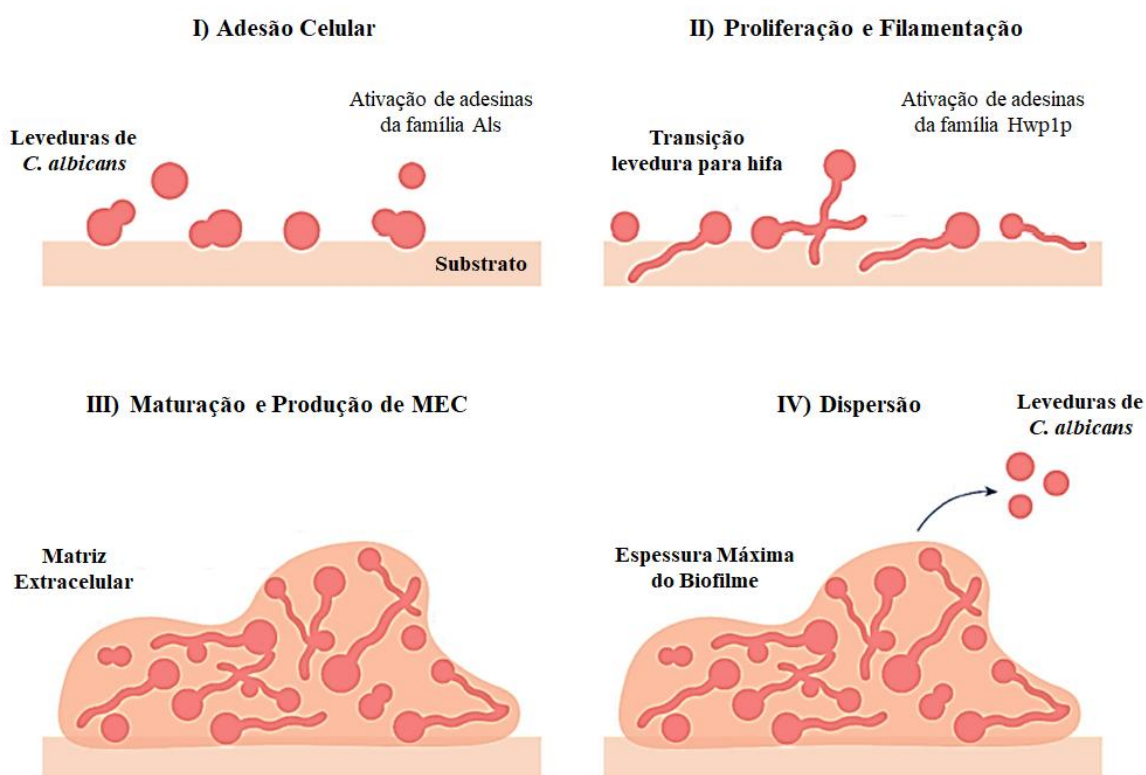
O CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) destaca que as espécies de *Candida* são as causas mais frequentes de infecções da corrente sanguínea associada a dispositivos vasculares no âmbito hospitalar (NETT e ANDES, 2020; MAGIL et al., 2014; CLEVELAND et al., 2012; PFALLER e DIEKEMA, 2007). Além disso, a capacidade de *Candida* spp. de formar biofilmes em dispositivos de importância médica, como cateteres e sondas, favorece o desenvolvimento da candidíase invasiva e candidemia (LOHSE et al. 2018; NETT, 2016; NOBILE e JOHNSON, 2015). Os biofilmes são comunidades microbianas aderidas irreversivelmente a uma superfície, inerte ou tecido, incorporadas por uma matriz extracelular polimérica (MEC) que fornece proteção frente aos agentes externos e podem servir como reservatório para infecções recorrentes (PEREIRA et al., 2021; WALL et al., 2019; CAVALEIRO e TEIXEIRA, 2018; LOHSE et al. 2018).

A transição do crescimento planctônico para o biofilme, é acompanhada por uma complexa remodelação fenotípica e alterações na expressão gênica. O desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* ocorre progressivamente, sendo tipicamente classificado em quatro estágios: I) Fixação inicial de células planctônicas; II) Proliferação e filamentação; III) Maturação do biofilme e formação da matriz extracelular polimérica (MEC), e por fim a IV) Dispersão do biofilme (**Figura 6**) (PONDE et al., 2021; KOVACS e MAJOROS, 2020; POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015; RAMAGE et al., 2012). Na fase inicial, os blastoconídeos de *C. albicans* se ligam a uma superfície (epitélios, dispositivos de importância médica implantados ou agregados celulares) por meio de adesinas, principalmente as glicoproteínas de superfície celular (família Als) (PONDE et al., 2021; NAILIS et al., 2010). Esses eventos de adesão inicial compreendem vários fatores não específicos, incluindo as interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e interações eletrostáticas. Posteriormente, as leveduras fazem a transição para hifas e expressam

adesinas específicas, como a proteína Hwp1p, importante para adesão e invasão tecidual (PONDE et al., 2021; POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015; NAILIS et al., 2010).

Dando continuidade na formação do biofilme, é observado a formação da MEC ao redor das células de *C. albicans*, fornecendo suporte estrutural, proteção frente aos antifúngicos e fuga do sistema imune do hospedeiro (NETT e ANDES, 2020; NETT, 2016). Por fim, mas não menos importante, com a maturação do biofilme as leveduras se dispersam para colonizar outras partes do corpo (KOVACS e MAJOROS, 2020; POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015; RAMAGE et al., 2012). Essas células diferem das células planctônicas iniciais, apresentando maior virulência e facilidade em formar novos biofilmes (PONDE et al., 2021; WALL et al., 2019; LOHSE et al., 2018; CAVALEIRO e TEIXEIRA, 2018; WILLIAMS et al., 2013).

Figura 6 – Etapas de formação do biofilme de *Candida albicans*



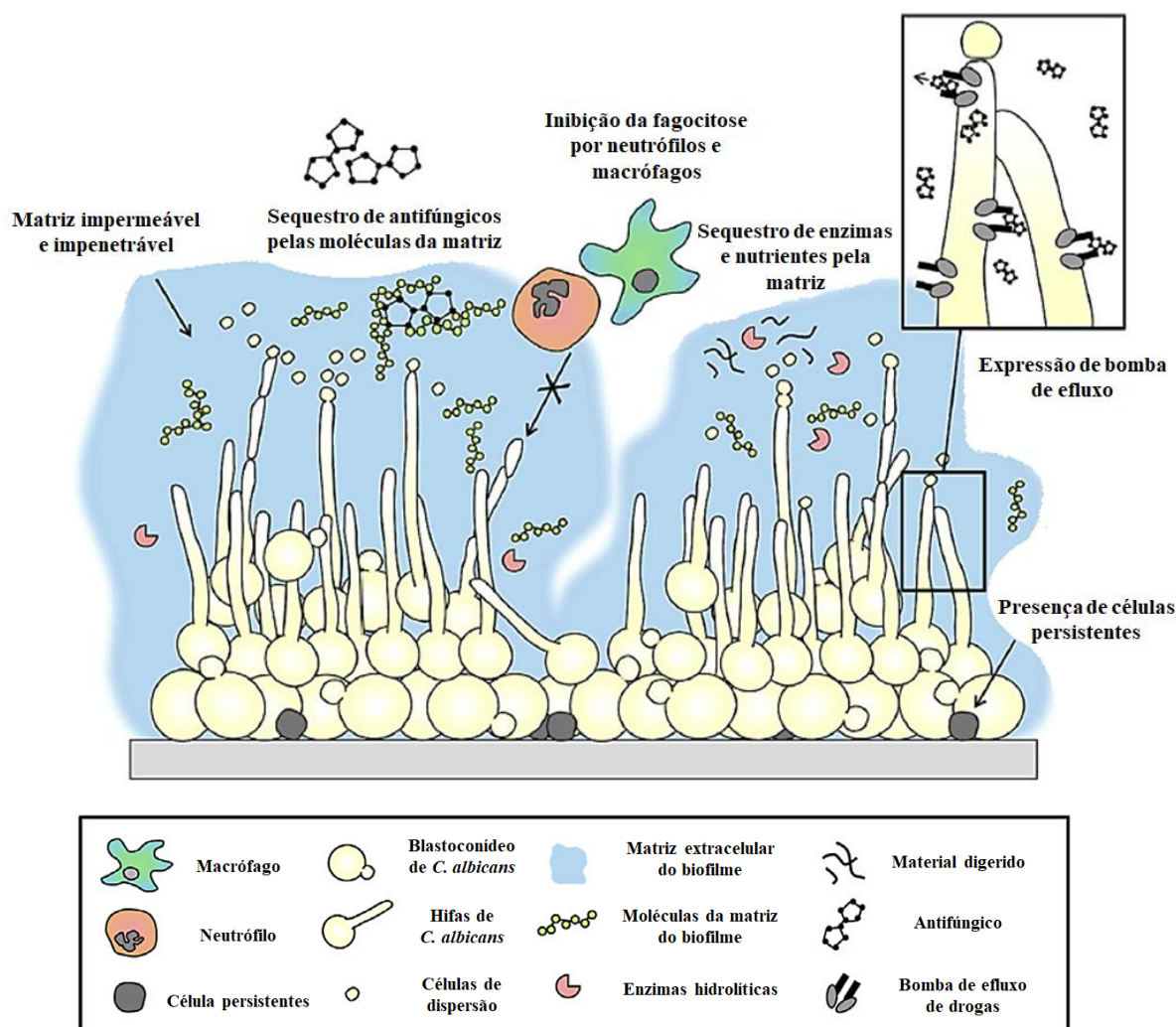
Fonte: Traduzido e adaptado de PONDE et al., 2021.

Nota: A formação do biofilme de *Candida albicans* é um processo multifatorial que consiste em quatro etapas principais: I) adesão de blastoconídeos de *C. albicans* a um substrato, II) proliferação celular e filamentação, III) maturação e produção da matriz extracelular polimérica e IV) dispersão de células do biofilme maduro.

De maneira geral, a MEC do biofilme desempenha uma barreira físico-química de proteção, impedindo a passagem de fármacos e ação das células do sistema imune do hospedeiro (NETT e ANDES, 2020; CAVALEIRO e TEIXEIRA, 2018; NETT, 2016; RAMAGE et al., 2012). Além disso, a matriz exerce um efeito quelante, sequestrando e inibindo as drogas utilizadas no tratamento, obrigando o uso de concentrações elevadas dos antibacterianos e apresentando maiores riscos aos pacientes hospitalizados (NETT e ANDES, 2020; CAVALEIRO e TEIXEIRA, 2018; POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015; RAMAGE et al., 2012). Sua constituição química é complexa, sendo formada por 55% de proteínas, 25% de carboidratos, 15% de lipídios e 5% de DNA extracelular. Apesar de serem componentes relativamente menores em biofilmes de *C. albicans*, os polissacarídeos β -1,3-glucano e β -1,6-glucano, também são componentes importantes da matriz. Juntamente com a manana, é observada uma dependência da MEC na síntese desses polissacarídeos, tendo em vista que a deleção única de genes que codificam proteínas envolvidas na produção desses três componentes, quase levou à eliminação completa do biofilme. (NETT e ANDES, 2020; CAVALEIRO e TEIXEIRA, 2018; MITCHELL et al., 2015; ZARNOWSKI et al., 2014; RAMAGE et al., 2012).

O impacto médico dos biofilmes de *C. albicans* é ressaltado por uma correlação entre a formação de biofilme, aumento da virulência e elevação nos índices de mortalidade (PONDE et al., 2021; RAJENDRAN et al., 2016; TUMBARELLO et al., 2012). Além disso, diversos mecanismos de tolerância são descritos em biofilmes maduros, dentre eles podemos destacar: a impenetrabilidade da matriz, sequestro de antifúngicos utilizados no tratamento, inibição da fagocitose por neutrófilos e macrófagos, sequestro de enzimas e nutrientes pela matriz, super expressão de bombas de efluxo e presença de células persistentes (**Figura 7**) (POLKE, HUBE e JACOBSEN, 2015). Essas comunidades sésseis são responsáveis por suportar até oito vezes a concentração antifúngica aplicada na forma planctônica (CAVALEIRO e TEIXEIRA, 2018). A literatura descreve que essa resiliência ocorre na fase inicial de desenvolvimento dos biofilmes, aumentando sua atividade metabólica e resistindo a elevadas concentrações de fármacos. Entretanto, células persistentes (CP) também têm sido observadas em biofilmes maduros, demonstrando maior tolerância frente aos antifúngicos e dificultando o tratamento clínico (KOVACS e MAJOROS, 2020; CAVALEIRO e TEIXEIRA, 2018; LA FLEUR et al., 2006).

Figura 7 – Mecanismos de resistência dos biofilmes de *Candida albicans*



Fonte: Traduzido de POLKE, HUBE e JACOBSEN, 2015.

Nota: O crescimento na forma de biofilmes, uma comunidade microbiana com estrutura tridimensional complexa, está associada a uma alta tolerância intrínseca de diversas condições estressantes, por exemplo, tratamento antifúngico, mecanismos de defesa do sistema imune do hospedeiro, estresses físicos e químicos. Alguns mecanismos de resistência importantes estão representados nesta figura.

2.3.3.2. Células persistentes

As células persistentes (CP) foram descritas pela primeira vez por Joseph Bigger em 1944 em um estudo referente ao mecanismo de ação da penicilina. Bigger observou que a penicilina lisava uma população de *Staphylococcus* spp., porém um pequeno número de células, que não eram simplesmente resistentes ao antibiótico, inevitavelmente sobrevivia. Após observar esse fenômeno, Bigger propôs que as células estavam com seu metabolismo

dormente, chamando esse grupo de CP (LEWIS, 2007; BIGGER, 1944). Em 1983, Harris Moyed realizou uma busca direcionada por genes em CP (MOYED e BERTRAND, 1983). Ele tratou uma população de *Escherichia coli* com ampicilina, então permitiu que as células sobreviventes crescessem na ausência de antibióticos. Depois de realizar inúmeros testes, dois tipos de colônias foram identificados após o plaqueamento em meio sólido; estes eram mutantes resistentes a antibióticos que cresceram na presença de ampicilina, e mutantes que produziram CP em maior frequência, mas que foram sensíveis na presença de ampicilina (WUYTS, DIJCK e HOLTAPPELS, 2018; LEWIS, 2007).

As CP são subpopulações presentes principalmente nos biofilmes, responsáveis por sobreviver em situações de estresse com baixa disponibilidade de nutrientes (FRAIHA et al., 2019; WUYTS, DIJCK e HOLTAPPELS, 2018). Além disso, surgem como um possível mecanismo adaptativo, permanecendo dormentes ao serem expostas aos antibióticos e, interrompendo sua exposição, podem se reativar, dificultando o tratamento (DEL POZO, 2018; SILVA et al., 2017; POLKE, HUBE, JACOBSEN, 2015; AL-DHAHERI e DOUGLAS, 2008; LA FLEUR et al., 2006). Após a antibioticoterapia, o biofilme é desestruturado, a maior parte das células sésseis são mortas e o sistema imunológico do hospedeiro tem a função de eliminar as células remanescentes. Entretanto, o resquício de MEC presente no biofilme protege contra as células imunes, impedindo a fagocitose, facilitando a resiliência celular e após a redução de antibiótico no meio extracelular, as CP podem repovoar o biofilme, favorecendo as infecções recidivantes (LEWIS, 2007). Além disso, as CP podem contribuir para a patogênese de diversas infecções, requerendo tratamento prolongado e apresentado elevado risco para pacientes com resposta imunológica debilitada (WUYTS, DIJCK e HOLTAPPELS, 2018; BOJSEN, REGENBERG e FOLKESSON, 2017; COHEN, LOBRITZ e COLLINS, 2013).

Hoje já é descrito que as CP podem ser encontradas em diversos microrganismos, incluindo bactérias (*Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) e fungos (*Trichosporon* spp. *Candida parapsilosis*, *C. krusei* e *C. albicans*) (CORDEIRO et al., 2021a; CORDEIRO et al., 2021b; DEFRAINE, FAUVART e MICHIELS, 2018; AL-DHAHERI e DOUGLAS, 2008; LAFLEUR, KUMAMOTO e LEWIS, 2006). Além disso, podem estar presentes em células planctônicas e em biofilmes. Entretanto, as CP de *C. albicans* foram encontradas apenas em uma cultura de biofilme e não estavam presentes em uma população planctônica. Essa

produção específica de CP em biofilme é diferente da produção observada em populações bacterianas, nas quais uma cultura planctônica contém mais persistentes do que um biofilme. Isso pode indicar que o biofilme, e não a população planctônica, é o modo de sobrevivência de vida da levedura, sendo o local de produção de células sobreviventes especializadas (WUYTS, DIJCK & HOLTAPPELS, 2018; SILVA et al., 2017; LEWIS, 2007).

2.3.4. Epidemiologia da candidemia

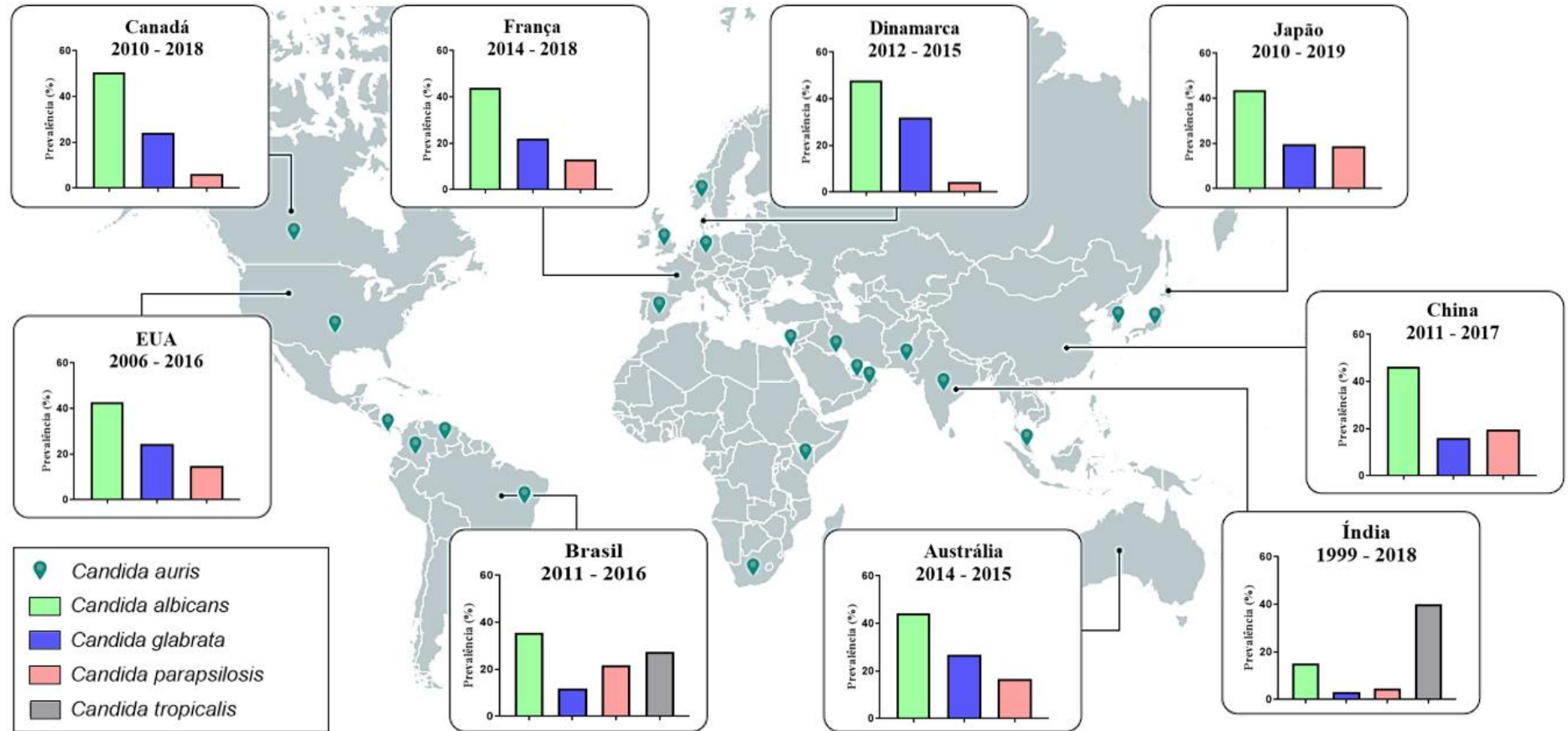
A incidência de candidemia varia com a região geográfica, idade dos pacientes e outros fatores. A maioria das grandes pesquisas nacionais relatam uma incidência de 3 a 5/100.000 pessoas da população em geral e 1 a 2% de todas as admissões em UTIs médicas e cirúrgicas (MCCARTY e PAPPAS, 2016; CLEVELAND et al., 2015). A candidemia adquirida na comunidade (isto é, não adquirida em hospital) é uma observação nova nos países desenvolvidos, refletindo um aumento na utilização de dispositivos de acesso intravenoso de longo prazo (por exemplo, cateteres centrais de inserção periférica) e terapia antimicrobiana ambulatorial parenteral (STROLLO et al., 2016; PLAYFORD et al., 2009).

A mortalidade atribuível entre todos os pacientes com candidemia foi relatada entre 10% e 47%, porém uma estimativa mais precisa é provavelmente de 10 a 20% (MCCARTY e PAPPAS, 2016). Os principais fatores de risco envolvidos no aumento da mortalidade, são: idade elevada, espécie de *Candida* responsável pela infecção (por exemplo, *C. parapsilosis* é menos virulenta que outras *Candida* spp. e geralmente está associada a menor mortalidade), uso de imunossupressores, uso prolongado de cateter venoso, tratamento antifúngico específico, disfunção renal preexistente e outras comorbidades (MCCARTY e PAPPAS, 2016; STROLLO et al., 2016; KULLBERG e ARENDRUP, 2015). O custo atribuível da candidemia é de aproximadamente 40.000 mil dólares por paciente (Aproximadamente 192.000 mil reais) (PAPPAS et al., 2018; STROLLO et al., 2016).

Candida albicans é o principal patógeno fúngico isolado (**Figura 8**) (MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021; PFALLER et al., 2019; PAPPAS et al., 2018; MCCARTY e PAPPAS, 2016; WISPLINGHOFF et al. 2004), ocupando o quarto lugar dentre os principais microrganismos identificados em sepse hospitalar nos EUA e o sétimo

agente mais isolado em hemoculturas no Brasil (WALL et al., 2019; MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021; MAGILL et al., 2018; DOI et al., 2016). Um estudo mundial de vigilância antifúngica (ARTEMIS DISK), realizado em 41 países no período de 1997 a 2007, investigou os isolados identificados geograficamente. Foi observado que *C. albicans* foi o principal isolado em infecções sistêmicas, apresentando índices de identificação em torno de 64% a 67% para as regiões da Ásia-Pacífico, Europa e África/Oriente Médio; além de 52% para América Latina e 49% para América do Norte. *Candida glabrata* ficou em segundo lugar na classificação dos isolados na América do Norte (21,1%) e em quarto na América Latina (7,4%). *C. tropicalis* foi destaque na região Ásia-Pacífico (11,7%) e América Latina (13,2%). Porém, *Candida parapsilosis* foi pouco isolado na Europa (4,2%) em comparação com a América Latina (10,3%) e América do Norte (13,6%) (GONZALEZ-LARA e OSTROSKY-ZEICHNER, 2020; GUINEA, 2014).

Figura 8 – Variações geográficas na distribuição de espécies de *Candida* causadoras de fungemia



Fonte: Traduzido e adaptado de PAPPAS et al., 2018.

Nota: Epidemiologia das candidemias ocasionadas no Brasil, Estados Unidos, Canadá, França, Dinamarca, Japão, China, Índia e Austrália.

Webb e colaboradores (2018), realizaram uma pesquisa sobre as infecções fúngicas em 22 hospitais nos Estados Unidos. Foram constatados 3.374 episódios de IFI, sendo identificados 1.862 casos de candidíase invasiva (Aproximadamente 55% dos casos totais), com incidência de 15 casos/100.000 pacientes ao ano. De acordo com o programa de vigilância antimicrobiana (SENTRY), as principais espécies isoladas entre 2006 a 2016 foram: *C. albicans* 42,7%, *C. glabrata* 24,3%, *C. parapsilosis* 14,8%, *C. tropicalis* 8% e *C. krusei* 2,9% (MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021). Um estudo retrospectivo (2011 a 2017) conduzido na China, demonstrou que o padrão de isolados clínicos em um hospital universitário, se mantém similar aos isolados nos Estados Unidos. Os dados obtidos evidenciaram que *C. albicans* continua sendo a espécie mais isolada no mundo, representando 46,3% de todos os casos de candidemia, seguido por *C. parapsilosis* 19,5%, *C. glabrata* 15,9% e *C. tropicalis* 14,6% (XIAO et al., 2019).

Um estudo realizado entre 2010 e 2018, em cinco hospitais terciários no Canadá, relataram sobre a epidemiologia da candidemia. A incidência anual de candidemia foi de 3,8/100.000 pessoas (idade mediana de 61 anos e 221/455 (47,4%) casos eram do sexo feminino). *C. albicans* foi a espécie mais comum (50,6%), seguida por *C. glabrata*, (24,0%). Nenhuma outra espécie representou mais de 7% dos casos. A taxa de mortalidade variou entre 32,2 à 48,1%, porém os índices foram independentes das espécie de *Candida* identificadas. Dos indivíduos que desenvolveram candidemia, mais de 50% morreram no ano seguinte, porém não foi evidenciado nenhum padrão de resistência incomum aos já descritos na literatura (BOURASSA-BLANCHETTE et al., 2023).

Vannini e colaboradores (2022), investigaram a epidemiologia da candidemia e as taxas de mortalidade na França durante 5 anos (janeiro de 2014 a dezembro de 2018). Foram isoladas 304 cepas de 290 pacientes (40 pacientes em 2014, 65 em 2015, 72 em 2016, 62 em 2017 e 51 em 2018). As três espécies de *Candida* mais isoladas de hemoculturas foram *Candida albicans* (44%), *Candida glabrata* (22%) e *Candida parapsilosis* (13%). A proporção de *Candida* não-*Candida albicans* diminuiu de 68% em 2014 para 45% em 2018. A mortalidade por todas as causas em trinta dias foi de 31% e diminuiu de 2014 (46%) para 2018 (18%) (VANNINI et al., 2022). Ainda na Europa, Astvad e colaboradores (2018), avaliaram os casos de candidemia entre 2012 à 2015, utilizando os dados da Vigilância Nacional de Fungemia da Dinamarca. A incidência de candidemia foi de 8,4/100.000 habitantes, ocorrendo mais em pacientes do sexo masculino

e acima de 50 anos. Conforme encontrado na França, na Dinamarca também foi observado um número maior de isolados de *C. albicans* (47,9%), seguida por *C. glabrata* (31,8%) e outras espécies: *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. parapsilosis*, cada espécie representando números inferiores a 4,3% dos isolados (ASTVAD et al., 2018).

Estudos de vigilância de longo prazo são necessários para fortalecer a epidemiologia das infecções ocasionadas por espécies de *Candida*. Diante disso, Kajihara e colaboradores (2022), realizaram um dos maiores estudos observacionais retrospectivos baseado em dados de vigilância nacional no Japão. O estudo foi conduzido entre 2010 à 2019, e foram analisados 57.001 isolados de *Candida* spp. obtidos em 2.075 hospitais, dos quais 55.580 pacientes foram diagnosticados com candidemia. A incidência geral de candidemia hospitalar foi de 836/100.000 pacientes submetidos a hemocultura. A incidência espécie-específica foi calculada para todo o período do estudo, e hemoculturas de 364/100.000 pacientes foram positivas para *C. albicans*, 163/100.000 para *C. glabrata*, 158/100.000 para *C. parapsilosis*, 56/100.000 para *C. tropicalis*, 12/100.000 para *C. krusei*, 14/100.000 para *C. guilliermondii* e 1,2/100.000 para *C. dubliniensis*. A distribuição das espécies de *Candida* isoladas dos pacientes foi: 43,6% (n = 24 864) *C. albicans*, 19,5% (n = 11 107) *C. glabrata*, 18,8% (n = 10 764) *C. parapsilosis*, 6,7% (n = 3827) *C. tropicalis*, 1,4% (n = 817) *C. krusei*, 1,7% (n = 949) *C. guilliermondii*, 0,15% (n = 82) *C. dubliniensis* e 8,1% (n = 4591) outros. Em geral, o estudo sugere que, no Japão, a distribuição das espécies de *Candida* foi quase a mesma neste período e semelhante à relatada na América do Norte e Europa (KAJIHARA et al., 2022)

Na Austrália, também foram observados dados epidemiológicos similares aos anteriormente descritos. A pesquisa ocorreu ao longo de 1 ano, entre 2014 à 2015, e os dados foram coletados a partir da vigilância laboratorial nacional para candidemia. Um total de 548 isolados foram analisados e constatados 527 episódios de candidemia. A incidência média foi de 2,41/105 habitantes, e a média de idade dos pacientes foi de 63 anos (56% dos casos ocorreram no sexo masculino). As principais espécies identificadas foram: *C. albicans* 44,4%, *C. glabrata* 26,7% e *C. parapsilosis* 16,5% (CHAPMAN et al., 2016).

Kaur e colaboradores (2020), avaliaram os casos de candidemia durante o período de 1999 a 2018, em um hospital terciário no nordeste da Índia. Durante esse período, foram processadas 602.963 amostras de sangue de pacientes com suspeita de sepse. A candidemia foi diagnosticada em 7.927 (1,31%) dos casos. Diferentemente do encontrado

em outros países, *Candida albicans* (15,2%) foi a segunda espécie mais isolada, precedida por *C. tropicalis* (40,1%). É importante frisar, que a frequência de casos aumentou significativamente no último trimestre do estudo, evidenciando o crescente número de infecções e alertando para um problema de saúde mundial (KAUR et al., 2020).

No Brasil, os dados são escassos, porém as taxas de incidência de candidemia variam de 0,58 a 42,59 por 1.000 admissões hospitalares (DA SILVA et al., 2019; MATTOS et al., 2017). Apesar dos avanços relacionados ao diagnóstico e tratamento das IFIs, as taxas de mortalidade por candidemia continuam em níveis alarmantes nos hospitais brasileiros, variando de 21 a 80% (BARRIENTOS et al., 2021; DA SILVA et al., 2019). Medeiros et al. (2019), analisaram no período de 2011 a 2016, os fatores epidemiológicos e o prognóstico das candidemias em um hospital terciário localizado no Nordeste do Brasil. Os dados demográficos e clínicos dos pacientes foram obtidos retrospectivamente pelos prontuários médicos, avaliando um total de 68 episódios de candidemia. Foi descrito uma incidência média de 2,23 episódios/1.000 internações e uma taxa de mortalidade em 30 dias de 55,9%. As espécies mais prevalentes foram *Candida albicans* (35,3%), *Candida tropicalis* (27,4%), *Candida parapsilosis* (21,6%) e *Candida glabrata* (11,8%). Entretanto, o que chamou mais atenção foram as taxas de mortalidade observadas, chegando a 61,1% para infecções ocasionadas por *C. albicans* e 100% para *C. glabrata* (DA SILVA et al., 2019; MATTOS et al., 2017).

2.3.5. Diagnóstico da candidemia

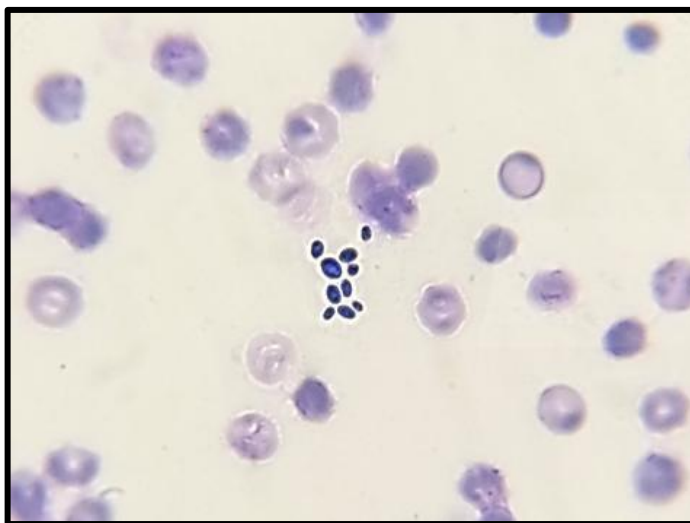
O diagnóstico da candidemia é considerado um desafio, tendo em vista que os sinais e sintomas são considerados inespecíficos. Embora os métodos microbiológicos clássicos (microscopia óptica e cultura) em geral permitam a detecção de *Candida* spp., a presença concomitante de bactérias em amostras clínicas pode superar o crescimento fúngico e dificultar o diagnóstico. Assim, se houver suspeita de candidíase invasiva, o laboratório de microbiologia deve ser avisado para utilizar meios seletivos (contendo inibidores do crescimento bacteriano) e outras opções de diagnóstico adicionais, como detecção de antígenos e testes de PCR (PAPPAS et al., 2018).

A hemocultura continua sendo o padrão-ouro para o diagnóstico da candidíase invasiva, principalmente devido ao uso de sistemas semi-automatizados: Vitek

(bioMérieux, Marcy l'Etoile, França), Phoenix (BD, New Jersey, USA) ou MicroScan WalkAway plus (Beckman Coulter, USA), que facilitam e aceleram o tempo de identificação laboratorial (CLANCY e NGUYEN, 2013). Porém, o resultado depende da frequência de amostras e do volume de sangue coletado, podendo apresentar variações de positividade entre 21 à 71% dos casos comprovados por autópsia. No entanto, é um teste de diagnóstico essencial, permitindo a identificação das espécies e realização de testes de sensibilidade aos antifúngicos (MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021; PAPPAS et al., 2016; CLANCY e NGUYEN, 2013; ARENDRUP et al., 2012).

Durante um episódio de candidemia, o número de leveduras do gênero *Candida* no sangue (**Figura 9**) é geralmente inferior a uma unidade formadora de colônia (UFC) por mL. *Candida* spp. multiplicam-se lentamente quando comparados as bactérias, fato que pode explicar o tempo prolongado para positividade (média de 2 dias) das hemoculturas. (ARENDRUP et al., 2011; PFEIFFER et al., 2011). Amostras coletadas frequentemente (uma vez ao dia, ou mais se o paciente estiver com febre), volumes maiores de hemoculturas (ideal que seja de 40 a 60 ml diários, aproximadamente 4 a 6 frascos de hemoculturas), o uso de meios seletivos e amostras antes do início da terapia antifúngica, aumentam a sensibilidade do teste e favorece o diagnóstico (PAPPAS et al., 2018; ARENDRUP et al., 2012; CATEAU et al., 2012; ARENDRUP et al., 2011; PFEIFFER et al., 2011).

Figura 9 – Blastocóndios de *Candida albicans* em hemocultura



Fonte: Autor.

O método de diagnóstico automatizado por MALDI-TOF MS (tempo de voo de ionização/dessorção a laser assistida por matriz) também pode ser utilizado para identificação das espécies de *Candida*, porém não é bem difundido na rotina laboratorial devido seu elevado investimento. É uma técnica que usa espectroscopia de massa e requer crescimento puro de um organismo em meio de cultura; portanto, a literatura descreve que esse teste não apresenta influência no tempo para o diagnóstico das candidemias (MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021). Entretanto, após crescimento, a identificação de espécies por MALDI-TOF MS ocorre em média de 10 a 15 minutos, geralmente um dia mais cedo que os métodos convencionais em laboratórios de rotina, com a diferença significativa observada principalmente para as espécies de *Candida* não-*Candida albicans* (LACROIX et al., 2014; TAN et al., 2012; MARKLEIN et al., 2009).

O uso de biomarcadores únicos ou combinados para detecção da candidíase invasiva, como: (1-3)- β -D-glucano, antígeno do tubo germinativo (*Candida albicans*), antígeno de manana, anticorpos anti-manana e detecção de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR), tem recebido atenção crescente, mas a implementação na prática clínica permanece controversa (PAPPAS et al., 2018; CLANCY e NGUYEN, 2014; CLANCY e NGUYEN, 2013). Um estudo de 2016 incluindo pacientes na UTI com condições abdominais graves, demonstrou que o desempenho para detecção combinada de antígeno manana (polissacarídeo presente na parede celular) e anticorpo anti-manana foi considerada baixa, com sensibilidade de apenas 55% (DUETTMANN et al., 2016; LEON et al., 2016). Os anticorpos estão frequentemente presentes em pacientes com sistema imunológico debilitado, com candidemia prévia ou colonização intensa por espécies de *Candida*. Essa observação e o baixo desempenho em vários estudos são advertências importantes, podendo ocasionar o tratamento antifúngico inadequado de pacientes que provavelmente não apresentem quadros de candidíase. A detecção de manana e anticorpos anti-manana não é aprovada como uma ferramenta de diagnóstico pelo FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos, porém está disponível na Europa (PAPPAS et al., 2018; DUETTMANN et al., 2016; LEON et al., 2016; VERDUYN LUNEL et al., 2009).

O β -D-glucano é um polissacarídeo presente na parede celular, podendo atuar como um marcador de infecção fúngica invasiva. Os antígenos podem ser detectados no sangue do paciente durante infecções por *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e outros fungos, com exceção da ordem Mucorales e da espécie *Pneumocystis jirovecii*. Diante disso, o teste

não consegue distinguir entre candidemia e outras infecções fúngicas (MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021; PAPPAS et al., 2018; KARAGEORGOPOULOS et al., 2013; KARAGEORGOPOULOS et al., 2011). Em sete estudos realizados entre 2011 à 2018, foi observado uma sensibilidade elevada de 76,7 a 100% para candidíase invasiva, porém sua especificidade variou entre 40 à 91,8%. No geral, os resultados obtidos na maioria dos estudos sugerem que a candidíase invasiva (incluindo candidemia) é improvável quando o resultado do teste de β -D-glucano for negativo (HARTL et al., 2018; GIACOBBE et al., 2017; LEON et al., 2016; MARTINEZ-JIMENEZ et al., 2015; TISSOT et al., 2013; HANSON et al., 2012; MOHR et al., 2011).

Outro teste de anticorpos específicos para espécies de *Candida*, é o teste de antígeno do tubo germinativo (*C. albicans*). O antígeno foi originalmente encontrado em *C. albicans*, mas o teste também detecta candidíase com outras *Candida* spp., embora apresente menor sensibilidade. Além disso, a literatura descreve que este teste apresenta maior limitação quando comparado aos outros testes citados anteriormente (antígeno manano, anticorpo anti-manano e β -D-glucano), com sensibilidade variando entre 53,3% à 74,1% e especificidade de 56,5% à 92,0% (PARRA-SANCHEZ et al., 2017; LEON et al., 2016; MARTINEZ-JIMENEZ et al., 2015; FORTUN et al., 2014).

A implementação de testes baseados em PCR para a detecção de infecções fúngicas na rotina laboratorial, estão em atraso quando comparados as infecções virais e bacterianas (PAPPAS et al., 2016; DE PAUW et al. 2008). Os principais desafios observados são: extração de DNA fúngico eficaz, baixo número de leveduras na corrente sanguínea (<1 célula/ml), semelhança entre o DNA fúngico e o DNA humano, presença de DNA fúngico no ambiente (fungos anemófilos) e na pele (microbiota) podendo levar a resultados falsos positivos. Diante disso, os testes baseados em PCR ainda não foram incorporados às diretrizes oficiais ou critérios de classificação e identificação de patologias ocasionadas por *Candida* spp. (PAPPAS et al., 2018; PAPPAS et al., 2016; DE PAUW et al. 2008).

2.3.6. Tratamento e manejo da candidemia

Além do diagnóstico precoce, a eliminação do foco da infecção e o início prévio da terapia antifúngica sistêmica, são considerados intervenções clínicas essenciais no

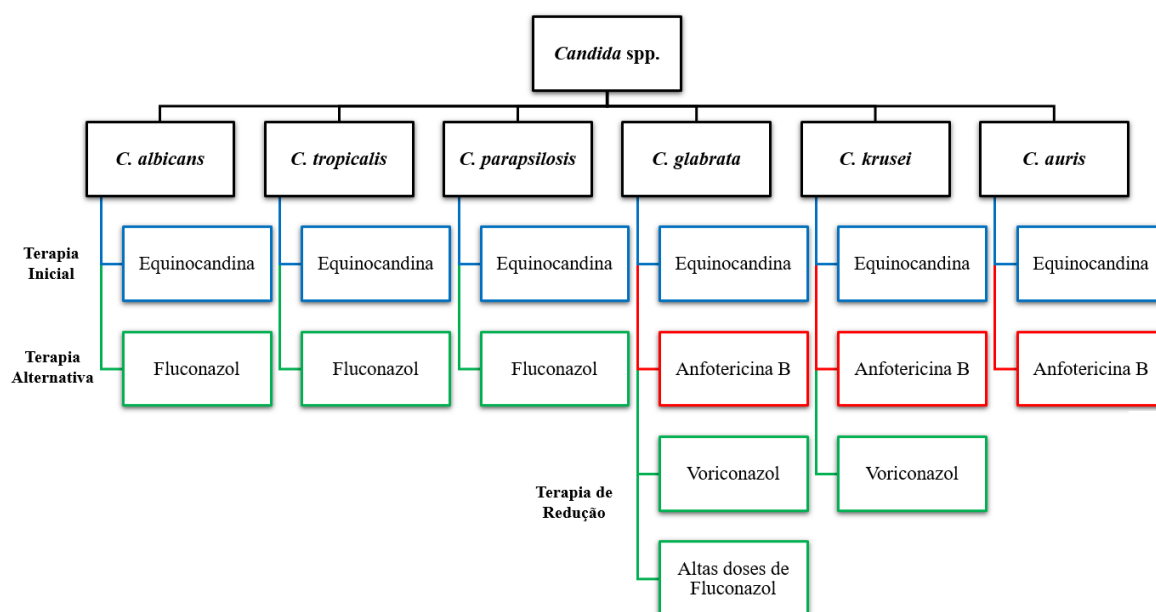
manejo das candidemias (GONZALEZ-LARA e OSTROSKY-ZEICHNER, 2020). A eliminação do foco infeccioso se refere a remoção de cateteres intravasculares contaminados, dispositivos protéticos presumidamente infectados (marca-passo cardíaco e articulações protéticas) e drenagem efetiva de líquidos serosos e exsudatos infecciosos (líquido peritoneal, pleural e/ou abscessos) (PAPPAS et al., 2018). Além disso, a terapia antifúngica precoce é crucial para o sucesso no tratamento da candidíase invasiva, pois o atraso no uso de fármacos sistêmicos eficazes, prejudica o prognóstico do paciente e aumentam os índices de mortalidade (MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021; PAPPAS et al., 2018; VERGIDIS et al., 2016; ANDES et al., 2012; KOLLEF et al. 2012).

O tratamento inicial deve ser baseado na exposição prévia ou intolerância a um agente antifúngico, gravidade da infecção, comorbidades relevantes, envolvimento do SNC, válvulas cardíacas e/ou órgãos viscerais (PAPPAS et al., 2018). As equinocandinas (anidulafungina, caspofungina ou micafungina) são consideradas a primeira linha para terapia de pacientes adultos (**Figura 10**) (GONZALEZ-LARA e OSTROSKY-ZEICHNER, 2020; KULLBERG et al., 2019; VAZQUEZ et al., 2014; PAPPAS et al., 2007; REBOLI et al., 2007). As equinocandinas são responsáveis por inibir a β -D-glucana sintase, enzima necessária para formação da parede celular, possuindo ótima atividade fungicida contra a maioria das espécies de *Candida* (ABUHAMMOUR e HABTE-GABER, 2004). Sua administração é considerada segura, com eficácia de 70 a 75% dos pacientes tratados e interações medicamentosas limitadas, porém requerem aplicação por via intravenosa (KULLBERG et al., 2019; PAPPAS et al., 2018; KULLBERG et al., 2015; VAZQUEZ et al., 2014; PAPPAS et al., 2007; REBOLI et al., 2007).

Dependendo da espécie de *Candida* identificada, os azólicos (fluconazol e voriconazol) podem ser considerados como agentes de segunda linha para terapia inicial das candidemias (PAPPAS et al., 2018). Os antifúngicos azólicos inibem a *lanosterol 14 α -demetilase*, uma enzima chave na formação de ergosterol, importante constituinte da membrana celular fúngica (ABUHAMMOUR e HABTE-GABER, 2004). São antifúngicos bem tolerados, com interações medicamentosas previsíveis e podem ser administrados como agentes sistêmicos por via intravenosa ou oral. Entretanto, sua terapia é preferida em situações clínicas específicas (endoftalmia, meningite e candidíase urinária), nas quais as equinocandinas não atingem concentrações suficientes, pois não atravessam suficientemente a barreira hematoencefálica e possuem baixa eliminação urinária (PAPPAS

et al., 2018; KULLBERG et al., 2015). Para a terapia inicial da candidemia, um estudo randomizado de 2007 demonstrou que as taxas de resposta geral foram inferiores para fluconazol (60%) do que com anidulafungina (76%). Além disso, outro estudo conduzido em 2016, produziu resultados semelhantes para isavuconazol (60%) em comparação com a caspofungina (71%) (KULLBERG et al., 2019; PAPPAS et al., 2018; KULLBERG et al., 2015).

Figura 10 – Terapia da candidíase invasiva



Fonte: Traduzido de PAPPAS et al., 2018.

Nota: Informações baseadas nas diretrizes da Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA) e da Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas (ESCMID).

Uma estratégia de redução no tratamento intravenoso para terapia por via oral, pode ter um impacto favorável na remoção de dispositivos intravasculares, tempo de internação hospitalar e gasto no tratamento da candidíase invasiva/candidemia (VAZQUEZ et al., 2014; KULLBERG et al., 2005). Após o paciente está estabilizado, a terapia de redução pode ser prescrita dentro de 3 a 7 dias a partir da terapia inicial, porém o tempo varia de acordo com a resposta clínica do paciente (PAPPAS et al., 2018). Um azólico oral (fluconazol ou voriconazol) é o agente de primeira linha para a terapia de redução, embora não deva haver resistência a azólicos com base na determinação de espécies (exemplo de *Candida krusei*, intrinsicamente resistente ao fluconazol) ou dados de suscetibilidade

antifúngica (PAPPAS et al., 2018; VAZQUEZ et al., 2014; KULLBERG et al., 2005). O voriconazol surge como um antifúngico aceitável na terapia de redução, sendo prescrito principalmente para isolados resistentes ao fluconazol, como *C. krusei*, *C. guilliermondii*, e potencialmente *C. glabrata* (GONZALEZ-LARA e OSTROSKY-ZEICHNER, 2020; PAPPAS et al., 2018).

O período de tratamento antifúngico é determinado pela resposta clínica e micológica à terapia. Durante o tratamento da candidemia, é recomendado a coleta de hemoculturas em dias alternados para acompanhar a eliminação de *Candida* spp. da corrente sanguínea (PAPPAS et al., 2018; PAPPAS et al., 2016). Na ausência de envolvimento de órgãos, a duração da terapia antifúngica sistêmica (intravenosa ou oral) deve ser de 14 dias após a eliminação de espécies de *Candida* da corrente sanguínea (se a hemocultura inicialmente for positiva) e resolução de todos os sinais de infecção, como a febre e hipotensão (MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021; PAPPAS et al., 2018; PAPPAS et al., 2016; CORNELLY et al., 2012)

2.3.7. Sensibilidade aos antifúngicos

Após o microrganismo ser isolado, é recomendado a realização de testes de sensibilidade aos antifúngicos (Antifungigrama), sendo considerado um teste importante para direcionar o tratamento da candidíase invasiva e candidemia (GONZALEZ-LARA e OSTROSKY-ZEICHNER, 2020; MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021; PAPPAS et al., 2018). A resistência intrínseca é diagnosticada por uma identificação correta da espécie, enquanto a identificação da resistência adquirida requer testes de suscetibilidade corretos e aplicação de pontos de cortes (PAPPAS et al., 2018). Os pontos de interrupção clínicos (pontos de cortes) são usados para categorizar o resultado do teste de suscetibilidade (sensível, sensível aumentando a exposição ou resistente) e para uso diário no laboratório clínico (MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021; PAPPAS et al., 2018).

Foram padronizados métodos reprodutíveis e relevantes para o antifungigrama de leveduras, dentre eles podemos citar o documento M27-A3 publicado pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) e o documento para leveduras publicado pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (EUCAST, 2020; CLSI, 2008). Os pontos de cortes interpretativos para suscetibilidade levam em

consideração a concentração inibitória mínima (CIM), bem como dados de farmacocinética, farmacodinâmica e dados de modelo animal (EUCAST, 2020; ARENDRUP et al., 2016; ARENDRUP et al., 2013; CLSI, 2008). Os testes são baseados em microdiluição em caldo, porém não são fáceis de implementar na rotina do laboratório de microbiologia clínica (ARENDRUP et al., 2016; ARENDRUP et al., 2013). Diante disso, outros testes podem ser aplicados para facilitar a análise, dentre eles podemos citar: os testes de difusão em ágar (discos e tiras de gradiente), teste comercial de microdiluição em caldo ou os sistemas semi-automatizados: Vitek (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) (MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021; PAPPAS et al., 2018).

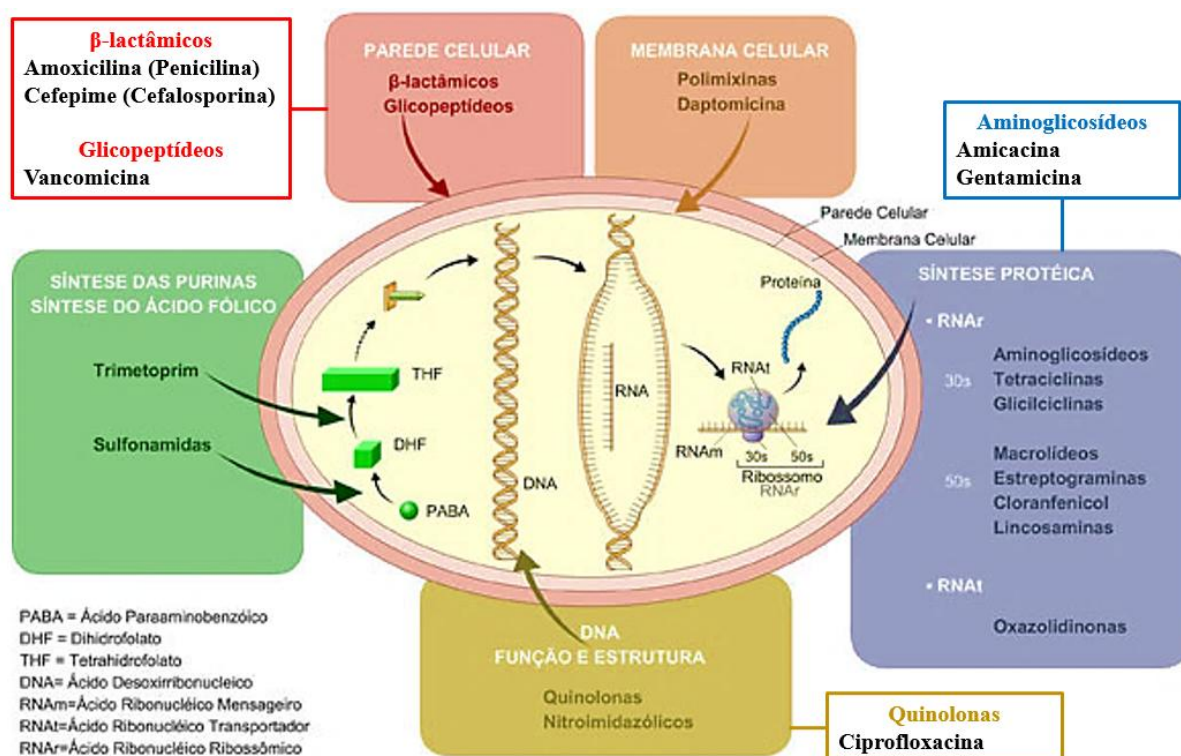
Já foram estabelecidos pontos de corte para as principais *Candida* spp. isoladas (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*) em laboratório de microbiologia (MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021). Entretanto, para *C. glabrata*, não há pontos de corte estabelecidos para itraconazol, posaconazol ou voriconazol (GONZALEZ-LARA e OSTROSKY-ZEICHNER, 2020; FOTHERGILL et al., 2014). A suscetibilidade de *Candida* spp. aos agentes antifúngicos atualmente disponíveis é geralmente previsível com base na espécie (MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021; PAPPAS et al., 2016). A resistência antifúngica em *C. albicans* permanece incomum, e os estudos de vigilância recentes sugerem que a resistência aos triazóis, entre os isolados de *C. glabrata*, tornou-se tão comum que é difícil confiar nesses agentes para terapia sem testes de sensibilidade (ALEXANDER et al., 2013; PFALLER et al., 2012b; PFALLER et al., 2010). Uma tendência de resistência semelhante aos azólicos, começou a surgir para uma proporção menor de isolados de *C. glabrata* frente as equinocandinas. Devido a essas tendências, o teste de suscetibilidade geralmente é recomendado para orientar o manejo da candidíase invasiva e candidemia (MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021; PAPPAS et al., 2016).

2.4. ANTIBACTERIANOS

Para o tratamento e/ou profilaxia de infecções bacterianas sistêmicas, são utilizados os antibacterianos pertencentes as classes dos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, glicopeptídeos ou fluoroquinolonas, segundo protocolos consensuais (GUSTINETTI e MIKULSKA, 2016). A classificação dos antibacterianos ocorre de acordo com o

mecanismo de ação de cada droga (**Figura 11**) (MOTA et al., 2010). Os β -lactâmicos são agentes bactericidas que interrompem a síntese da parede celular bacteriana como resultado da ligação covalente às proteínas ligadoras de penicilina (PBPs, do inglês, *penicillin-binding proteins*), enzimas que estão envolvidas nas etapas terminais da ligação cruzada de peptidoglicanos em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (KAPOOR, SAIGAL e ELONGAVAN, 2017; BUSH e BRADFORD, 2016; ETEBU e ARIKEKPAR, 2016). Esse grupo é subclassificado em penicilinas (por exemplo: amoxicilina), cefalosporinas (ex: cefepime), carbapenêmicos e β -lactâmicos monocíclicos (monobactâmicos) (BUSH e BRADFORD, 2016).

Figura 11 – Mecanismo de ação dos antibacterianos



Fonte: Adaptado de MOTA et al., 2010.

Os antibacterianos glicopeptídeos são um grupo de peptídeos glicosilados cíclicos ou policíclicos, que se ligam a porção terminal *D-alanina-D-alanina* presentes nas cadeias laterais das moléculas de peptidoglicano, inibindo a síntese da parede celular em bactérias Gram-positivas (KAPOOR, SAIGAL e ELONGAVAN, 2017; ZENG et al., 2016;

DŽIDIC, ŠUŠKOVIC, e KOS, 2008; REYNOLDS, 1989). Os membros significativos dessa classe incluem a vancomicina e o lipoglicopeptídeo teicoplanina (ZENG et al., 2016). Já os aminoglicosídeos são antibióticos potentes de amplo espectro que atuam por meio da inibição da síntese proteica. Os membros dessa classe (amicacina e gentamicina) se ligam com alta afinidade ao sítio do RNA ribossomal 16S da subunidade 30S (KAPOOR, SAIGAL e ELONGAVAN, 2017; KRAUSE et al., 2016; KOTRA, HADDAD e MOBASHERY, 2010). Como resultado dessa interação, o antibiótico promove erros de tradução, induzindo leitura incorreta do códon, permitindo que aminoácidos incorretos se agrupem em um polipeptídeo que é posteriormente liberado para ocasionar dano celular (KRAUSE et al., 2016; WILSON, 2014; RAMIREZ, e TOLMASKY, 2010; MINGEOT-LECLERCQ, GLUPCZYNSKI e TULKENS, 1999; DAVIS, CHEN e TAI, 1986).

As fluoroquinolonas inibem a enzima DNA girase bacteriana, responsável por corta o DNA de fita dupla e evitar o excesso de enrolamento positivo quando as fitas se separam para permitir a replicação ou transcrição do DNA. Em bactérias Gram-positivas, o principal alvo de ação é a topoisomerase IV, que corta e separa a fita após a replicação do DNA. Maior afinidade por essa enzima pode conferir maior ação contra bactérias Gram-positivas. No lugar da DNA girase ou topoisomerase IV, as células de mamíferos possuem topoisomerase II, que tem baixa afinidade pelas fluoroquinolonas, conferindo baixa toxicidade para as células (PHAM, ZIORA e BLASKOVICH, 2019; KAPOOR, SAIGAL e ELONGAVAN, 2017; YONEYAMA e KATSUMATA, 2006; HIGGINS, FLUIT e SCHMITZ, 2003; WISE, 1999).

É importante destacar que os pacientes internados são considerados um grupo de risco para o desenvolvimento de infecções bacterianas graves e infecções fúngicas invasivas (AZEVEDO et al., 2015). Portanto, os compostos antibacterianos podem ser utilizados para fins profiláticos e terapêuticos em paralelo ou em associação com drogas antifúngicas (STERGIOPOULOU et al., 2009; PASCOE e CULLEN, 2006; AGUSTI et al., 2003). Porém, já é bem descrito que o uso de antibacteriano de amplo espectro modifica a microbiota, e a integridade da barreira epitelial das mucosas, ocasionando uma disbiose e favorecendo a colonização e propagação por *Candida* spp. (TAN et al., 2021; ZHAI et al., 2020; MCCARTY e PAPPAS, 2016; VAUTIER et al., 2015; SAMONIS et al., 2013; BASSETTI et al., 2010).

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa amplamente distribuída na natureza, tendo como principal habitat o trato intestinal humano e animal (ZAGAGLIA et al., 2022; SOUZA et al., 2016; MORATO et al., 2009) A *E. coli* exerce um papel importante na fisiologia do trato intestinal, contribuindo de forma competitiva frente a outros microrganismos presente na microbiota, como por exemplo as espécies de *Candida* (PAPPAS et al., 2018; MCCARTY e PAPPAS, 2016; KULLBERG e ARENDRUP, 2015; POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015). O uso de antibacterianos de amplo espectro, podem levar a lise celular de *E. coli*, liberando diversos compostos no lúmen intestinal, dentre eles podemos destacar: LPS, peptidoglicano, proteínas, aminoácidos e DNA extracelular. Sob tais circunstâncias, *C. albicans* pode ser privilegiada na presença dessas moléculas, com destaque para o peptidoglicano presente na parede celular bacteriana (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015). Um estudo conduzido por XU e colaboradores (2008), evidenciou que as subunidades de peptidoglicano bacteriano estimulam a transição de levedura para hifas em *C. albicans*, auxiliando o patógeno na fuga do sistema imune e favorecendo uma possível invasão ao tecido do hospedeiro (XU et al., 2008). Além disso, o LPS – importante imunomodulador presente na parede celular bacteriana – pode reagir diretamente com as células fúngicas, aumentando sua virulência (ROGERS et al., 2013).

Pesquisas recentes conduzidas por nosso grupo de estudo, demonstraram que os antibacterianos β -lactâmicos e a vancomicina estimulam o crescimento planctônico, a formação de biofilme e a virulência *in vivo* de *Candida* spp. em modelo experimental com *Caenorhabditis elegans*. Foi observado ainda que amoxicilina modifica a composição da matriz do biofilme de *C. albicans*, induzindo a síntese de Hsp70 (proteína responsiva ao estresse celular) e aumentando a quantidade de quitina, tornando o biofilme mais tolerante à caspofungina (CORDEIRO et al., 2019; CORDEIRO et al., 2018; EVANGELISTA, 2018), o que poderia ter repercussões durante o processo infeccioso.

3. HIPÓTESES

1. Os isolados clínicos de *Candida albicans* apresentam sensibilidade aos antifúngicos empregados no tratamento para candidemia;
2. As cepas testadas de *C. albicans* oriundas de fungemia são capazes de formar biofilmes “*in vitro*”;
3. Os biofilmes formados em meios suplementados com antibacterianos e lisado celular de *Escherichia coli* ATCC 25922 estimulam a formação de biofilmes mais robustos e com maior tolerância aos antifúngicos clínicos;
4. Os biofilmes de *C. albicans* expostos à elevadas concentrações de anfotericina B são capazes de produzir células persistentes;
5. Os biofilmes formados na presença de antibacterianos estimulam a formação de células persistentes em biofilmes de *C. albicans*.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a influência dos antibacterianos na formação dos biofilmes e produção de células persistentes de *Candida albicans* isoladas de fungemia.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar o perfil de sensibilidade, *in vitro*, dos isolados clínicos de *C. albicans*;
2. Examinar e classificar a formação dos biofilmes de *C. albicans* isoladas de fungemia;
3. Analisar o efeito dos antibacterianos (amoxicilina, cefepime, vancomicina) e lisado celular de *Escherichia coli* ATCC 25922 sobre:
 - a formação dos biofilmes de *C. albicans*;
 - a tolerância aos antifúngicos (fluconazol, caspofungina e anfotericina B) dos biofilmes de *C. albicans*;
 - as características morfológicas e ultraestruturais dos biofilmes de *C. albicans*;
4. Averiguar a presença de células persistentes em biofilmes de *C. albicans* expostos à anfotericina B;
5. Avaliar o efeito dos antibacterianos (amoxicilina, cefepime, vancomicina, amicacina, gentamicina e ciprofloxacina) sobre:
 - a formação de células persistentes em biofilmes de *C. albicans*;
 - validar as células persistentes realizando uma sensibilidade, *in vitro*, à anfotericina B;
 - as características morfológicas e ultraestruturais de células persistentes extraídas de biofilmes de *C. albicans*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAL DE ESTUDO

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Bioagentes Infecciosos em parceria com o Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), ambos estão localizados no Centro de Biomedicina e pertencem ao departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (UFC). A aquisição das imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), foi realizada na Central Analítica do Departamento de Física da UFC, Fortaleza-CE.

5.2 MICRORGANISMOS UTILIZADOS

Um total de seis cepas de *Candida albicans* (CRN13, CRN14, CRN17, CRN18, CRN27, CRN30) isoladas de pacientes com fungemia foram avaliadas neste estudo (**Tabela 1**). Os isolados pertencem à coleção de cultura da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil (Disponível em www.ufpe.br/micoteca). A identificação presuntiva dos isolados ocorreu por crescimento em ágar cromogênico e micromorfologia em ágar *corn meal* (CORDEIRO et al., 2018); a confirmação da identificação foi realizada por espectrometria de massas (MALDI-TOF MS Autoflex III Bruker Laser nd:yag smartbeam, Bruker Daltonics Inc., USA/Germany) e sequenciamento da região ITS (LIMA-NETO et al. 2014).

Tabela 1. Identificação e origem das cepas utilizadas nesse estudo.

Cepas	Espécie fúngica	Origem de isolamento	Finalidade
CRN13	<i>Candida albicans</i>	Sangue	Teste
CRN14	<i>Candida albicans</i>	Sangue	Teste
CRN17	<i>Candida albicans</i>	Sangue	Teste
CRN18	<i>Candida albicans</i>	Sangue	Teste
CRN27	<i>Candida albicans</i>	Sangue	Teste
CRN30	<i>Candida albicans</i>	Sangue	Teste
ATCC 6258	<i>Candida krusei</i>	Escarro	Controle
ATCC 22019	<i>Candida parapsilosis</i>	Fezes	Controle
ATCC 10231	<i>Candida albicans</i>	Trato respiratório	Controle
ATCC 29213	<i>Staphylococcus aureus</i>	Humana	Controle
ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>	Humana	Controle

Legenda: ATCC: American Type Culture Collection.

5.3 ANTIBACTERIANOS

Foram testados seis antibacterianos (**Tabela 2**) empregados nos Serviços de Hematologia e Transplante de Medula Óssea de um hospital de referência (Hospital Universitário Walter Cantídio da UFC), segundo protocolos consensuais (GUSTINETTI; MIKULSKA, 2016) para o tratamento e/ou prevenção de infecções bacterianas. Os antibacterianos foram testados na concentração equivalente ao pico plasmático (PP) de cada droga: amoxicilina (AMX, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), 4 µg/ml; cefepime (CEF, Novafarma, Anápolis, Brasil), 126 µg/ml; vancomicina (VAN, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), 15 µg/ml; amicacina (AMK, Cayman Chemical, Michigan, EUA), 20 µg/ml; gentamicina (GEN, Cayman Chemical, Michigan, EUA), 10 µg/ml; e ciprofloxacina (CIP, Cayman Chemical, Michigan, EUA), 6,4 µg/ml (BRUNTON, KNOLLMAN e HILAL-DANDAN, 2018).

Tabela 2. Antibacterianos utilizados nesse estudo

Antibacteriano	Pico plasmático (PP)	Fabricante
Amoxicilina	4 µg/mL	Sigma-Aldrich, BR
Cefepime	126 µg/mL	Novafarma, BR
Vancomicina	15 µg/mL	Sigma-Aldrich, BR
Amicacina	20 µg/mL	Cayman Chemical, EUA
Gentamicina	10 µg/mL	Cayman Chemical, EUA
Ciprofloxacina	6,4 µg/mL	Cayman Chemical, EUA

Legenda: BR: Brasil; EUA: Estados Unidos da América. * Fonte: BRUNTON, KNOLLMAN e HILAL-DANDAN, 2018; GOODMAN e GILMAN, 2007.

As soluções de estoque foram diluídas em água destilada estéril de acordo com o fabricante, e as cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram utilizadas como controle de qualidade nos testes de sensibilidade aos antibacterianos (CLSI, 2014). Para tanto, foram preparados inóculos bacterianos correspondentes à escala 0,5 de McFarland (aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ células/ml) e o teste realizado em microdiluição em caldo com meio de cultura Mueller-Hinton. Os *breakpoints* foram definidos pela concentração inibitória mínima (CIM) capaz de inibir

100% o crescimento visual das bactérias (**Tabela 3**). A leitura ocorreu de acordo com o protocolo M100-S24 do CLSI (2014) (**Tabela 4**). Os testes foram realizados em triplicata.

Tabela 3. Breakpoints de leitura dos antibacterianos em face de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25213

Antibacterianos	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25213
Cefepime	0,015 – 0,12	1 – 4
Amoxicilina	<=8	NA
Vancomicina	NA	0,5 – 2
Amicacina	0,5 – 4	1 – 4
Gentamicina	0,25 – 1	0,12 - 1
Ciprofloxacina	0,004 – 0,015	0,12 – 0,5

Legenda: NA: Não se aplica. Intervalo de CIM em µg/mL. CIM = Concentração Inibitória Mínima *
Fonte: Manual M100-S24 (CLSI, 2014).

Tabela 4. Breakpoints de interpretação dos antibacterianos em face de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25213

Antibacterianos	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922			<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25213		
	S	SDD	R	S	SDD	R
Cefepime	<=2	4 – 8	>=16	NA	NA	NA
Amoxicilina	<=8	16	>=32	NA	NA	NA
Vancomicina	NA	NA	NA	<=2	4 – 8	>=16
Amicacina	<=16	32	>=64	NA	NA	NA
Gentamicina	<=4	8	>=16	NA	NA	NA
Ciprofloxacina	<=1	2	>=4	NA	NA	NA

Legenda: NA: Não se aplica. Intervalo de CIM em µg/mL. CIM = Concentração Inibitória Mínima; S = Sensível; R = Resistente; SDD = Sensível Dose Dependente * Fonte: Manual M100-S24 (CLSI, 2014).

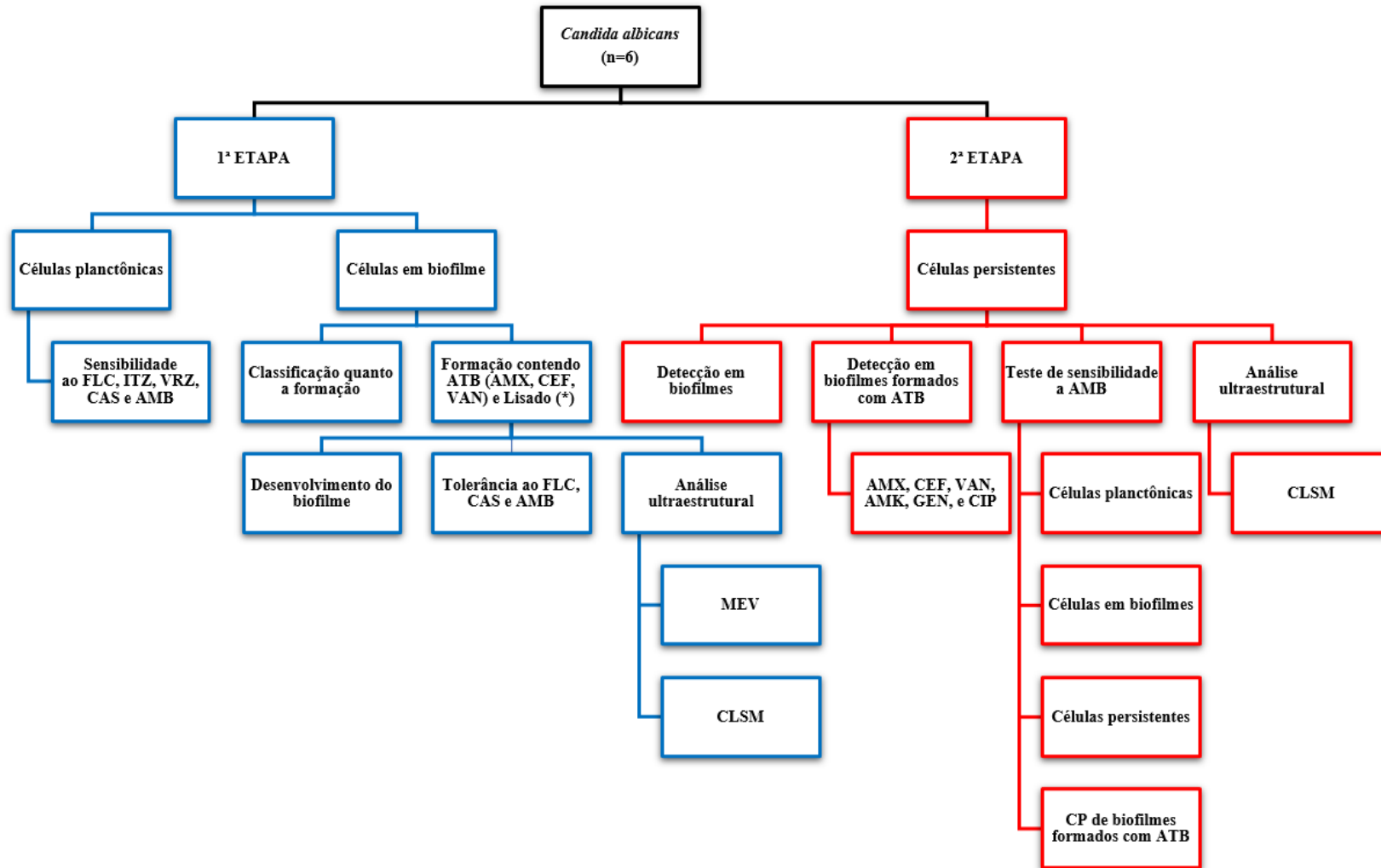
5.4 ETAPAS EXPERIMENTAIS

Este trabalho foi organizado em duas etapas distintas, de acordo com a sequência dos procedimentos representados no organograma da **Figura 12**. Todos os experimentos foram realizados *in vitro*. A etapa inicial constituiu-se na avaliação do perfil de sensibilidade de células planctônicas de *Candida albicans* (n=6), a fim de se determinar a

Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antifúngicos FLC, ITZ, VRZ, CAS e AMB, para cada cepa utilizada. Além disso, foram realizados testes classificando as cepas como fraca, moderada e forte produtoras de biofilmes. Também foi avaliado a capacidade de formação dos biofilmes contendo três antibacterianos (AMX, CEF e VAN) e lisado celular de *Escherichia coli* ATCC 25922, seguido por um teste de tolerância ao FLC, CAS e AMB. Por fim, ocorreram as análises ultraestruturais dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal de varredura a laser (CLSM).

Na segunda etapa do trabalho, estudou-se a habilidade de biofilmes maduros de *Candida albicans* produzirem células persistentes. Além disso, foi avaliado a detecção de CP nos biofilmes formados com antibacterianos AMX, CEF, VAN, AMK, GEN e CIP, bem como a sensibilidade das CP frente a AMB e suas características ultraestruturais por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM).

Figura 12 – Organograma e etapas experimentais deste estudo.



Legenda: (n) representa a quantidade de cepas utilizadas. CP: Células persistentes; FLC: fluconazol; ITZ: itraconazol; VRZ: voriconazol; CAS: caspofungina; AMB: anfotericina B; ATB: antibacterianos; AMB: anfotericina B; AMX: amoxicilina; CEF: cefepime; VAN: vancomicina; AMK: amicacina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacina; CLSM: microscopia confocal de varredura a laser. MEV: microscopia eletrônica de varredura. (*) lisado celular de *Escherichia coli* ATCC 25922.

1ª PARTE EXPERIMENTAL

5.5 TESTE DE SENSIBILIDADE PLANCTÔNICA

O perfil de sensibilidade no crescimento planctônico (n=6) foi determinado pela técnica de microdiluição em caldo como descrito no documento M27-A3 (CLSI, 2008). As células planctônicas foram avaliadas quanto à sensibilidade frente aos antifúngicos (ATF) em ensaios de microdiluição em caldo com concentrações variando de 0,125 a 64 µg/ml para fluconazol (FLC, Pfizer, São Paulo, Brasil); 0,032 a 16 µg/ml para itraconazol (ITZ, Janssen Pharmaceutical, Beerse, Belgium), voriconazol (VRZ, Pfizer, São Paulo, Brasil) e anfotericina B (AMB, Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos); e de 0,016 a 8 µg/ml para caspofungina (CAS, Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) (CLSI, 2008). A solução estoque de cada ATF foi preparada conforme recomendado pelo documento M27-A3 (CLSI, 2008).

Para o teste de sensibilidade, foi preparado inóculo a partir de culturas de *C. albicans* previamente semeadas em ágar batata dextrose e incubadas por 24 horas a 35 °C. As colônias foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril (0,9%) e ajustada a 0,5 na escala de McFarland. Posteriormente, a suspensão obtida foi diluída em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, MO, EUA), tamponado com pH 7,0 a 0,165 M de ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS; Sigma-Aldrich, MO, EUA). nas proporções 1:50 e 1:20 para obtenção de um inóculo na concentração de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ células/mL (CLSI, 2008). Alíquotas de 100 µL do inóculo preparado como anteriormente descrito foram adicionadas às placas de cultura de 96 poços já contendo 100 µL de RPMI-1640 suplementado com cada droga e distribuídas em diluições seriadas. Como controle de crescimento, foram utilizados poços contendo o inóculo e o meio RPMI sem a adição de droga. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas (CLSI, 2008).

Os *breakpoints* foram definidos pela concentração inibitória mínima (CIM) capaz de inibir 50% do crescimento fúngico para os triazólicos (FLC, ITZ e VRZ) e 100% para AMB e CAS (**Tabela 5**). A leitura ocorreu de acordo com o manual M27-A3 do CLSI (2008) (**Tabela 6**) e foi classificado o *Cutoff* Epidemiológico (µg/mL), classificando os isolados como do tipo selvagem e tipo não-selvagem (**Tabela 7**) (PFALLER e DIEKEMA, 2012; PFALLER et al., 2012a; PFALLER et al., 2011a; PFALLER et al., 2011b; CLSI,

2008). Todos os ensaios foram realizados em duplicata e as cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 foram incluídas como controles de qualidade para fase planctônica do teste de sensibilidade em caldo (CLSI, 2008).

Tabela 5. Breakpoints de interpretação dos antifúngicos em face de *Candida* spp.

Antifúngicos	<i>Candida albicans</i>			<i>Candida parapsilosis</i>			<i>Candida krusei</i>		
	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R
Anfotericina B	<=1	-	>1	<=1	-	>1	<=1	-	>1
Caspofungina	<=0,25	0,5	>=1	<=2	4	>=8	<=0,25	0,5	>=1
Itraconazol	<=0,125	0,25 – 0,5	>=1	<=0,125	0,25 – 0,5	>=1	<=0,125	0,25 – 0,5	>=1
Fluconazol	<=2	4	>=8	<=2	4	>=8	IR	IR	IR
Voriconazol	<=0,125	0,25 – 0,5	>=1	<=0,125	0,25 – 0,5	>=1	<=0,5	1	>=2

Legenda: Intervalo de CIM em µg/mL. CIM = Concentração Inibitória Mínima; S = Sensível; R = Resistente; SDD = Sensível Dose Dependente; IR = Intrinsecamente Resistente * Fonte: Manual M27-A3 (CLSI, 2008).

Tabela 6. Breakpoints de leitura dos antifúngicos em face de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258

Antifúngicos	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
Anfotericina B	0,25 - 2	0,5 - 4	0,5 - 2	1 - 4
Caspofungina	0,25 - 1	0,5 - 4	0,06 - 1	0,25 - 1
Itraconazol	0,06 – 0,5	0,06 – 0,5	0,12 - 1	0,25 - 1
Fluconazol	0,5 - 4	1 - 4	8 - 64	16 - 128
Voriconazol	0,016 – 0,12	0,03 – 0,25	0,06 – 0,5	0,12 - 1

Legenda: Intervalo de CIM em µg/mL. CIM = Concentração Inibitória Mínima * Fonte: Manual M27-A3 (CLSI, 2008).

Tabela 7. *Cutoff* Epidemiológico ($\mu\text{g/mL}$) para *Candida albicans*

Antifúngicos	<i>Candida albicans</i>	
	Selvagem	Não Selvagem
Anfotericina B	≤ 2	> 2
Caspofungina	$\leq 0,125$	$> 0,125$
Itraconazol	$\leq 0,125$	$> 0,125$
Fluconazol	$\leq 0,5$	$> 0,5$
Voriconazol	$\leq 0,03$	$> 0,03$

Legenda: Intervalo de CIM em $\mu\text{g/mL}$.

* *Cutoff* epidemiológico: valor de CIM que separa as cepas selvagens das não selvagens. É definido com base na distribuição normal dos valores de CIM de uma determinada droga ante a uma dada espécie de microrganismo. 95% das cepas de uma determinada espécie são classificadas como selvagens.

Fontes: PFALLER e DIEKEMA, 2012; PFALLER et al., 2012a; PFALLER et al., 2011a; PFALLER et al., 2011b; CLSI, 2008.

5.6 LISADO CELULAR DE *Escherichia coli*

Visando simular um cenário de disbiose, ocasionado pelo uso de antibacterianos de amplo espectro, foi preparado um lisado celular de *Escherichia coli* ATCC 25922. O intuito é fornecer, para os isolados de *C. albicans*, moléculas (LPS, peptidoglicano, proteínas, aminoácidos e DNA extracelular) oriundas da lise celular de bactérias presentes na microbiota. Para obtenção do lisado celular, culturas de *E. coli* ATCC 25922 foram repicadas em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*; HiMedia Laboratories, Índia) e mantidas por 24 horas a 37 °C. Posteriormente, foi ajustada uma suspensão em RPMI-1640 com turbidez equivalente a 2 na escala de McFarland (6×10^8 células/mL) e adicionado cefepime na concentração de PP. Após 24 horas de incubação à 37 °C, a suspensão foi filtrada em membrana 0,22 μm , o lisado obtido foi armazenado a -20 °C e diluído no momento de uso.

5.7 TESTES EM BIOFILMES

Os biofilmes foram formados de acordo com a metodologia descrita por Cordeiro et al. (2015). As cepas de *C. albicans* (n=6) foram cultivadas em ágar batata-dextrose (PDA, Himedia, Mumbai, Índia) à 37°C por 24 horas. Alíquotas de 100 μl de

suspensão fúngica, contendo inóculo de aproximadamente 3×10^6 células/ml, foram ajustadas em meio RPMI-1640 e transferidas para microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato, contendo 100 μ l de RPMI. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas para maturação do biofilme.

5.7.1 Classificação quanto à formação de biofilme

Para verificar a capacidade de formação de biofilme dos seis isolados de *C. albicans*, foi aplicada a metodologia descrita por Stepanovic et al. (2000). Os biofilmes foram formados como descrito acima e determinado o valor de densidade óptica (DO) pela técnica colorimétrica de quantificação de biomassa por cristal violeta (PEETERS, NELIS e COENYE, 2008). O teste foi realizado em triplicata e os poços contendo apenas meio de cultura sem inóculo foram utilizados como controle negativo. Os valores de ponto de corte (DOc) para o ensaio de formação do biofilme foram definidos como três desvios padrões acima da média da densidade óptica do controle negativo. As cepas foram classificadas em quatro categorias: não produtoras de biofilme ($DO \leq DOc$), fracas produtoras ($DOc < DO \leq 2 \times DOc$), moderadas produtoras ($2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$) e fortes produtoras ($4 \times DOc < DO$) (STEPANOVIC et al., 2000).

5.7.2 Atividade dos antibacterianos e lisado celular no desenvolvimento dos biofilmes de *Candida albicans*

O efeito dos antibacterianos (AMX, CEF e VAN) e lisado celular no desenvolvimento dos biofilmes de *C. albicans*, foi realizado segundo Cordeiro et al. (2019). Os biofilmes foram formados de acordo com a metodologia descrita por Cordeiro et al. (2015). As cepas de *C. albicans* (n=6) foram cultivadas em ágar batata-dextrose (PDA, Himedia, Mumbai, Índia) à 37°C por 24 horas. Alíquotas de 100 μ l de suspensão fúngica, contendo inóculo de aproximadamente 3×10^6 células/ml, foram ajustadas em meio RPMI-1640 e transferidas para microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato, contendo 100 μ l de RPMI-1640 suplementado com antibacterianos (AMX, CEF e VAN) na concentração de PP ou lisado celular na concentração de 1:1. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas para maturação do biofilme. Posteriormente, os biofilmes maduros foram avaliados pelo ensaio de redução de MTT e quantificação da biomassa por cristal violeta

(RISS, et al. 2013; KUMAR, NAGARAJAN e UCHIL, 2018; PEETERS, NELIS e COENYE, 2008). Os controles foram conduzidos em meio RPMI-1640 livre de antibacterianos e todos os ensaios foram realizados em triplicata.

5.7.3 Efeito dos antibacterianos e lisado celular na tolerância dos biofilmes de *Candida albicans* frente aos antifúngicos

A tolerância antifúngica frente aos biofilmes de *C. albicans* formados na presença dos antibacterianos (AMX, CEF e VAN) e lisado celular, ocorreu de acordo com a metodologia descrita por Cordeiro et al. (2019). Os biofilmes foram formados em microplacas de 96 poços, contendo meio RPMI-1640 suplementados com AMX, CEF e VAN na concentração de PP ou lisado celular na concentração de 1:1. Após 48 horas de maturação do biofilme a 37 °C, os biofilmes maduros foram lavados com PBS (*Phosphate-Buffered Saline*), tratados com ATF nas concentrações de AMB a 5 µg/ml, FLC a 40 µg/ml e CAS a 0,31 µg/ml. As concentrações correspondem a 10 vezes a CIM de cada droga frente as células planctônicas. Após 48 horas de incubação a 37 °C, os biofilmes foram novamente lavados com PBS e avaliados para atividade metabólica e produção de biomassa (RISS, et al. 2013; KUMAR, NAGARAJAN e UCHIL, 2018; PEETERS, NELIS e COENYE, 2008). Os controles foram conduzidos em meio RPMI-1640 livre de antibacterianos e todos os ensaios foram realizados em triplicata.

5.7.4 Ação dos antibacterianos na morfologia e ultraestrutura dos biofilmes produzidos por *Candida albicans*

O efeito dos antibacterianos (AMX, CEF e VAN) na morfologia e ultraestrutura dos biofilmes de *C. albicans* foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (CORDEIRO et al., 2017) e microscopia confocal (CLSM) conforme Kagan e colaboradores (2014). Para análise, foi escolhida a cepa CRN18 devido seu melhor estímulo frente aos antibacterianos testados. Para ambas as análises, os biofilmes foram formados em lâminas Thermanox® (Thermo Fisher Scientific, NY, Estados Unidos) em meio RPMI suplementado com cada antibacteriano individualmente na concentração de PP de cada droga. Além disso, também foi avaliado o efeito dos antibacterianos na tolerância dos biofilmes de *C. albicans* frente aos antifúngicos FLC e CAS. Após formação dos biofilmes

em Thermanox®, contendo meio RPMI-1640 suplementados com AMX, CEF ou VAN. Os biofilmes foram tratados com concentrações de FLC a 40 µg/ml e CAS a 0,31 µg/ml e examinados por MEV e CLSM.

Para análise de MEV, os biofilmes formados em Thermanox® foram fixados com glutaraldeído a 2,5% em tampão de cacodilato de sódio 0,15 M contendo azul de alcian (0,01%) e incubados a 4 °C durante a noite. Em seguida, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão cacodilato 0,15 M por 5 min e submetidos à desidratação alcoólica crescente em etanol [50, 70, 80, 95 e 100% (duas vezes), 10 min cada]. Posteriormente, as lâminas foram secas com hexametildisilazano (Polysciences Europe, Alemanha) por 30 minutos e depois incubadas durante a noite em um dessecador. Para avaliação, as lâminas de Thermanox® contendo os biofilmes, foram revestidas com ouro de 10 nm (Emitech Q150T, Lewes, Reino Unido) e examinadas em MEV (FEI Inspect S50, OR, Estados Unidos) no modo de alto vácuo a 15 Kv (CORDEIRO et al., 2017).

Para CLSM, os biofilmes em Thermanox® foram corados com o kit Live/Dead™ (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). Análises foram realizadas em microscópio confocal Nikon C2 C (Nikon, Melville, NY, EUA), a 488 nm, para a detecção de SYTO 9 (células viáveis) e a 561 nm, para detecção de iodeto de propídio (células mortas/danificadas). As imagens foram processadas usando o Software ImageJ e os gráficos foram gerados utilizando a média das imagens (COLLINS, 2007).

2ª PARTE EXPERIMENTAL

5.8 CÉLULAS PERSISTENTES

A presença de células persistentes (CP) em biofilmes de *C. albicans* (n=6) foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por LaFleur, Kumamoto e Lewis (2006). Os biofilmes maduros foram lavados com PBS (*Phosphate-Buffered Saline*), tratados com 100 µg/ml de AMB e incubados a 37°C por mais 24 horas. Em seguida, os poços foram novamente lavados com PBS, raspados com ponteira estéril, as células ressuspensas em 200 µl de PBS e o conteúdo vigorosamente vortexado. As suspensões foram diluídas seriadamente, semeadas em ágar batata-dextrose (PDA, Himedia, Mumbai, Índia) e incubadas a 37°C por 24 horas para contagem de células viáveis. As células que

sobreviveram à exposição de 100 µg/ml de AMB foram consideradas células persistentes (LAFLEUR, KUMAMOTO e LEWIS, 2006). Os biofilmes formados em meio RPMI-1640 e não tratados com AMB foram incluídos como controle de crescimento dos biofilmes. Além disso, *C. albicans* ATCC 10231 foi incluída como controle para validação da metodologia descrita por LaFleur, Kumamoto e Lewis (2006), pois foi demonstrado que produz células dormentes na presença de AMB (Boucherit et al., 2007). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em dois experimentos independentes.

5.8.1 Detecção de células persistentes em biofilmes de *C. albicans* formados com antibacterianos

Os biofilmes foram formados em microplacas de 96 poços contendo RPMI-1640 suplementados com AMX (4 µg/ml), CEF (126 µg/mL), VAN (15 µg/mL), AMK (20 µg/ml), GEN (10 µg/ml) ou CIP (6,4 µg/ml) segundo Cordeiro et al. (2019). Após 48 horas de incubação a 37 °C, os biofilmes foram tratados com 100 µg/ml de AMB e processadas como descrito acima. Biofilmes formados em meio RPMI-1640 sem antibacterianos foram incluídos como controle de crescimento do biofilme. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

5.8.2 Sensibilidade de células persistentes frente à AMB

Visando a validação das CP, o perfil de sensibilidade à AMB foi determinado pela técnica de microdiluição em caldo como descrito no documento M27-A3 (CLSI, 2008). CP obtidas foram avaliadas quanto à sensibilidade frente à AMB em ensaio de microdiluição em caldo com concentrações variando de 0,032 a 16 µg/ml (CLSI, 2008). Os testes foram realizados da seguinte forma: (1) células planctônicas cultivadas em RPMI sem antibacterianos (CLSI, 2008); (2) células desagregadas de biofilmes maduros (48 h) formadas em RPMI sem antibacterianos; (3) CP de biofilmes maduros (48 h) formadas em RPMI sem antibacterianos; (4) CP de biofilmes maduros (48 h) formadas em RPMI suplementado com AMOX, CEF, VAN, AMK, GEN ou CIP em concentrações de PP. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento fúngico (CLSI, 2008). Os isolados foram testados em duplicata e as cepas *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram incluídos como

controles de qualidade para fase planctônica do teste de sensibilidade em caldo (CLSI, 2008).

5.8.3 Estrutura e morfologia das células persistentes

O efeito dos antibacterianos (AMX, CEF, VAN, AMK, GEN e CIP) na morfologia e ultraestrutura das células persistentes de *C. albicans* foi avaliada por microscopia confocal (CLSM) conforme Kagan e colaboradores (2014). Para análise, foi escolhida a cepa CRN18 devido seu melhor estímulo na produção de CP, frente aos antibacterianos testados. Os biofilmes foram formados em lâminas Thermanox® (Thermo Fisher Scientific, NY, Estados Unidos) em meio RPMI suplementado com cada antibacteriano individualmente. Após o tratamento com 100 µg/ml de AMB por 24 horas, as CPs foram examinadas por CLSM. Para tanto, as células foram coradas com o kit Live/Dead™ (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). Análises foram realizadas em microscópio confocal Nikon C2 C (Nikon, Melville, NY, EUA), a 488 nm, para a detecção de SYTO 9 (células viáveis) e a 561 nm, para detecção de iodeto de propídio (células mortas/danificadas). As imagens foram processadas usando o Software ImageJ (COLLINS, 2007).

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para representação gráfica e análise estatística, foi utilizado o software GraphPad Prism® 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As variáveis foram comparadas por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste Turkey para comparação múltipla ou por teste t pareado, conforme apropriado. Valores de P inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

6. RESULTADOS

1ª PARTE EXPERIMENTAL

6.1 ANTIBACTERIANOS

Os resultados obtidos para validação dos antibacterianos estão descritos na **Tabela 8**. Como esperado, os isolados de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25213 foram sensíveis à todos os antibacterianos testados.

Tabela 8. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) de cefepime, amoxicilina, vancomicina, amicacina, gentamicina e ciprofloxacina frente as cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25213

Cepas	Drogas (µg/ml)					
	CEF	AMX	VAN	AMK	GEN	CIP
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,062	4	NA	0,5	0,5	0,015
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25213	2	NA	0,5	1	0,25	0,25

Legenda: CEF: cefepime; AMX: amoxicilina; VAN: vancomicina; AMK: amicacina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacina. NA: não se aplica. As CIMs são expressas em µg/mL. ATCC: *American Type Culture Collection*.

6.2 TESTE DE SENSIBILIDADE PLANCTÔNICA

Os resultados obtidos para sensibilidade planctônica de *C. albicans* são expressos na **Tabela 9**. Cinco das seis cepas testadas se mostraram sensíveis aos azólicos, com CIMs variando para FLC e ITZ entre 0,125 a 0,25 µg/ml e 0,062 a 0,031 µg/ml, respectivamente. Entretanto, a cepa CRN13 apresentou CIM de 4 µg/ml para FLC, sendo considerada dose-dependente. Além disso, a cepa CRN13 foi considerada cepa não selvagem de acordo com o documento do CLSI, 2008. Já para VRZ, cinco das seis cepas testadas foram sensíveis, com CIM de 0,031 µg/ml. Entretanto, a cepa CRN18 foi interpretada como resistente (CIM = 1 µg/ml) e considerada não selvagem. Observou-se que a AMB inibiu o crescimento planctônico de *C. albicans*, apresentando CIM variando entre 0,25 a 1 µg/ml. Os resultados obtidos para as cepas padrões *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 foram compatíveis com o documento M27-A3 do CLSI, validando o teste de sensibilidade.

Tabela 9. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) de fluconazol, itraconazol, voriconazol, caspofungina e anfotericina B frente aos isolados de *Candida albicans*

Cepas	Drogas (µg/ml)				
	FLC	ITZ	VRZ	CAS	AMB
CRN13	4 (SDD; NS)	0,062	0,031	0,031	0,5
CRN14	0,25	0,062	0,031	0,125	0,5
CRN17	0,25	0,062	0,031	0,031	0,5
CRN18	0,25	0,062	1 (R, NS)	0,5 (SDD, NS)	1
CRN27	0,125	0,031	0,031	0,125	0,5
CRN30	0,125	0,062	0,031	0,062	0,25
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,5	0,062	0,031	0,25	0,5
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	16	0,25	0,125	0,25	1

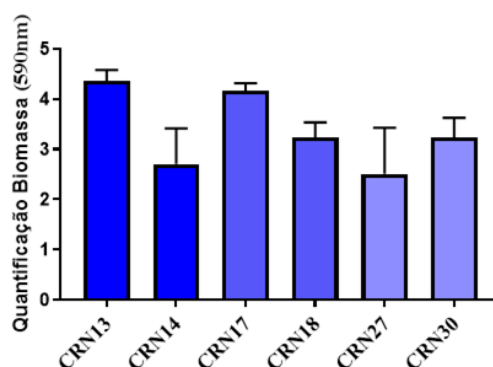
Legenda: FLC: fluconazol; ITZ: itraconazol; VRZ: voriconazol; CAS: caspofungina e AMB: anfotericina B. CIM: concentração inibitória mínima referente a 100%. As CIMs são expressas em µg/mL. SDD: sensibilidade dose-dependente; NS: cepa não selvagem; R: Resistente; ATCC: American Type Culture Collection.

6.3 TESTES EM BIOFILMES

6.3.1 Classificação quanto à formação de biofilme

Todos os isolados clínicos de *C. albicans* foram capazes de formar biofilme em placas de poliestireno, sendo classificados como fortes produtoras de biofilme, com densidade óptica (DO) maior que quatro vezes o ponto de corte (DOc) (**Figura 13**).

Figura 13 – Quantificação do biofilme de cepas de *C. albicans* incluídas neste estudo.

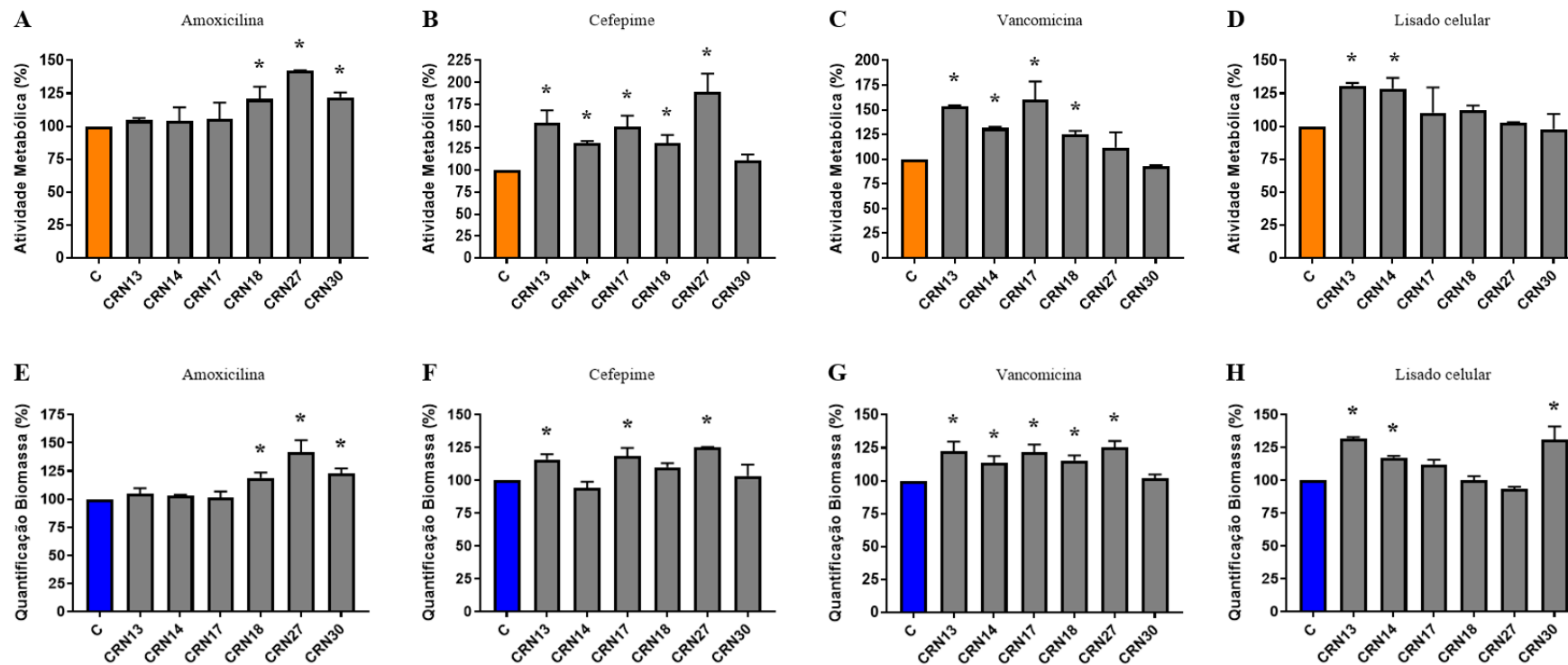


Legenda: Biofilmes foram formados em microplacas de poliestireno e corados pelo método de cristal violeta. As cepas foram classificadas como fortes produtoras de biofilme, segundo Stepanovic et al. (2000). Dados expressos em absorbância a 590 nm.

6.3.2 Atividade dos antibacterianos e lisado celular no desenvolvimento dos biofilmes de *Candida albicans*

A atividade dos antibacterianos (AMX, CEF e VAN) e lisado celular de *E. coli* ATCC 25922 no desenvolvimento dos biofilmes de *C. albicans*, estão descritos na **Figura 14**. Para AMX foi observado um estímulo na atividade metabólica e biomassa em 3/6 cepas testadas, com diferença de até 48%. Já para o cefepime, foi observado um estímulo de até 70% para atividade metabólica e até 25% para biomassa em 5/6 e 3/6 cepas, respectivamente. A VAN também apresentou um aumento na atividade metabólica e biomassa dos biofilmes, com diferença estatística significativa de até 50% em 4/6 cepas e até 25% em 5/6 cepas, respectivamente. O lisado celular influenciou positivamente em 2/6 cepas para a atividade metabólica e 3/6 cepas para quantificação de biomassa, apresentando um biofilme mais robusto, com diferença em até 30% quando comparado ao biofilme formado apenas com meio de cultura.

Figura 14 – Biofilmes de *Candida albicans* formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos ou lisado celular.



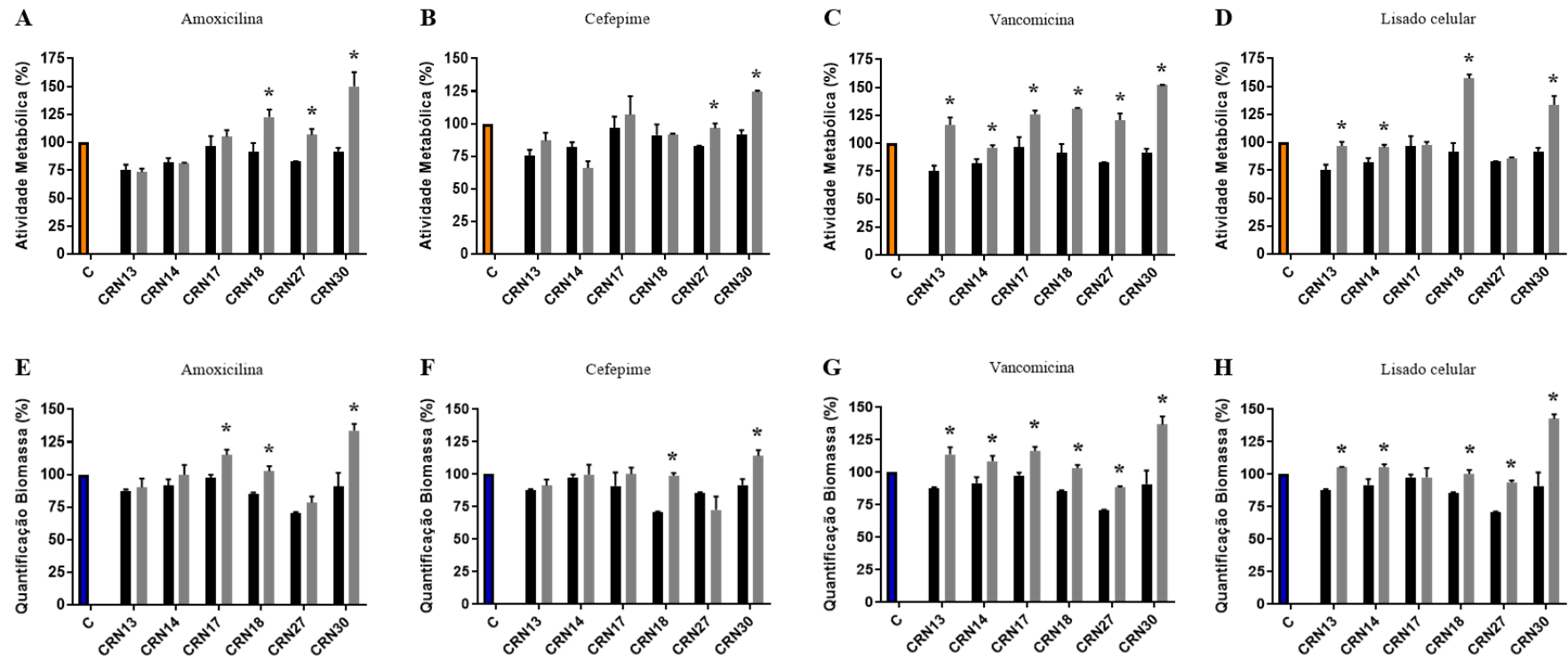
Legenda: Os resultados expressos em porcentagem (média \pm DP) para ensaio colorimétrico de redução de MTT (A; B; C; D) e coloração por cristal violeta (E; F; G; H). Biofilmes formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos na concentração de PP de cada droga ou lisado celular na concentração de 1:1 (barras cinzas). Asteriscos (*) representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparadas aos biofilmes formados apenas em meio de cultivo (barras coloridas).

6.3.3 Efeito dos antibacterianos e lisado celular na tolerância dos biofilmes de *Candida albicans* frente aos antifúngicos

A tolerância antifúngica ao FLC e CAS nos biofilmes de *C. albicans* formados com antibacterianos (AMX, CEF e VAN) e lisado celular de *E. coli* ATCC 25922, estão descritos na **Figura 15** e **Figura 16**, respectivamente. Para FLC, os biofilmes formados com AMX apresentaram maior tolerância em 3/6 cepas, com diferença estatística significativa em até 40% para atividade metabólica e até 30% para biomassa. Já para os biofilmes formados com CEF, foi observado que 2/6 cepas suportaram o tratamento, com diferença em até 25% para atividade metabólica e até 20% para biomassa. Para os biofilmes formados com VAN todas as cepas se mostraram tolerantes ao FLC, apresentando diferença estatística significativa de até 50% para atividade metabólica e até 40% para biomassa. Os biofilmes formados com lisado celular e tratados com FLC, apresentaram um aumento de até 55% para atividade metabólica em 4/6 cepas testadas e uma maior biomassa em até 40% para 5/6 cepas, quando comparado ao biofilme formado apenas com meio de cultura e tratados com FLC.

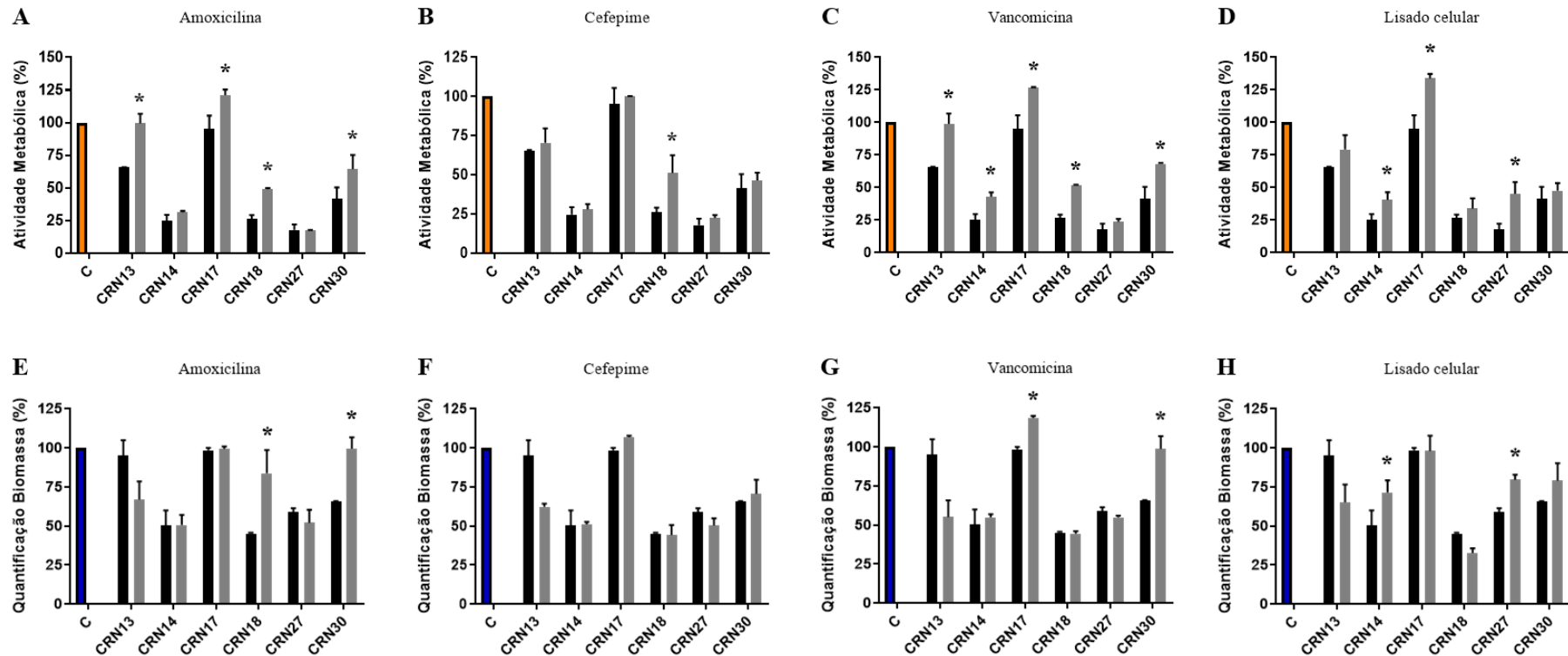
Para CAS, os biofilmes formados com AMX apresentaram maior tolerância ao antifúngico, com aumento de até 30% para atividade metabólica em 4/6 cepas e até 50% para biomassa em 2/6 cepas testadas. Os biofilmes formados com CEF evidenciaram que 1/6 cepas testadas apresentou um aumento de 40% na sua atividade metabólica. Já para os biofilmes formados com VAN, 5/6 cepas apresentaram um aumento de até 35% para atividade metabólica e 2/6 cepas testadas um aumento de até 45% para biomassa. Para os biofilmes formados com lisado celular, foi possível notar um aumento na atividade metabólica de até 30% em 3/6 cepas e um aumento de biomassa em até 20% em 2/6 cepas testadas, quando comparado ao biofilme formado apenas com meio de cultivo e posteriormente tratados com CAS. Os biofilmes de *C. albicans* formados com antibacterianos (AMX, CEF e VAN) e lisado celular de *E. coli* ATCC 25922, não influenciaram na tolerância a AMB (**Figura 17**).

Figura 15 – Sensibilidade ao **Fluconazol (FLC)** frente aos biofilmes de *Candida albicans* formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos ou lisado celular



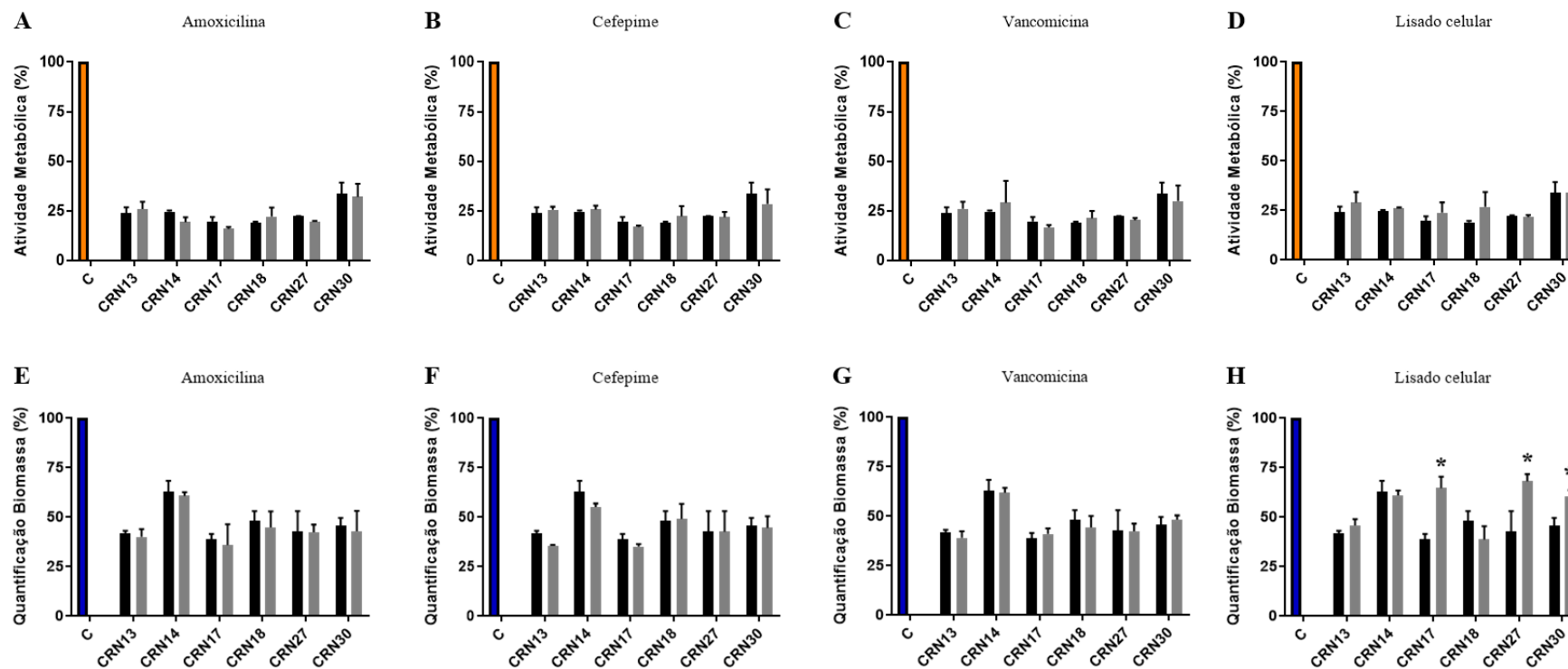
Legenda: Os resultados são expressos em porcentagem (média \pm DP) para ensaio colorimétrico de redução do MTT (A; B; C; D) e coloração por cristal violeta (E; F; G; H). Biofilmes formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos na concentração de PP de cada droga ou lisado celular na concentração de 1:1 e posteriormente tratados com FLC a 40 μ g/ml (barras cinzas). Controle de crescimento livre de drogas representado por barras coloridas. Asteriscos (*) representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparadas aos biofilmes formados apenas em meio de cultivo e posteriormente tratados com FLC (barras pretas).

Figura 16 – Sensibilidade a **Caspofungina (CAS)** frente aos biofilmes de *Candida albicans* formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos ou lisado celular



Legenda: Os resultados são expressos em porcentagem (média \pm DP) para ensaio colorimétrico de redução do MTT (A; B; C; G) e coloração por cristal violeta (E; F; G; H). Biofilmes formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos na concentração de PP de cada droga ou lisado celular na concentração de 1:1 e posteriormente tratados com CAS a 0,31 µg/ml (barras cinzas). Controle de crescimento livre de drogas representado por barras coloridas. Asteriscos (*) representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparadas aos biofilmes formados apenas em meio de cultivo e posteriormente tratados com CAS (barras pretas).

Figura 17 – Sensibilidade a **Anfotericina B (AMB)** frente aos biofilmes de *Candida albicans* formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos ou lisado celular

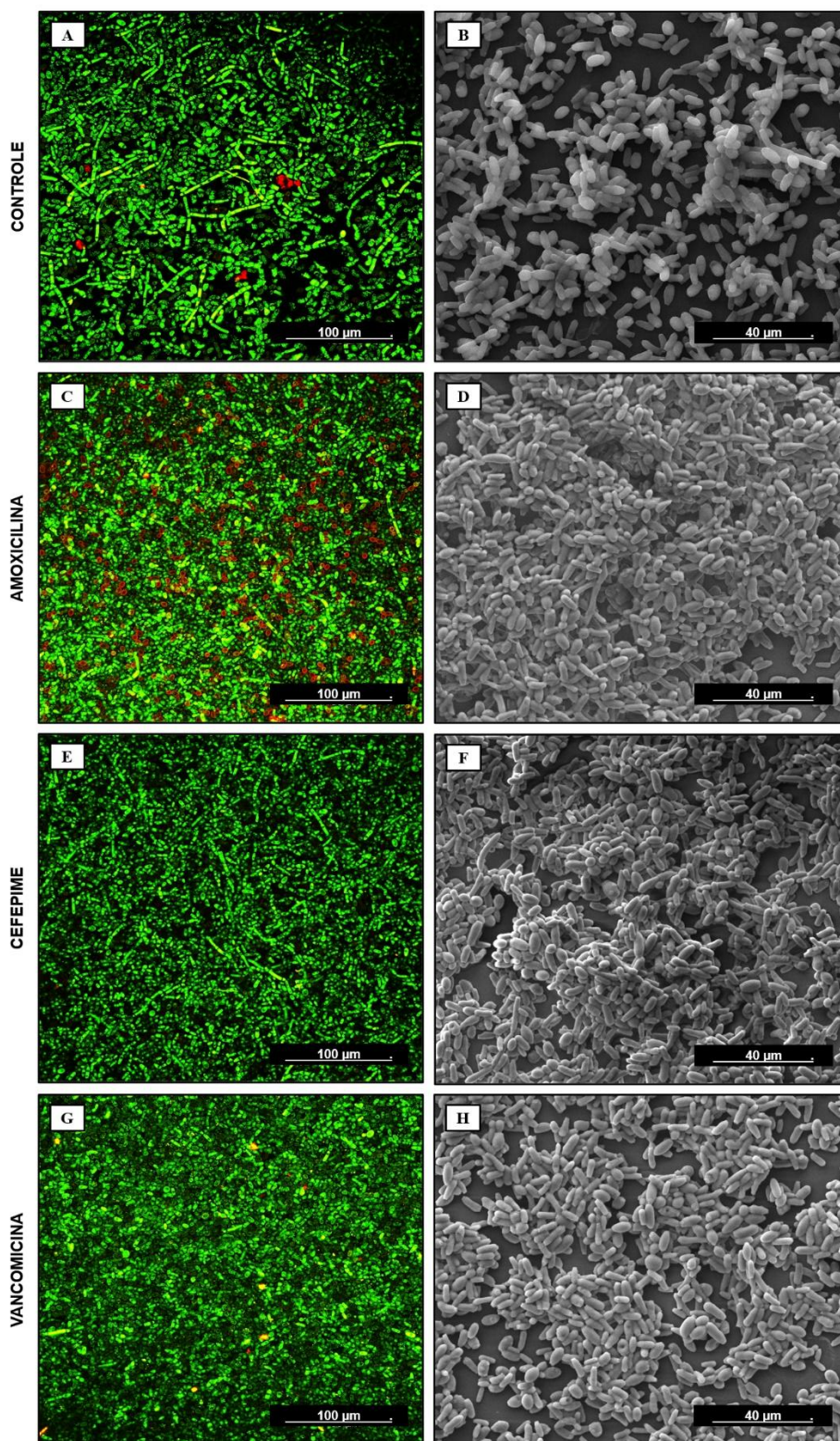


Legenda: Os resultados são expressos em porcentagem (média \pm DP) para ensaio colorimétrico de redução do MTT (A; B; C; D) e coloração por cristal violeta (E; F; G; H). Biofilmes formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos na concentração de PP de cada droga ou lisado celular na concentração de 1:1 e posteriormente tratados com AMB a 5 μ g/ml (barras cinzas). Controle de crescimento livre de drogas representado por barras coloridas. Asteriscos (*) representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparadas aos biofilmes formados apenas em meio de cultivo e posteriormente tratados com AMB (barras pretas).

6.3.4 Ação dos antibacterianos na morfologia e ultraestrutura dos biofilmes produzidos por *Candida albicans*

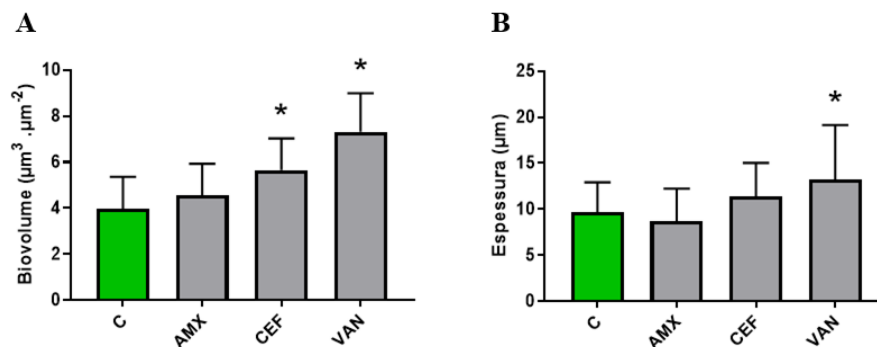
A morfologia e ultraestrutura dos biofilmes de *Candida albicans* (CRN18) formados em meio de cultivo e suplementado com antibacterianos (AMX, CEF ou VAN), estão descritos **Figura 18**. Os resultados obtidos, demonstraram que após 48 horas de formação, os biofilmes estão constituídos por células viáveis (verde) em sua maioria, com escassez de células danificadas (vermelho), e são compostas por blastoconídeos, pseudo-hifas ou hifas verdadeiras. Os biofilmes de *C. albicans* (CRN18) formados com CEF aumentaram seu biovolume (**Figura 19A**), porém não foram capazes de influenciar na sua espessura ($p>0,05$) (**Figura 19B**). Os biofilmes formados com VAN apresentaram maior biovolume e espessura quando comparados aos seus controles de crescimento formado apenas em meio de cultivo (**Figura 19A; 19B**). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas frente ao biovolume e espessura dos biofilmes formados com AMX.

Figura 18 – Imagens de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilmes de *Candida albicans* formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos



Legenda: Imagens de CLSM (A, C, E e G) e MEV (B, D, F e H) de biofilmes de *Candida albicans* (CRN18) formados em meio RPMI livre de drogas (A e B) ou suplementado com antibacterianos na concentração de PP (C; D; E; F; G e H). Ampliação: 3000x para MEV e 400x para CLSM.

Figura 19 – Efeito dos antibacterianos em face do biovolume e espessura dos biofilmes de *Candida albicans* formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos



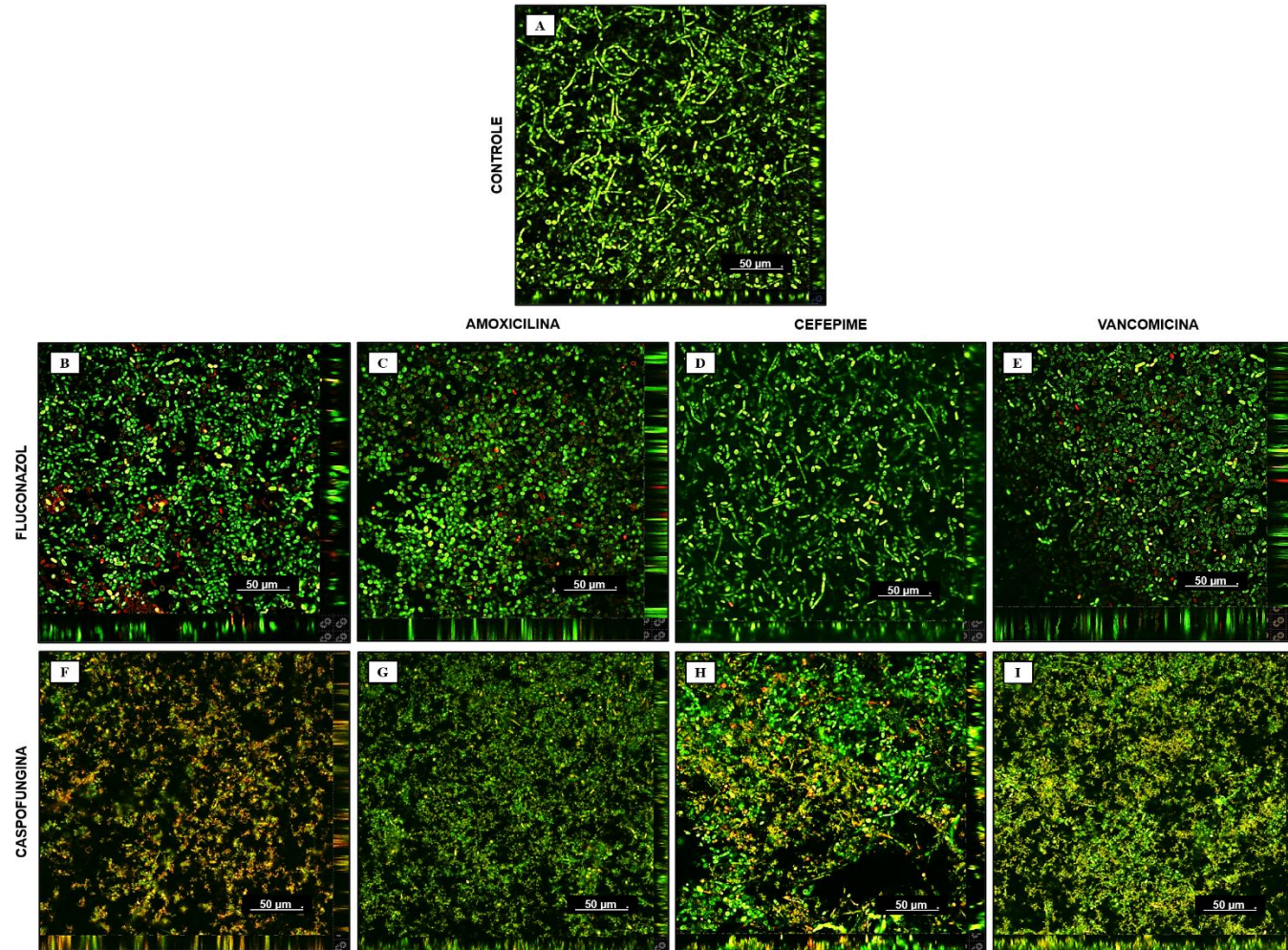
Legenda: Efeito dos antibacterianos: amoxicilina (AMX), cefepime (CEF) e vancomicina (VAN) na concentração de PP (barras cinzas) em face do biovolume (A) e à espessura (B) dos biofilmes de *Candida albicans* (CRN18) analisados por microscopia confocal de varredura a laser – CLSM. Asteriscos (*) representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparadas aos biofilmes formados apenas em meio de cultivo (barras verdes).

Após 72 horas de formação do biofilme, permanece a predominância de blastoconídeos, pseudo-hifas ou hifas verdadeiras aderidas, ressaltando a presença de um biofilme robusto (**Figura 20A**). Os biofilmes tratados com FLC apresentaram uma discreta redução celular, porém a concentração testada foi capaz de manter sua viabilidade (**Figura 20B**). Entretanto, os biofilmes formados com AMX e posteriormente tratados com FLC, apresentaram uma estrutura similar ao biofilme formado apenas com meio de cultivo (**Figura 20C**). O biofilme formado com CEF e depois tratado com FLC, evidenciou um maior número de pseudo-hifas (**Figura 20D**). Para o biofilme formado com VAN e tratado com FLC, constatou-se um maior número de blastoconídeos (**Figura 20E**). Além disso, foi observado um aumento significativo de biovolume e espessura para os biofilmes formados com os antibacterianos (AMX, CEF e VAN) e posteriormente tratados com FLC, quando comparados ao controle de crescimento formado apenas em meio de cultivo (**Figura 21A; 21B**).

Os biofilmes maduros de *C. albicans* (CRN18) tratados com CAS, evidenciaram uma completa destruição da sua estrutura e morfologia celular, apresentando uma redução de células viáveis (**Figura 20F**). Entretanto, os biofilmes formados com AMX, CEF, VAN e posteriormente tratados com CAS, demonstraram um aumento na sua viabilidade e ultraestrutura dos biofilmes (**Figura 20G; 6H; 6I**). Também foi observado um aumento de pseudo-hifas ou hifas verdadeiras e blastoconídeos para o biofilme formado com CEF e

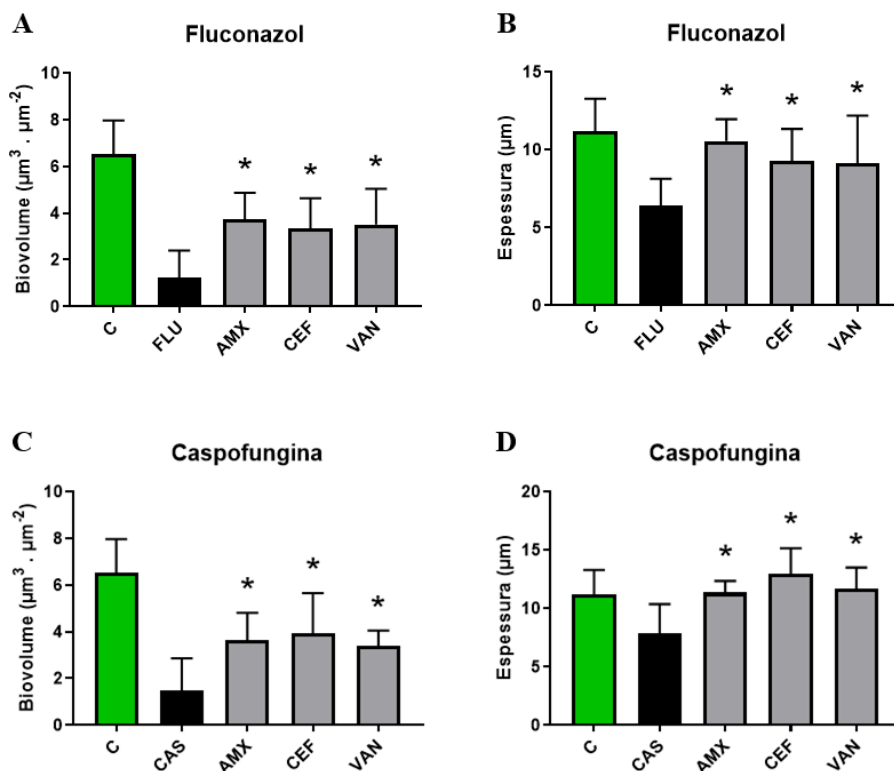
VAN, respectivamente (**Figura 20H; 6I**). Além disso, foi observado um aumento significativo de biovolume e espessura para os biofilmes formados com antibacterianos (AMX, CEF e VAN) e posteriormente tratados com CAS, quando comparados ao controle de crescimento formado apenas com meio de cultivo (**Figura 21C; 22D**).

Figura 20 – Imagens de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) de biofilmes de *Candida albicans* formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos e posteriormente tratados com Fluconazol ou Caspofungina



Legenda: Imagens de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) de biofilmes de *Candida albicans* (CRN18) formados em meio RPMI sem antibacterianos (A, B e F) ou suplementado com AMX (C e G), CEF (D e H) ou VAN (E e I) na concentração de PP e posteriormente tratados com FLC a 40 µg/ml (B-E) ou CAS a 0,31 µg/ml (F-I). Ampliação: 400x.

Figura 21 – Sensibilidade ao Fluconazol ou Caspofungina em face do biovolume e espessura dos biofilmes de *Candida albicans* formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos

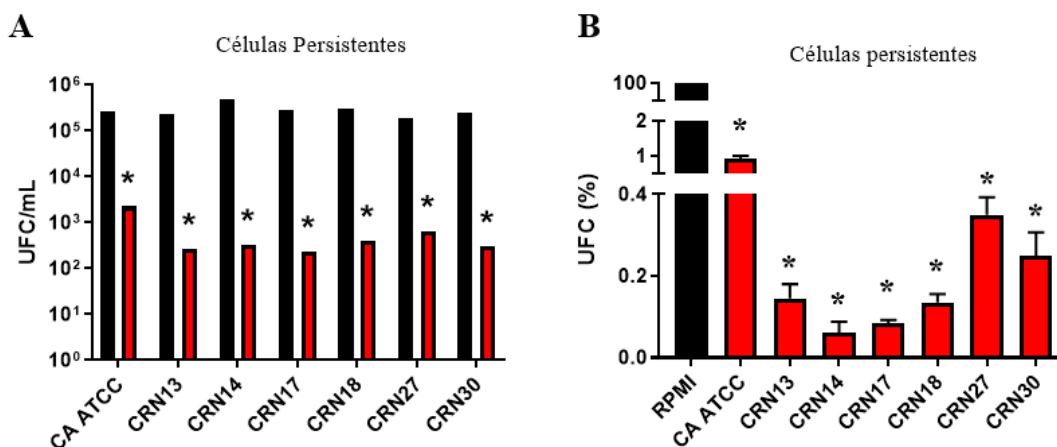


Legenda: Sensibilidade ao **Fluconazol (FLC)** ou **Caspofungina (CAS)** em face do biovolume (A, C) e à espessura (B, D) dos biofilmes de *Candida albicans* formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos: amoxicilina - AMX, cefepime - CEF ou vancomicina - VAN na concentração de PP e posteriormente tratados com FLC a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ou CAS a 0,31 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (barras cinzas) analisados por microscopia confocal de varredura a laser – CLSM. Controle de crescimento livre de drogas representado por barras verdes. Asteriscos (*) representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparadas aos biofilmes formados apenas em meio de cultivo e posteriormente tratados com FLC ou CAS (barras pretas).

2ª PARTE EXPERIMENTAL

6.4 CÉLULAS PERSISTENTES

A contagem de unidade formadora de colônias (UFC/mL) evidenciou a presença de células persistentes em todos os biofilmes de *C. albicans* (n=6) após exposição à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AMB (**Figura 22A**). A contagem do número de células variou entre 2,5 à 6 x 10² CFU/ml para *C. albicans*. Os controles de crescimento dos biofilmes variaram de 1,8 à 3 x 10⁵ UFC/mL. As células persistentes consistiram em até 0,3% das células viáveis presentes nos biofilmes de *C. albicans* isoladas de fungemia (**Figura 22B**).

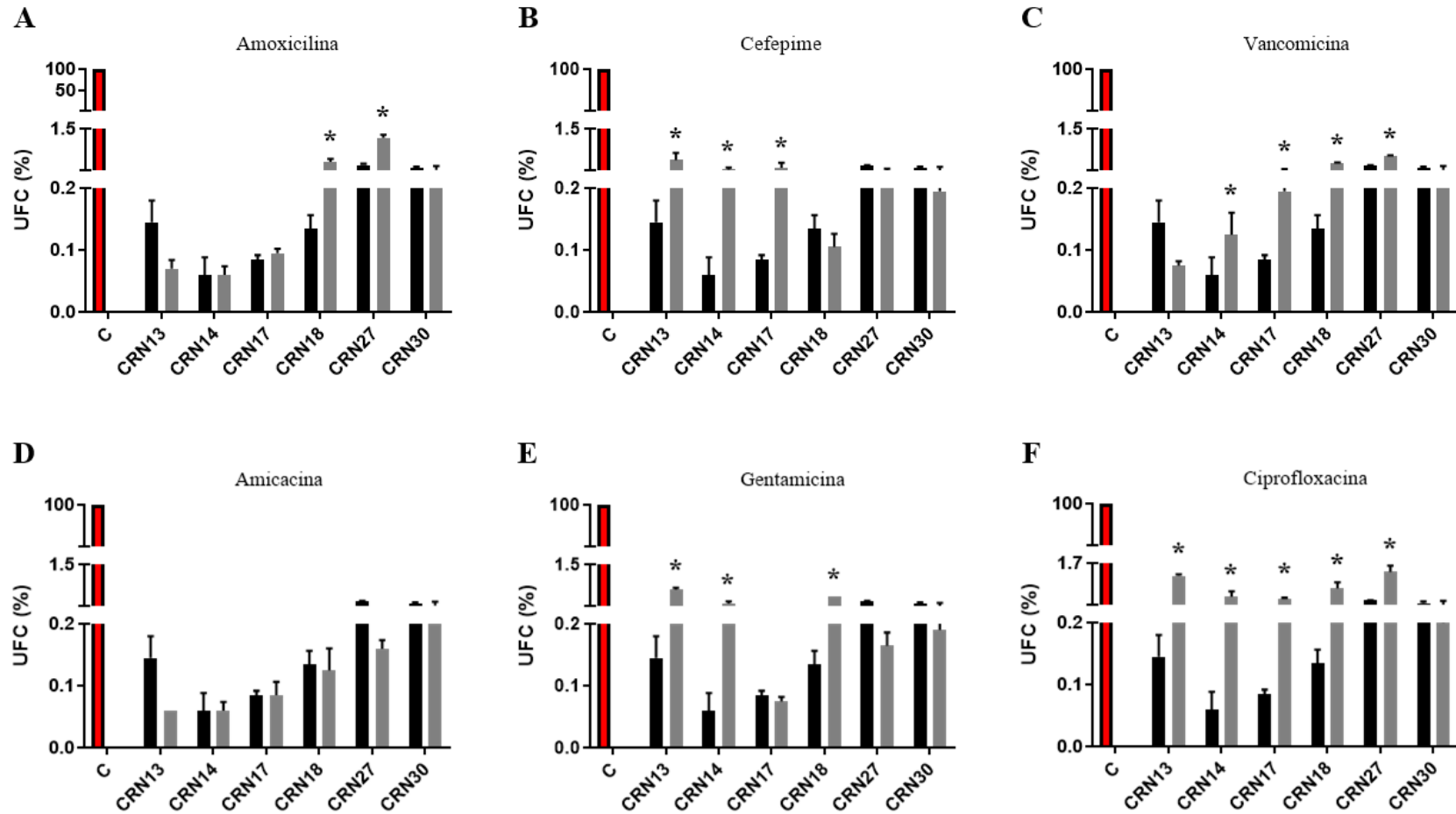
Figura 22 – Detecção de células persistentes em biofilmes de *C. albicans*.

Legenda: Dados expressos em unidades formadoras de colônias - CFU/mL (A) e porcentagem (B). Células persistentes extraídas de biofilmes maduros após tratamento com AMB a 100 µg/ml (barras vermelhas). Controles de crescimento dos biofilmes cultivados em meio de cultivo e não tratados com AMB (barras pretas). Os valores são apresentados como média ± DP. Asteriscos (*) representam diferença estatística significativa quando comparadas aos seus respectivos controle de crescimento ($p < 0,05$).

6.4.1 Detecção de células persistentes em biofilmes de *C. albicans* formados com antibacterianos

Foi observado um aumento do número de CP ($p < 0,05$) em biofilmes formados em meio RPMI suplementado com AMX, CEF, VAN, GEN ou CIP, quando comparados aos controles cultivados em meio RPMI sem antibacterianos (**Figura 23**). AMX estimulou 2/6 cepas de *C. albicans* isoladas de fungemia, aumentando em até 3x o número de células persistentes quando comparado ao controle livre de drogas. O CEF e a GEN foram capazes de estimular 3/6 cepas testadas, elevando em até 4x e 5x o número de células persistentes, respectivamente. As maiores variações no número de CP foram observadas em biofilmes formados com VAN e CIP, estimulando 4/6 e 5/6 cepas, respectivamente. O aumento do número de células persistentes foi de até 3x para VAN e variou de 4x a 8x para CIP, quando comparado ao controle formado apenas com meio de cultivo. Os biofilmes de *C. albicans* formados com AMK, não apresentaram diferenças estatísticas significativas na produção de células persistentes.

Figura 23 – Detecção de células persistentes em biofilmes de *Candida albicans* formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos



Legenda: Células persistentes (CP) extraídas de biofilmes maduros de *Candida albicans* formados em meio RPMI (barras pretas) ou meio RPMI suplementado com antibacterianos na concentração de PP de cada droga (barras cinzas). Asteriscos (*) representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparadas as CP extraídas de biofilmes formados apenas em meio de cultivo. Controles de crescimento dos biofilmes cultivados em meio RPMI e não tratados com AMB à 100 µg/ml (barras vermelhas).

6.4.2 Sensibilidade de células persistentes frente à AMB

Para confirmar que a recuperação era efetivamente de CP, foi avaliado o perfil de sensibilidade frente a AMB para células planctônicas, células de biofilme e CP de *C. albicans* isoladas após contato com antibacterianos: AMX, CEF, VAN, AMK, GEN e CIP (**Tabela 10**). Os testes controles com células planctônicas e células isoladas dos biofilmes maduros, formados apenas com meio de cultivo, foram sensíveis a AMB, com CIM variando em 0,125 a 1 µg/ml e 0,125 a 0,5 µg/ml, respectivamente. As células persistentes obtidas de biofilmes cultivados com ou sem antimicrobianos (AMX, CEF, VAN, AMK, GEN e CIP) também evidenciaram uma sensibilidade à AMB, com valores de CIM variando de 0,062 a 0,25 µg/ml. Além disso, as CIM's planctônicos de AMB para as cepas controle *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 estavam de acordo com as diretrizes do CLSI (CLSI, 2008), validando os testes realizados.

6.4.3 Estrutura e morfologia das células persistentes

A morfologia das CP de *C. albicans* (CRN18) foi avaliada por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) (**Figura 24**). O biofilme controle formado em meio de cultivo livre de antibacterianos, apresentou uma estrutura robusta, com elevada densidade, presença de blastoconídeos e pseudo-hifas preservadas no interior do biofilme. AMB na concentração de 100 µg/ml foi capaz de desestruturar o biofilme, rompendo sua estrutura tridimensional, apresentando escassez de matriz extracelular, poucos blastoconídeos viáveis (células persistentes) e/ou danificados. Os biofilmes formados com antibacterianos (AMO, VAN, GEN e CIP) e posteriormente tratados com AMB à 100 µg/ml, demonstraram um maior número de blastoconídeos viáveis quando comparados ao biofilme formado apenas em meio de cultivo e posteriormente tratado com AMB.

Tabela 10. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) de anfotericina B frente as células planctônicas, células de biofilme e células persistentes de *Candida albicans* isoladas após contato com antibacterianos: amoxicilina, cefepime, vancomicina, amicacina, gentamicina e ciprofloxacina.

Cepas	AMB (µg/ml)								
	Células planctônicas ^a	Células de biofilme ^b	Células persistentes ^c	Células persistentes (AMX) ^d	Células persistentes (CEF) ^e	Células persistentes (VAN) ^f	Células persistentes (AMK) ^g	Células persistentes (GEN) ^h	Células persistentes (CIP) ⁱ
CRN13	0,5	0,25	0,062	0,062	0,062	0,125	0,062	0,062	0,062
CRN14	0,5	0,25	0,062	0,062	0,062	0,125	0,062	0,062	0,125
CRN17	0,5	0,25	0,062	0,062	0,062	0,062	0,062	0,062	0,125
CRN18	1	0,25	0,062	0,125	0,062	0,125	0,062	0,125	0,062
CRN27	0,5	0,125	0,125	0,062	0,125	0,125	0,062	0,062	0,062
CRN30	0,125	0,5	0,25	0,125	0,125	0,25	0,062	0,125	0,25
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Notas: AMB: anfotericina B; AMX: amoxicilina; CEF: cefepime; VAN: vancomicina; AMK: amicacina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacina. NA: não se aplica. CIM: concentração inibitória mínima referente a 100%. As CIMs são expressas em µg/mL.

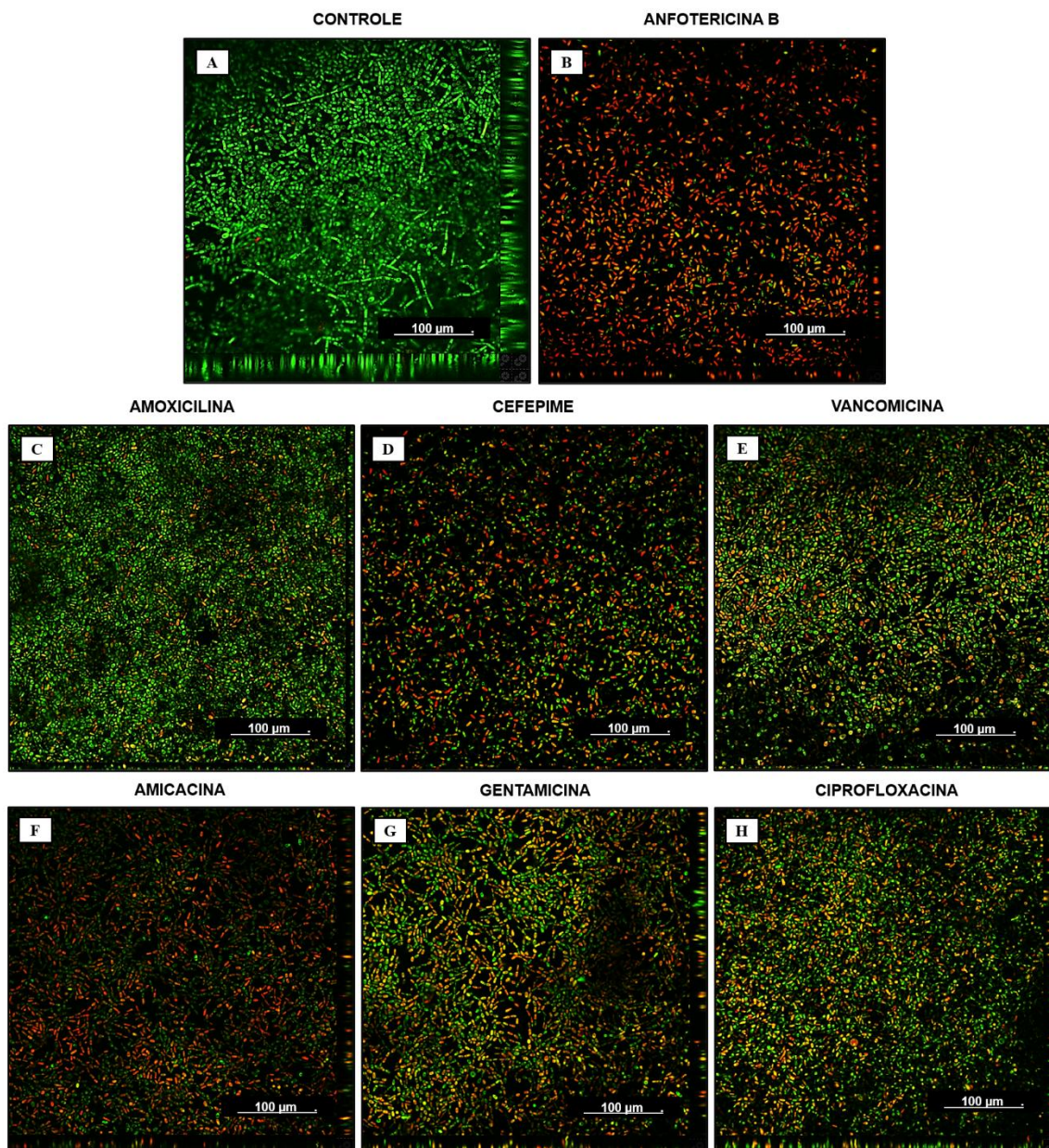
a. Células planctônicas cultivadas em RPMI sem antibacterianos.

b. Células desagregadas de biofilmes maduros (48 h) formadas em RPMI sem antibacterianos.

c. Células Persistentes de biofilmes maduros (48 h) formadas em RPMI sem antibacterianos.

d - i. Células Persistentes de biofilmes maduros (48 h) formadas em RPMI suplementado com AMX, CEF, VAN, AMK, GEN ou CIP em concentrações de PP.

Figura 24 – Imagens de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) de células persistentes em biofilmes de *Candida albicans* formados em meio RPMI suplementado com antibacterianos



Legenda: As células sésseis foram cultivadas em meio RPMI livre de drogas (A, B) ou suplementado com AMX (C), CEF (D), VAN (E), AMK (F), GEN (G) e CIP (H) nas concentrações de PP. Biofilmes maduros (48 h) foram desafiados com 100 mg/mL de AMB (B, C, D, E, F, G, H) para detecção de CP. As células viáveis são mostradas em verde e as células inviáveis/danificadas são evidenciadas em amarelo/vermelho após coloração com SYTO9 e iodeto de propídio, respectivamente. Ampliação: 400x.

7. DISCUSSÃO

A candidemia é uma das principais causas de infecções fúngicas invasivas (IFIs) associadas aos cuidados de saúde nos Estados Unidos (ROSSOW et al., 2020; MAGILL et al., 2018). Além disso, é considerada uma infecção emergente dramaticamente representada pela elevada morbi-mortalidade no ambiente hospitalar (THOMAS-RUDEL et al., 2022; PAPPAS et al., 2018; CLEVELAND et al., 2015; MAGILL et al., 2014). Estudos epidemiológicos realizados em diversos países do mundo, como Brasil, Estados Unidos, Canadá, França, Dinamarca, Japão, China e Austrália, demonstram que *Candida albicans* é o principal patógeno fúngico isolado, com mortalidade atribuída em até 60% dos casos diagnosticados (BOURASSA-BLANCHETTE et al., 2023; VANNINI et al., 2022; KAJIHARA et al., 2022; MEDEIROS et al., 2019; XIAO et al., 2019; WEBB et al., 2018; ASTVAD et al., 2018; CHAPMAN et al., 2016), além de ocupar o quarto lugar dentre os principais microrganismos isolados em sepse hospitalar nos EUA (MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021; WALL et al., 2019; MAGILL et al., 2018).

A colonização por *Candida* spp. é considerada um pré-requisito para o surgimento da candidemia (BASMACIYAN et al., 2019). As alterações na microbiota, bem como o enfraquecimento do sistema imune do hospedeiro, favorecem os fatores de virulência presentes nas espécies de *Candida*, levando a sua transição da forma comensal para forma oportunista (MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021; BASMACIYAN et al., 2019; PAPPAS et al., 2018). Existem três condições principais que predispõem à infecção invasiva: imunossupressão, quebra das barreiras de proteção (gastrointestinais e cutâneas) e uso prolongado e repetitivo de antibióticos de amplo espectro (PAPPAS et al., 2018; FAN et al., 2015; KULLBERG e ARENDRUP, 2015; GOW et al., 2011).

A influência dos antibióticos na microbiota é descrita há bastante tempo, Maclean (1962) sugeriu que a candidíase poderia aumentar em pacientes tratados com antibiótico de amplo espectro (tetraciclina). Um estudo realizado em um hospital português e conduzido por Costa-de-Oliveira et al., 2008, revelou que 93% dos pacientes com fungemia fizeram uso de antibacterianos e que 68% desses pacientes estavam em tratamento com dois ou mais fármacos. Esses achados são preocupantes, pois já é descrito que a candidíase mucocutânea está associada à terapia antibacteriana (AZEVEDO et al., 2015). Xu e colaboradores (2008), demonstraram que o uso de antibióticos orais em ciclos curtos

(período de 4 a 6 semanas) podem induzir a prevalência da colonização vaginal por *Candida* spp., bem como o aumento da incidência de candidíase vulvovaginal sintomática. Esses resultados podem afirmar que o uso de antibióticos parece ser um fator de risco para o surgimento da candidíase vulvovaginal, além disso os autores descrevem que o risco se eleva no primeiro mês após o uso de antibióticos de amplo espectro (XU et al., 2008; SPINILLO et al., 1999; MACDONALD et al., 1993; BLUESTEIN, RUTLEDGE e LUMSDEN, 1991).

O impacto no uso de antibióticos de amplo espectro não fica restrito apenas a candidíase vulvovaginal. A colonização de mucosas (garganta, trato urinário e trato gastrointestinal) por espécies de *Candida*, pode ser evidente em pacientes com sepse bacteriana e/ou que fazem uso de antibioticoterapia (ERGIN et al., 2013). Charles et al., (2005), demonstraram que a antibioticoterapia promoveu a colonização fúngica em diversos sítios (trato urinário, respiratório e gastrointestinal) dos pacientes. Os autores sugerem uma redução profilática no uso de antibióticos, visto que a maioria dos casos de candidíase invasiva em ambiente de UTI é supostamente devido à colonização aumentada em pacientes de alto risco (MCCARTY e PAPPAS, 2016; AZEVEDO et al., 2015; CLEVELAND et al., 2015; CHARLES et al., 2005; HEDDERWICK et al., 2000). Essa colonização pode ser decorrente de um fenômeno de disbiose (SAMONIS et al., 2013; SAMONIS et al., 2006a; SAMONIS et al., 2006b). Entretanto, publicações recentes vêm demonstrando que os antibacterianos estimulam o crescimento de leveduras *in vitro*, independentemente da ocorrência da disbiose induzida por medicamentos (CORDEIRO et al., 2021b; CORDEIRO et al., 2019; CORDEIRO et al., 2018). Diante desses achados, pode-se hipotetizar que o crescimento excessivo de *Candida* é induzido diretamente pelos antibacterianos, o que facilita a disseminação do fungo em hospedeiros vulneráveis.

Nesse contexto, este estudo objetivou avaliar a atividade dos antibacterianos (ATB) na formação de biofilmes e produção de células persistentes (CP) de *Candida albicans* isoladas de fungemia. Para a primeira etapa, foi conduzido um controle de cada ATB testado. Após o preparo de cada solução estoque, foi realizada uma validação dos antibacterianos conforme a metodologia descrita pelo CLSI, 2014. O intuito foi demonstrar que os antibacterianos utilizados nos experimentos *in vitro*, estavam viáveis e com sua função bactericida preservada. Como esperado, os isolados de *Escherichia coli* ATCC

25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25213 foram sensíveis à todos os antibacterianos testados, concluindo que as soluções estoque estavam aptas a serem utilizadas nesse estudo.

Depois de validar os antibacterianos, resolvemos conhecer o perfil de sensibilidade frente aos isolados empregados neste estudo. Para isso, foi realizado um teste de sensibilidade planctônico conforme descrito pelo CLSI, 2008 e posteriormente, avaliado a capacidade de formação de biofilme. O perfil de sensibilidade encontrado foi compatível com o descrito na literatura para isolados de *C. albicans* oriundos de fungemia (GIAMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2019; DEORUKHKAR e SAINI, 2016; ANTUNES et al., 2004; COLOMBO et al., 2003). Apenas uma cepa apresentou resistência ao VRZ. Mesmo sendo uma resistência isolada, isso pode ser justificado pelo uso indiscriminado de derivados azólicos na profilaxia e tratamento da candidíase invasiva (LORTHOLARY et al., 2011; CAPOOR et al., 2005).

Para avaliar a capacidade de formação de biofilme, foi aplicada uma metodologia bem-conceituada e descrita por Stepanovic e colaboradores (2000). Como havíamos esperado, todos os isolados foram forte produtores de biofilmes, fator de virulência importante para o surgimento de infecções recorrentes. Ademais, a capacidade de *Candida* spp. de formar biofilmes em dispositivos médicos implantados (cateteres venosos centrais), representa um importante risco para o surgimento de candidemia a longo prazo (LIM et al., 2021; LOHSE et al. 2018; HOYER e COTA, 2016; MCCARTY e PAPPAS, 2016; NETT, 2016; POLKE, HUBE e JACOBSEN, 2015; NOBILE e JOHNSON, 2015; KULLBERG e ARENDRUP, 2015). O fato de isolar cepas de *C. albicans* forte produtoras de biofilmes em infecções sistêmicas, representa um pior prognóstico para esses pacientes. Isso porque os pacientes internados fazem uso de dispositivos médicos implantados, contribuindo para formação desses biofilmes e elevando o risco de morbi-mortalidade no ambiente hospitalar.

Após comprovar que todos os isolados foram forte produtores de biofilmes, foi avaliada a influência dos antibacterianos: AMX, CEF e VAN na formação dos biofilmes de *C. albicans* conforme a metodologia descrita por Cordeiro et al. (2019). Além disso, com a finalidade de simular a ação dos antibacterianos sobre a microbiota humana, investigou-se também, o efeito do lisado celular de *E. coli* ATCC 25922 (LCE) na formação dos biofilmes. Os resultados obtidos evidenciaram que os biofilmes formados em meio de cultivo suplementado com antibacterianos AMX, CEF, VAN ou LCE, apresentaram um

aumento de até 48%, 70%, 50% e 30% respectivamente, quando comparados ao controle formado apenas em meio de cultura. Os resultados descritos para AMX e CEF corroboram com o estudo de Cordeiro e colaboradores (2019), demonstrando que CEF e AMX na concentração de PP, estimulam a formação dos biofilmes de *C. albicans*. Embora não tenham realizados testes moleculares, os autores sugerem que a AMX e CEF podem regular positivamente a expressão de vários genes, incluindo aqueles relacionados ao crescimento e virulência de *C. albicans* (CORDEIRO et al., 2019). É importante destacar uma limitação nos resultados obtidos por Cordeiro et al., (2019), o estudo foi conduzido apenas com a cepa de *C. albicans* ATCC10231. Entretanto, nós ampliamos o número de cepas, fortalecemos os resultados e evidenciamos que nem todos os isolados foram afetados, podendo ocorrer variações específicas entre linhagens da mesma espécie.

Os resultados obtidos para VAN foram semelhantes aos descritos por Maione e colaboradores (2022), os autores evidenciaram que a formação do biofilme de *C. auris* é promovida na presença de VAN (concentração de PP) em meio de cultura. Além disso, o estudo mostra o efeito estimulatório da VAN frente a virulência de *C. auris* em modelo experimental com larvas de *Galleria mellonella*. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos por Cordeiro et al., (2021), descrevendo um estímulo na formação dos biofilmes de *Trichosporon* spp. com VAN e favorecendo a virulência frente ao nematoide *Caenorhabditis elegans*. Entretanto, até o momento, os mecanismos de ação da VAN não foram profundamente investigados.

O aumento dos biofilmes formados em contato com o LCE, pode ser justificado pelos componentes presentes após a lise bacteriana, destacando: proteínas, aminoácidos, LPS, peptidoglicano e DNA extracelular (DNAe). A matriz extracelular (MEC) dos biofilmes de *C. albicans* consistem predominantemente de carboidratos, mas também inclui proteínas (AL-FATTANI e DOUGLAS, 2006). Diante disso, supomos que um aumento dessas moléculas em meio de cultivo, podem favorecer um biofilme mais robusto. Outra molécula importante é o LPS, sendo considerada um importante imunomodulador presente na parede celular de bactérias Gram negativas, podendo reagir diretamente com as células fúngicas e aumentar sua virulência (ROGERS et al., 2013). Ademais, um estudo conduzido por XU e colaboradores (2008), evidenciou que as subunidades de peptidoglicano (muramyl dipeptídeos), estimulam a transição de levedura para hifa, fator relacionado com a formação

de biofilme de *C. albicans* (PONDE et al., 2021; KOVACS e MAJOROS, 2020; POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015; RAMAGE et al., 2012).

O estímulo dos biofilmes de *C. albicans* decorrente da presença de LCE em meio de cultura, também pode ser justificado pela presença de DNAe de *E. coli*. O DNAe pode ter diversas funções no biofilme, como: (1) componente estrutural de comunidades sésseis e sua MEC; (2) fonte nutricional; (3) trocas genéticas dentro do biofilme e (4) resistência a antimicrobianos (PEREIRA et al., 2022; KARYGIANNI et al., 2020; IBÁÑEZ DE ALDECOA; ZAFRA e GONZÁLEZ-PASTOR, 2017). Estudos anteriores provaram que o DNA exógeno é capaz de aumentar a adesão celular e a formação de biofilme em diversos fungos, como: *C. albicans* (MARTINS et al., 2010), *Aspergillus fumigatus* (SHOPOVA et al., 2013), *C. glabrata*, *C. tropicalis* (SAPAAR et al., 2014), *Trichosporon asahii* e *T. inkin* (PEREIRA et al., 2022). Diante disso, o conjunto dessas moléculas podem contribuir positivamente na produção de um biofilme mais robusto, podendo ocasionar falha na terapia antifúngica.

Como a resistência é uma característica dos biofilmes fúngicos (CAVALEIRO e TEIXEIRA, 2018; POLKE, HUBE e JACOBSEN, 2015; RAMAGE et al., 2012), ao investigarmos a sensibilidade dos biofilmes formados em contato com os ATB e LCE frente aos antifúngicos FLC, CAS e AMB, usados no tratamento de candidemias (PAPPAS et al., 2018), foi possível observar que os biofilmes apresentaram maior tolerância ao tratamento com FLC e CAS. Estes resultados representam evidência de um agregado mais robusto, tendo em vista que a elevada tolerância aos antifúngicos está amplamente associada à espessura dos biofilmes (MAIONE et al., 2022; PEREIRA et al., 2022).

Em estudos anteriores, já foram evidenciados múltiplos mecanismos de resistência aos azólicos (Exemplo: FLC) em isolados clínicos de *C. albicans*, incluindo superexpressão de bomba de efluxo (codificados por CDR1, CDR2 e MDR1), mutações na enzima lanosterol 14 α -desmetilase (reduzindo a ligação aos azólicos) e aumento da expressão do gene *ERG11* (envolvido na biossíntese do ergosterol) (TEO et al., 2019; HENRY, NICKELS e EDLIND, 2000; LOPEZ-RIBOT et al., 1998; FRANZ et al., 1998; SANGLARD et al., 1998; WHITE et al., 1997a; WHITE et al., 1997b; SANGLARD et al., 1995). Embora não tenhamos testado até o momento esses fatores de virulência, supomos que a presença de ATB e LCE na formação dos biofilmes, podem contribuir estimulando esses mecanismos.

O estudo conduzido por Maione e colaboradores (2022), corroboram com a nossa hipótese, os autores quantificaram os genes *ERG11*, *ALS5* (responsável por codificar proteínas relacionadas a adesão celular), *FKS1* (codifica a enzima β -1,3-glucana sintase, envolvida na síntese da parede celular) e *HOG1* (relacionado ao estresse celular) presentes nos biofilmes de *C. auris* formados em contato com VAN. Os resultados obtidos para os genes *FKS1* e *HOG1* foram ligeiramente aumentados, porém a expressão do gene *ERG11* foi duas vezes maior. Os autores sugerem que a VAN pode atuar como um fator de sobrevivência para *C. auris*, promovendo a biossíntese de ergosterol (MAIONE et al., 2022). Além disso, esse aumento do gene *ERG11* promovido pela VAN, pode estar contribuindo com a resistência dos biofilmes frente ao FLC.

O discreto aumento no gene *FKS1* talvez esteja envolvido na tolerância a CAS, tendo em vista que a CAS age diretamente na inibição da enzima β -D-glucana sintase, necessária para formação da parede celular de *C. albicans* (ABUHAMMOUR e HABTE-GABER, 2004). Além disso, outro fator contribuinte para tolerância aumentada a CAS, pode ser decorrente do aumento na produção de quitina frente aos biofilmes formados em contato com AMX (CORDEIRO et al., 2019). Lee e colaboradores (2012) descrevem que a elevada quantidade de quitina na parede celular de *C. albicans*, confere maior resistência *in vivo* à CAS. Embora o mecanismo preciso de resistência antifúngica mediada pelos ATB e LCE seja desconhecido, acreditamos que esses achados podem estar diretamente ligados a tolerância ao FLC e a CAS. Além disso, as moléculas antifúngicas podem não conseguir penetrar adequadamente através do biofilme mais espesso, dificultado sua atividade.

Apesar da VAN aumentar diretamente a expressão do gene *ERG11* e possivelmente contribuir para resistência ao FLU (MAIONE et al., 2022), não foram observadas diferenças estatísticas significativas no tratamento dos biofilmes frente a AMB. Talvez isso possa estar associado ao mecanismo de ação de cada antifúngico, sendo que o FLC é fungistático e a AMB é fungicida, se ligando ao ergosterol, aumentando a permeabilidade e causando a morte celular através do efluxo de nutrientes e íons essenciais (ABUHAMMOUR e HABTE-GABER, 2004). Os resultados obtidos para CAS e AMB corroboram com o estudo de Cordeiro et al., (2019), no qual os autores demonstraram que os biofilmes formados com AMX, apresentam maior tolerância a CAS e não impactam na atividade fungicida da AMB. Entretanto, diferentemente do que nós encontramos, o estudo não evidenciou diferença estatística significativa para o FLC. Esses achados também podem

ser justificados pelo pequeno número de cepas testado, visto que essa tolerância também é cepa dependente.

Visando compreender as diferenças morfológicas presentes nos biofilmes formados em meio de cultura suplementado com ATB, foi avaliada a estrutura dos biofilmes por MEV e CLSM. Para AMX, CEF e VAN, foi observado um aumento na produção de blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. Os resultados obtidos para CEF e AMX, foram compatíveis com o estudo de Cordeiro et al., (2019), descrevendo também um aumento na presença de blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas verdadeiras nos biofilmes de *C. albicans* formados na presença dos ATB citados. Entretanto, diferentemente do que foi descrito pelos autores, não observamos um aumento significativo no biovolume e na espessura dos biofilmes para AMX. Isso pode ser justificado pelo discreto aumento no desvio padrão dos gráficos e pela resposta cepa dependente de cada ATB testado. Além disso, a cepa utilizada no estudo de Cordeiro et al., (2019) foi isolada de trato respiratório, sendo a AMX uma das principais escolhas para o tratamento de infecções respiratórias, diferente da cepa empregada neste estudo (isolada de sangue), com maior possibilidade de exposição prévia a antibacterianos sistêmicos. Já os resultados obtidos para VAN, corroboram com o estudo de Cordeiro e colaboradores (2021b), os autores descrevem um aumento na MEC dos biofilmes de *Trichosporon* spp. formados na presença de VAN.

Dando continuidade à análise morfológica dos biofilmes suplementados com ATB, também avaliamos por CLSM, a tolerância dos biofilmes frente ao FLC e CAS. Após a análise dos biofilmes tratados com FLC, é possível observar um aumento no número de pseudo-hifas e blastoconídeos na presença de CEF e VAN, respectivamente. Essas mudanças morfológicas podem estar sendo estimuladas em condições de crescimento desfavoráveis ou na presença de um ambiente hostil gerado pelos ATB (LIM et al., 2012). Além disso, é importante frisar que a tolerância ao FLC impacta diretamente no tratamento da candidemia, pois os azólicos são considerados agentes de segunda linha para terapia inicial e primeira linha para a terapia de redução (PAPPAS et al., 2018). Já os biofilmes formados em contato com os ATB e posteriormente tratados com CAS, apresentaram um aumento no número de células viáveis, com estruturas visivelmente bem preservadas. Esses resultados podem ter grande repercussão na prática médica, uma vez que a CAS é considerada a primeira opção terapêutica no tratamento das IFS por *Candida* spp. (PAPPAS et al., 2018).

A capacidade de *C. albicans* em formar biofilme é um aspecto importante para resistência antifúngica. Diversos mecanismos de tolerância são descritos em biofilmes maduros, dentre eles podemos destacar: a impenetrabilidade da matriz, inibição da fagocitose por neutrófilos e macrófagos, sequestro de antifúngicos, presença de enzimas e nutrientes na matriz, super expressão de bombas de efluxo e detecção de CP (POLKE, HUBE e JACOBSEN, 2015). As CP reduzem o seu metabolismo e usam uma variedade de mecanismos para lidar com o estresse reativo da oxidase, sobrevivendo a elevadas concentrações de drogas fungicidas (MCCARTY, WHITE e PAPPAS, 2021; NETT e ANDES, 2020; WUYTS, VAN DIJCK e HOLTAPPELS, 2018; RAMAGE et al., 2012; LAFLEUR, KUMAMOTO e LEWIS, 2006). Atualmente, já é descrito que as CP podem ser encontradas em diversos microrganismos, incluindo bactérias (*Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) e fungos (*Trichosporon* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *C. krusei* e *C. albicans*) (CORDEIRO et al., 2021b; DEFRAINE, FAUVART e MICHIELS, 2018; BOJSEN, REGENBERG e FOLKESSON, 2014; AL-DHAHERI e DOUGLAS, 2008; LAFLEUR, KUMAMOTO e LEWIS, 2006).

Diante do exposto, para a segunda etapa deste estudo, foi analisada e quantificada a produção de células persistentes segundo LaFleur, Kumamoto e Lewis (2006). Os resultados obtidos, evidenciaram que todos os isolados testados foram produtores de CP, com uma porcentagem variando entre 0,09% a 0,38%. Estes achados foram semelhantes aos obtidos por LaFleur, Kumamoto e Lewis (2006), os autores descreveram que as proporções de CP em biofilmes de *C. albicans* devem variar entre 0,1% a 2% para diferentes isolados. Resultados similares foram encontrados em outro estudo conduzido por Li e colaboradores (2015), com frações de CP no biofilme de *Candida* spp. (exceto *C. glabrata*) variando entre 0,01% a 0,5%. Entretanto, Denega, d'Enfert e Bachellier-Bassi (2019), não conseguiram reproduzir a metodologia descrita por LaFleur, apresentando resultados inferiores a 0,01% de CP por biofilme de *C. albicans*, mesmo após a busca por novos protocolos de recuperação. Isso pode ser explicado conforme descrito por Al-Dhaheiri e Douglas (2008), demonstrando que nem todos os isolados de *C. albicans* são capazes de produzir CP, ficando um resultado dependente da cepa ou mesmo do sítio de isolamento. Como exemplo, podemos citar os biofilmes de *C. glabrata*, espécie com baixa competência em produzir CP (WUYTS et al., 2018; AL-DHAHERI; DOUGLAS,

2008). Porém, Andrade e colaboradores (2023), demonstraram que *C. glabrata* oriunda de candidíase vulvovaginal, foi capaz de produzir CP. Os autores justificam que a dinâmica do ambiente vaginal (pH ácido, microbiota, presença de glicogênio e ácido lático) podem desencadear mecanismos de estresse oxidativo, favorecendo uma maior produção de CP.

Os mecanismos envolvidos na produção de CP ainda são pouco compreendidos. Bojsen e colaboradores (2017), sugerem que o baixo metabolismo e sua característica de dormência, diminui a expressão do sítio alvo do medicamento, resultando em fraca ou nenhuma atividade da droga frente as CP. Além disso, diferentemente da população bacteriana, LaFleur, Kumamoto e Lewis (2006) demonstraram que as CP de *C. albicans* foram encontradas apenas em culturas de biofilmes e não estavam presentes em uma população planctônica. Isso pode indicar que o biofilme, e não a população planctônica, é o modo de sobrevivência de vida da levedura, sendo o local de produção de células sobreviventes especializadas (LEWIS, 2007).

Visando expandir os resultados já descritos, foi avaliada a atividade dos antibacterianos: AMX, CEF, VAN, AMK, GEN e CIP na produção de CP em biofilmes de *C. albicans* isoladas de fungemia. De fato, o presente estudo evidenciou, pela primeira vez, o estímulo na produção de CP frente aos biofilmes de *C. albicans* formados com os antibacterianos AMX, CEF, VAN, GEN e CIP, apresentando aumento de até 11x, 5x, 6x, 5x e 12x, respectivamente. Esses resultados corroboram com o estudo de Cordeiro et al. (2021), demonstrando que os biofilmes de *Trichosporon asahii* e *T. inkin* formados com VAN, estimularam a produção de CP. Esses achados podem ser justificados pela influência dos antibacterianos em produzir um biofilme mais robusto (CORDEIRO et al., 2019), dificultando a permeabilidade do fármaco e favorecendo sua tolerância à AMB. Ademais, a super expressão de genes que codificam o estado dormente dessas células, podem ser explicados pela reação ao estresse sofrido na presença dos ATB, levando ao acúmulo intracelular de glicogênio e trealose, moléculas de proteção frente ao estresse oxidativo (WUYTS, DIJCK e HOLTAPPELS, 2018).

A formação de CP também é justificada pela carência de nutrientes ou pelo estresse ambiental (FRAIHA et al., 2019). Bojsen e colaboradores (2017), especulam que esse fator contribui para a oxidação de ácidos graxos, levando a redução do ergosterol e/ou modificação estrutural da membrana plasmática, reduzindo assim a afinidade das CP com a AMB. O estresse sofrido na formação do biofilme de *C. albicans* em contato com os ATB,

pode favorecer a oxidação desses ácidos graxos, contribuindo para uma redução e/ou modificação do ergosterol presente nas células do biofilme, levando a uma maior produção de CP.

Para confirmar que a recuperação era efetivamente de CP com variação fenotípica e não com variantes mutantes, estudou-se o comportamento das CP extraídas frente a AMB. Nós evidenciamos que todas as cepas empregadas neste estudo foram sensíveis a AMB, corroborando com o resultado descrito por Cordeiro et al. (2021). Além disso, as CP isoladas de biofilmes formados em meio de cultivo livre ou suplementado com ATB, também apresentaram sensibilidade a AMB, com CIM's inferiores as células planctônicas. Esses resultados sugerem que nós conseguimos isolar CP de *C. albicans*, e que essas células são variantes fenotípicas do tipo selvagem, não mutantes.

Embora nossos dados *in vitro* provavelmente reflitam na influência dos ATB *in vivo*, existem outros fatores que não foram modelados em nossos ensaios e podem contribuir na formação dos biofilmes e produção de CP de *C. albicans*. Por exemplo: variações de pH e temperatura, uso de dispositivos médicos implantados e influência das células imunes do hospedeiro. Ademais, é preciso reconhecer algumas limitações deste estudo. A primeira limitação é decorrente da concentração fixa de cada ATB testado, pois sabemos que essas concentrações podem oscilar a nível plasmático no decorrer do tratamento. Em segundo lugar, já é descrito que os antibacterianos podem ser utilizados em paralelo ou em associação com drogas antifúngicas (STERGIOPOULOU et al., 2009; PASCOE e CULLEN, 2006; AGUSTI et al., 2003), porém a tolerância observada frente ao FLC e CAS não foram testadas mantendo o estímulo dos ATB. Talvez seja possível observar uma interação sinérgica ou antagônica entre os antifúngicos e os antibacterianos, algo que já foi descrito por Stergiopoulou e colaboradores (2009). E por fim, é notório que o efeito estimulatório dos ATB ocorre diretamente nas leveduras, isso já foi evidenciado para *Candida* spp. (MAIONE et al., 2022; CORDEIRO et al., 2019; CORDEIRO et al., 2018) e *Trichosporon* spp. (CORDEIRO et al., 2021b). Entretanto, não foram introduzidos dados moleculares para demonstrar a relação dos ATB em estimular os biofilmes, sua tolerância aos antifúngicos (FLC e CAS) e a produção de CP de *C. albicans*. Porém, estudos em andamento pretendem desvendar os mecanismos envolvidos nessas atividades.

Apesar dos mecanismos não terem sido descritos nesse trabalho, os resultados apresentados podem ter grande repercussão na prática médica, sugerindo que os pacientes

em uso de antibioticoterapia prolongada estão mais suscetíveis às IFIs. Isso ocorre devido a capacidade de *C. albicans* de formar biofilme em dispositivos médicos implantados e produzir CP, contribuindo para o fracasso terapêutico e favorecendo a recidiva das doenças.

8. CONCLUSÕES

1. Os isolados clínicos de *Candida albicans* (n=6) apresentaram sensibilidade aos antifúngicos empregados no tratamento para candidemia (fluconazol, itraconazol, voriconazol, caspofungina e anfotericina B);
2. Todas as cepas de *C. albicans* oriundas de fungemia foram fortes produtoras de biofilmes “*in vitro*”;
3. Os biofilmes formados com antibacterianos (amoxicilina, cefepime, vancomicina) e lisado celular de *Escherichia coli* ATCC 25922:
 - mostraram biofilmes mais robustos e com maior metabolismo;
 - evidenciaram maior tolerância aos antifúngicos (fluconazol e caspofungina). Entretanto, não foram observados resultados significativos para anfotericina B;
 - exibiram um biofilme mais espesso e robusto, com aumento no número de blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas verdadeiras.
4. Os biofilmes de *C. albicans* expostos a elevadas concentrações de anfotericina B foram capazes de produzir células persistentes;
5. Os biofilmes formados na presença de antibacterianos (amoxicilina, cefepime, vancomicina, gentamicina e ciprofloxacina):
 - estimularam a formação de células persistentes em biofilmes de *C. albicans*;
 - apresentam células persistentes sensíveis à anfotericina B, demonstrando que são variantes fenotípicas do tipo selvagem, não mutantes;
 - demonstraram um maior número de células persistentes quando comparados ao biofilme formado apenas em meio de cultivo.
6. Não foram observados resultados significativos para os biofilmes formados com amicacina;
7. Todos os resultados observados foram cepa dependente.

REFERÊNCIAS

ABUHAMMOUR, W. e HABTE-GABER, E. Newer antifungal agents. **Indian J Pediatr.** v. 71, n. 3, p. 253-9, 2004.

AGUSTI, C.; RAÑÓ, A.; SIBILA, O.; TORRES, A. Nosocomial pneumonia in immunosuppressed patients. **Infect Dis Clin North Am.** v. 17, n. 4, p. 785-800, 2003.

AL-DHAHERI, R.S.; DOUGLAS, L.J. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 52, n. 5, p. 1884-7, 2008.

ALEXANDER, B.D.; JOHNSON, M.D.; PFEIFFER, C.D.; JIMÉNEZ-ORTIGOSA, C.; CATANIA, J.; BOOKER, R.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, S.A.; PERLIN, D.S.; PFALLER, M.A. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. **Clin Infect Dis.** v. 56, n. 12, p. 1724-32, 2013. *Erratum in: Clin Infect Dis.* 58(5):754, 2014.

AL-FATTANI, M.A.; DOUGLAS, L.J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **J Med Microbiol.** v. 55(Pt 8), p. 999-1008, 2006.

ANDES, D.R.; SAFDAR, N.; BADDLEY, J.W.; PLAYFORD, G.; REBOLI, A.C.; REX, J.H.; SOBEL JD, PAPPAS PG, KULLBERG BJ; Mycoses Study Group. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. **Clin Infect Dis.** v. 54, n. 8, p.1110-22, 2012.

ANDRADE, A.R.C.; REZENDE, M.D.S.; PORTELA, F.V.M.; PEREIRA, L.M.G.; NASCIMENTO DA SILVA, B.; LIMA-NETO, R.G.; ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; CORDEIRO, R.A. β -Estradiol and progesterone enhance biofilm development and persister cell formation in monospecies and microcosms biofilms derived from vulvovaginal candidiasis. **Biofouling.** p. 1-11, 2023.

ANTUNES, A.G.; PASQUALOTTO, A.C.; DIAZ, M.C.; D'AZEVEDO, P.A.; SEVERO, L.C. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** v. 46, n. 5, p. 239-41, 2004.

ARENDRUP, M.C.; BILLE, J.; DANNAOUI, E.; RUHNKE, M.; HEUSSEL, C.P.; KIBBLER, C. ECIL-3 classical diagnostic procedures for the diagnosis of invasive fungal diseases in patients with leukaemia. **Bone Marrow Transplant.** v. 47, n. 8, p. 1030-45, 2012.

ARENDRUP, M.C.; CUENCA-ESTRELLA, M.; LASS-FLÖRL, C.; HOPE, W.W. Breakpoints for antifungal agents: an update from EUCAST focussing on echinocandins against *Candida* spp. and triazoles against *Aspergillus* spp. **Drug Resist Updat.** v. 16, n. 6, p. 81-95, 2013.

ARENDRUP, M.C.; MELETIADIS, J.; MOUTON, J.W.; GUINEA, J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; LAGROU, K.; HOWARD, S.J.; Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST technical note on isavuconazole breakpoints for *Aspergillus*, itraconazole breakpoints for *Candida* and updates for the antifungal susceptibility testing method documents. **Clin Microbiol Infect.** v. 22, n 6:571, p. e1-4, 2016.

ARENDRUP, M.C.; SULIM, S.; HOLM, A.; NIELSEN, L.; NIELSEN, S.D.; KNUDSEN, J.D.; DRENCK, N.E.; CHRISTENSEN, J.J.; JOHANSEN, H.K. Diagnostic issues, clinical characteristics, and outcomes for patients with fungemia. **J Clin Microbiol.** v. 49, n. 9, p. 3300-8, 2011.

ASTVAD, K.M.T.; JOHANSEN, H.K.; RØDER, B.L.; ROSENVINGE, F.S.; KNUDSEN, J.D.; LEMMING, L.; SCHØNHEYDER, H.C.; HARE, R.K.; KRISTENSEN, L.; NIELSEN, L.; GERTSEN, J.B.; DZAJIC, E.; PEDERSEN, M.; ØSTERGÅRD, C.; OLESEN, B.; SØNDERGAARD, T.S.; ARENDRUP, M.C. Update from a 12-Year Nationwide Fungemia Surveillance: Increasing Intrinsic and Acquired Resistance Causes Concern. **J Clin Microbiol.** v. 56, n. 4, e01564-17, 2018.

AUDRY, C. Sur l'évolution du champignons du muguet. **Revue de Médecine (Paris).** v. 7, p. 586-95, 1887.

AUSTERMEIER, S.; PEKMEZOVIĆ, M.; PORSCHITZ, P.; LEE, S.; KICHIK, N.; MOYES, D.L.; HO, J.; KOTOWICZ, N.K.; NAGLIK, J.R.; HUBE, B.; GRESNIGT, M.S. Albumin Neutralizes Hydrophobic Toxins and Modulates *Candida albicans* Pathogenicity. **mBio.** v. 12, n. 3, e0053121, 2021.

AZEVEDO, M.M.; TEIXEIRA-SANTOS, R.; SILVA, A.P.; CRUZ, L.; RICARDO, E.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G. The effect of antibacterial and non-antibacterial compounds alone or associated with antifungals upon fungi. **Front Microbiol.** v. 6, n. 669, 2015.

BADIEE, P.; HASHEMIZADEH, Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. **Indian J. Med. Res.** v. 139, n. 2, p. 195–204, 2014.

BANDARA N, SAMARANAYAKE L. Emerging and future strategies in the management of recalcitrant *Candida auris*. **Med Mycol.** v. 60, n. 4, 2022.

BARNETT, J.A. A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. **Yeast**. v. 25, n. 6, p. 385-417, 2008.

BARRIENTOS, A.C.M.; NOBREGA DE ALMEIDA JUNIOR, J.; LITVINOV, N.; BAIN, V.; CRISTOFANI, L.M.; BADUE PEREIRA, M.F.; SANSON YOSHINO DE PAULA, C.; LOPES MOTTA, A.; ROSSI, F.; BÁRBARO DEL NEGRO, G.M.; YAMAMOTO THOMAZ, D.; SOUSA MARQUES, H.H. Breakthrough Candidemia in Pediatric Patients With Cancer From a Brazilian Center. **Pediatr Infect Dis J**. v. 40, n. 3, p. 251-254, 2021.

BASMACIYAN, L.; BOM, F.; PARADIS, T.; LAPAQUETTE, P.; DALLE, F. "*Candida albicans* Interactions With The Host: Crossing The Intestinal Epithelial Barrier". **Tissue Barriers**. v. 7, n. 2, p. 1612661, 2019.

BASSETTI, M.; MIKULSKA, M.; VISCOLI, C. Bench-to-bedside review: therapeutic management of invasive candidiasis in the intensive care unit. **Crit Care**. v. 14, n. 6, p. 244, 2010.

BENEDICT, K.; JACKSON, B.R.; CHILLER, T.; BEER, K.D. Estimation of Direct Healthcare Costs of Fungal Diseases in the United States. **Clin Infect Dis**. v. 68, n. 11, p. 1791-1797. 2019.

BENNET J.H. On the parasitic vegetable structures found growing in living animals. **Transactions of the Royal Society of Edinburgh**. v. 15, p. 277-94, 1844.

BERG, F.T. Torsk i mikroskopiskt anatomiskt hänsende. Hygiea. **Medicinsk och Pharmaceutik Manadsskrift**. v. 3, p. 541-50, 1841.

BERMAN, J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. **Curr Opin Microbiol**. v. 9, n. 6, p. 595-601, 2006.

BIGGER, J. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. **The Lancet**. v. 244, n. 6320, p. 497-500, 1944.

BLAGOJEVIC, M.; CAMILLI, G.; MAXSON, M.; HUBE, B.; MOYES, D.L.; RICHARDSON, J.P.; NAGLIK, J.R. Candidalysin triggers epithelial cellular stresses that induce necrotic death. **Cell Microbiol**. v. 23, n. 10, e13371, 2021.

BLUESTEIN, D.; RUTLEDGE, C.; LUMSDEN, L. Predicting the occurrence of antibiotic-induced candidal vaginitis (AICV). **Fam Pract Res J**. v. 11, n. 3, p. 319-26, 1991.

BOJSEN, R.; REGENBERG, B.; FOLKESSON, A. Persistence and drug tolerance in pathogenic yeast. **Curr Genet.** v. 63, n. 1, p. 19-22, 2017.

BOJSEN, R.; REGENBERG, B.; FOLKESSON, A. *Saccharomyces cerevisiae* biofilm tolerance towards systemic antifungals depends on growth phase. **BMC Microbiol.** v. 14, p. 305, 2014.

BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R.O.; DENNING, D.W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. **J Fungi (Basel).** v. 3, n. 4, p. 57, 2017.

BOUCHARA, J.P.; DECLERCK, P.; CIMON, B.; PLANCHENAULT, C.; DE GENTILE, L.; CHABASSE, D. Routine use of CHROMagar *Candida* medium for presumptive identification of *Candida* yeast species and detection of mixed fungal populations. **Clin Microbiol Infect.** v. 2, n. 3, p. 202-208, 1996.

BOUCHERIT, Z.; SEKSEK, O.; BOLARD, J. Dormancy of *Candida albicans* cells in the presence of the polyene antibiotic amphotericin B: simple demonstration by flow cytometry. **Med Mycol.** v. 45, n. 6, p. 525-33, 2007.

BOURASSA-BLANCHETTE, S.; BIESHEUVEL, M.M.; LAM, J.C.; KIPP, A.; CHURCH, D.; CARSON, J.; DALTON, B.; PARKINS, M.D.; BARKEMA, H.W.; GREGSON, D.B. Incidence, susceptibility and outcomes of candidemia in adults living in Calgary, Alberta, Canada (2010-2018). **BMC Infect Dis.** v. 23, n. 1, p. 100, 2023.

BRANDT, M.E. e LOCKHART, S.R. Recent Taxonomic Developments with *Candida* and Other Opportunistic Yeasts. **Curr Fungal Infect Rep.** v. 6, n. 3, p. 170-177, 2012.

BRUNTON, L.; KNOLLMAN, B.; HILAL-DANDAN, R. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (13th Edition)**. McGraw-Hill Medical, New York, USA (2018).

BRYAN, A.M.; DEL POETA, M. Secretory aspartyl proteinases induce neutrophil chemotaxis in vivo. **Virulence.** v. 7, n. 7, p. 737-9, 2016.

BUSH, K. e BRADFORD, P.A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harb Perspect Med.** v. 6, n. 8, a025247, 2016.

CAPOOR, M. R.; NAIR, D.; DEB, M.; VERMA, P. K.; SRIVASTAVA, L.; AGGARWAL, P. Emergence of non-albicans *Candida* species and antifungal resistance in a tertiary care hospital. **Jpn. J. Infect. Dis.** v. 58, n. 6, p. 344, 2005.

CATEAU, E.; COGNEE, A.S.; TRAN, T.C.; VALLADE, E.; GARCIA, M.; BELAZ, S.; KAUFFMANN-LACROIX, C.; RODIER, M.H. Impact of yeast-bacteria coinfection on the detection of *Candida* sp. in an automated blood culture system. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 72, n. 4, p. 328-31, 2012.

CAUCHIE, M.; DESMET, S.; LAGROU, K. *Candida* and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen. **Research in Microbiology.** v. 168, n. 9-10, p. 802-810, 2017.

CAVALEIRO, M. e TEIXEIRA, M.C. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. **Front Med (Lausanne).** v. 5, n. 28, 2018.

CDC. *Candida auris* clinical update. **Centers for Disease Control and Prevention**, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). Updated a June 2016.

CHAPMAN, B.; SLAVIN, M.; MARRIOTT, D.; HALLIDAY, C.; KIDD, S.; ARTHUR, I.; BAK, N.; HEATH, C.H.; KENNEDY, K.; MORRISSEY, C.O.; SORRELL, T.C.; VAN HAL, S.; KEIGHLEY, C.; GOEMAN, E.; UNDERWOOD, N.; HAJKOWICZ, K.; HOFMEYR, A.; LEUNG, M.; MACESIC, N.; BOTES, J.; BLYTH, C.; COOLEY, L.; GEORGE, C.R.; KALUKOTTEGE, P.; KESSON, A.; MCMULLAN, B.; BAIRD, R.; ROBSON, J.; KORMAN, T.M.; PENDLE, S.; WEEKS, K.; LIU, E.; CHEONG, E.; CHEN, S. Australian and New Zealand Mycoses Interest Group. Changing epidemiology of candidaemia in Australia. **J Antimicrob Chemother.** v. 72, n. 4, p. 1103-1108, 2016.

CHARLES, P.E.; DALLE, F.; AUBE, H.; DOISE, J.M.; QUENOT, J.P.; AHO, L.S.; CHAVANET, P.; BLETTERY, B. *Candida* spp. colonization significance in critically ill medical patients: a prospective study. **Intensive Care Med.** v. 31, n. 3, p. 393-400, 2005.

CHAY, L.Y.A.; DENNING, D.W.; WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. **Critical Reviews in Microbiology.** v. 36, n. 4, p. 282-298, 2010.

CHEN, H.; ZHOU, X.; REN, B.; CHENG, L. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. **Virulence.** v. 11, n. 1, p. 337-348, 2020.

CHOWDHARY, A.; SHARMA, C. e MEIS, J.F. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLoS Pathog.** v. 13, n. 5, e1006290, 2017.

CLANCY CJ, NGUYEN MH. Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. **Clin Infect Dis.** v. 56, n. 9, p. 1284-92, 2013.

CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H. Undiagnosed invasive candidiasis: incorporating non-culture diagnostics into rational prophylactic and preemptive antifungal strategies. **Expert Rev Anti Infect Ther.** v. 12, n. 7, p. 731-4, 2014.

CLEVELAND, A.A.; FARLEY, M.M.; HARRISON, L.H.; STEIN, B.; HOLLICK, R.; LOCKHART, S.R.; MAGILL, S.S.; DERADO, G.; PARK, B.J.; CHILLER, T.M. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. **Clin Infect Dis.** v. 55, n. 10, p. 1352-61, 2012.

CLEVELAND, A.A.; HARRISON, L.H.; FARLEY, M.M.; HOLLICK, R.; STEIN, B.; CHILLER, T.M.; LOCKHART, S.R.; PARK, B.J. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance. **PLoS One.** v. 10, n. 3, e0120452, 2015.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing;** Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2014.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.** Approved Standard – Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2008.

COHEN, N.R.; LOBRITZ, M.A.; COLLINS, J.J. Microbial persistence and the road to drug resistance. **Cell Host Microbe.** v. 13, n. 6, p. 632-42, 2013.

COLLINS, T.J. ImageJ for microscopy. **Biotechniques.** v. 43, p. 25–30. 2007.

COLOMBO, A.L.; NAKAGAWA, Z.; VALDETARO, F.; BRANCHINI, M.L.; KUSSANO, E.J.; NUCCI, M. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp. collected from Brazilian tertiary care hospitals. **Med Mycol.** v. 41, n. 3, p. 235-9, 2003.

CORDEIRO, R.A.; AGUIAR, A.L.R.; DA SILVA, B.N.; PEREIRA, L.M.G.; PORTELA, F.V.M.; DE CAMARGO, Z.P.; DE LIMA-NETO, R.G.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.C. *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin* Biofilms Produce Antifungal-Tolerant Persister Cells. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 11, n. 645812, 2021a.

CORDEIRO, R.A.; EVANGELISTA, A.J.J.; SERPA, R.; ANDRADE, A.R.C.; MENDES, P.B.L.; OLIVEIRA, J.S.; ALENCAR, L.P.; PEREIRA, V.S.; LIMA-NETO, R.G.; BRILHANTE, R.N.; SIDRIM, J.J.C.; MAIA, D.C.B.S.C.; ROCHA, M.F.G. Cefepime and

Amoxicillin Increase Metabolism and Enhance Caspofungin Tolerance of *Candida albicans* Biofilms. **Front Microbiol.** v. 10, n. 1337, 2019.

CORDEIRO, R.A.; EVANGELISTA, A.J.J.; SERPA, R.; COLARES, A.R.C.; MENDES, P.B.L.; FRANCO, J.D.S.; DE OLIVEIRA, J.S.; DE ALENCAR, L.P.; SALES, J.A.; CAMARA, L.M.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; BRILHANTE, R.S.N.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. β -lactam antibiotics & vancomycin increase the growth & virulence of *Candida* spp. **Future Microbiol.** v. 13, p. 869-875, 2018.

CORDEIRO, R.A.; OLIVEIRA, J.S.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; TEIXEIRA, C.E.C.; MARQUES, F.J.F.; BITTENCOURT, P.V.; CARVALHO, V.L.; BANDEIRA, T.J. P.G.; BRILHANTE, R.S.N.; MOREIRA, J.L.B. *Candida tropicalis* isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors. **Med. Mycol.** v. 53, n. 2, p. 145–152, 2015.

CORDEIRO, R.A.; SERPA, R.; MENDES, P.B.L.; EVANGELISTA, A.J.J.; ANDRADE, A.R.C.; FRANCO, J.D.S.; PEREIRA, V.D.S.; ALENCAR, L.P.; OLIVEIRA, J.S.; CAMARGO, Z.P.; LIMA NETO, R.G.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; BRILHANTE, R.S.N.; ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.C.; The HIV aspartyl protease inhibitor ritonavir impairs planktonic growth, biofilm formation and proteolytic activity in *Trichosporon* spp. **Biofouling.** v. 33, n. 8, p. 640-650, 2017.

CORDEIRO, R.A.; SILVA, B.N.; AGUIAR, A.L.R.; PEREIRA, L.M.G.; PORTELA, F.V.M.; ROCHA, M.G.; PERGENTINO, M.L.M.; SANTOS SALES, G.; SOUSA, J.K.; CAMARGO, Z.P.; BRILHANTE, R.S.N.; ROCHA, M.F.G.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; SIDRIM, J.J.C. Vancomycin enhances growth and virulence of *Trichosporon* spp. planktonic cells and biofilms. **Med Mycol.** v. 59, n. 8, p. 793-801, 2021b.

CORNELY, O.A.; BASSETTI, M.; CALANDRA, T.; GARBINO, J.; KULLBERG, B.J.; LORTHOLARY, O.; MEERSSEMAN, W.; AKOVA, M.; ARENDRUP, M.C.; ARIKAN-AKDAGLI, S.; BILLE, J.; CASTAGNOLA, E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DONNELLY, J.P.; GROLL, A.H.; HERBRECHT, R.; HOPE, W.W.; JENSEN, H.E.; LASS-FLÖRL, C.; PETRIKKOS, G.; RICHARDSON, M.D.; ROILIDES, E.; VERWEIJ, P.E.; VISCOLI, C.; ULLMANN, A.J.; ESCMID Fungal Infection Study Group. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. **Clin Microbiol Infect.** v. 18, Suppl 7, p. 19-37, 2012.

CORTEGIANI, A.; MISSERI, G. e CHOWDHARY, A. What's new on emerging resistant *Candida* species. **Intensive Care Med.** v. 45, n. 4, p. 512-515, 2019.

CORTEGIANI, A.; MISSERI, G.; FASCIANA, T.; GIAMMANCO, A.; GIARRATANO, A.; CHOWDHARY, A. Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by *Candida auris*. **J Intensive Care.** v. 2018, p. 6:69, 2018.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; PINA-VAZ, C.; MENDONÇA, D.; GONÇALVES RODRIGUES, A. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v. 27, n. 5, p. 365-74, 2008.

DA SILVA, R.B.; NEVES, R.P.; HINRICHSEN, S.L.; DE LIMA-NETO, R.G. Candidemia in a public hospital in Northeastern Brazil: Epidemiological features and risk factors in critically ill patients. **Rev Iberoam Micol.** v. 36, n. 4, p. 181-185, 2019.

DANHOF, H.A.; VYLKOVA, S.; VESELY, E.M.; FORD, A.E.; GONZALEZ-GARAY, M.; LORENZ, M.C. Robust Extracellular pH Modulation by *Candida albicans* during Growth in Carboxylic Acids. **mBio.** v. 7, n. 6, e01646-16, 2016.

DAVIS, B.D.; CHEN, L.L.; TAI, P.C. Misread protein creates membrane channels: an essential step in the bactericidal action of aminoglycosides. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 83, n. 16, p. 6164-8, 1986.

DE PAUW, B.; WALSH, T.J.; DONNELLY, J.P.; STEVENS, D.A.; EDWARDS, J.E.; CALANDRA, T.; PAPPAS, P.G.; MAERTENS, J.; LORTHOLARY, O.; KAUFFMAN, C.A.; DENNING, D.W.; PATTERSON, T.F.; MASCHMEYER, G.; BILLE, J.; DISMUKES, W.E.; HERBRECHT, R.; HOPE, W.W.; KIBBLER, C.C.; KULLBERG, B.J.; MARR, K.A.; MUÑOZ, P.; ODDS, F.C.; PERFECT, J.R.; RESTREPO, A.; RUHNKE, M.; SEGAL, B.H.; SOBEL, J.D.; SORRELL, T.C.; VISCOLI, C.; WINGARD, J.R.; ZAOUTIS, T.; BENNETT, J.E.; European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. **Clin Infect Dis.** v. 46, n. 12, p. 1813-21, 2008.

DEFRAINE, V.; FAUVART, M.; MICHIELS, J. Fighting bacterial persistence: Current and emerging anti-persister strategies and therapeutics. **Drug Resist Updat.** v. 38, p. 12-26, 2018.

DEL POZO, J.L. Biofilm-related disease. **Expert Rev Anti Infect Ther.** v. 16, n. 1, p. 51-65, 2018.

DENEGA, I.; D'ENFERT, C.; BACHELLIER-BASSI, S. *Candida albicans* Biofilms Are Generally Devoid of Persister Cells. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 63, n. 5, e01979-18, 2019.

D'ENFERT, C.; KAUNE, A.K.; ALABAN, L.R.; CHAKRABORTY, S.; COLE, N.; DELAVY, M.; KOSMALA, D.; MARSAUX, B.; FRÓIS-MARTINS, R.; MORELLI, M.; ROSATI, D.; VALENTINE, M.; XIE, Z.; EMRITLOLL, Y.; WARN, P.A.; BEQUET, F.; BOUGNOUX, M.E.; BORNES, S.; GRESNIGT, M.S.; HUBE, B.; JACOBSEN, I.D.;

LEGRAND, M.; LEIBUNDGUT-LANDMANN, S.; MANICHANH, C.; MUNRO, C.A.; NETEA, M.G.; QUEIROZ, K.; ROGET, K.; THOMAS, V.; THORAL, C.; VAN DEN ABBEELE, P.; WALKER, A.W.; BROWN, A.J.P. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. **FEMS Microbiol Rev.** v. 45, n. 3, 2021.

DENNING, D.W. The ambitious '95-95 by 2025' roadmap for the diagnosis and management of fungal diseases. **Thorax.** v. 70, n. 7, p. 613-4, 2015.

DENNING, D.W.; PERLIN, D.S.; MULDOON, E.G.; COLOMBO, A.L.; CHAKRABARTI, A.; RICHARDSON, M.D.; SORRELL, T.C. Delivering on Antimicrobial Resistance Agenda Not Possible without Improving Fungal Diagnostic Capabilities. **Emerg Infect Dis.** v. 23, n. 2, p. 177-183, 2017.

DEORUKHKAR, S.C.; SAINI, S. Echinocandin Susceptibility Profile of Fluconazole Resistant *Candida* Species Isolated from Blood Stream Infections. **Infect Disord Drug Targets.** v. 16, n. 1, p. 63-8, 2016.

DESAI, J.V.; MITCHELL, A.P.; ANDES, D.R. Fungal biofilms, drug resistance, and recurrent infection. **Cold Spring Harb Perspect Med.** v. 4, n. 10, a019729, 2014.

DIEKEMA, D.J.; HSUEH, P.R.; MENDES, R.E.; PFALLER, M.A.; ROLSTON, K.V.; SADER, H.S.; JONES, R.N. The microbiology of bloodstream infection: 20-year trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 63, n. 7, e00355–19, 2019.

DOI, A.M.; PIGNATARI, A.C.; EDMOND, M.B.; MARRA, A.R.; CAMARGO, L.F.; SIQUEIRA, R.A.; DA MOTA, V.P.; COLOMBO, A.L. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLoS One.** v. 11, n. 1, e0146909, 2016.

DUETTMANN, W.; KOIDL, C.; KRAUSE, R.; LACKNER, G.; WOELFLER, A.; HOENIGL, M. Specificity of mannan antigen and anti-mannan antibody screening in patients with haematological malignancies at risk for fungal infection. **Mycoses.** v. 59, n. 6, p. 374-8, 2016.

DŽIDIC, S.; ŠUŠKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. **Food Technol Biotechnol.** v. 46, p. 11–21, 2008.

ENJALBERT, B.; SMITH, D.A.; CORNELL, M.J.; ALAM, I.; NICHOLLS, S.; BROWN, A.J.; QUINN, J. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional

response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Mol Biol Cell**. v. 17, n. 2, p. 1018-32, 2006.

ERGIN, F.; EREN, TÜLEK, N.; YETKIN, M.A.; BULUT, C.; ORAL, B.; TUNCER ERTEM, G. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda *Candida* kolonizasyonunun değerlendirilmesi ve kolonizasyon indeksinin kullanılması [Evaluation of *Candida* colonization in intensive care unit patients and the use of *Candida* colonization index]. **Mikrobiyol Bul**. v. 47, n. 2, p. 305-17, 2013.

ETEBU, E. e ARIKEKPAR, I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. **Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res**. v. 4, p. 90-101, 2016.

EUCAST. **Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts**. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. EUCAST E.DEF 7.3.2 April 2020.

EVANGELISTA, A.J.J. Antibacterianos β -lactâmicos e vancomicina como agentes potenciadores do crescimento e virulência de *Candida* spp. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Ceará. 2018.

FAN, D.; COUGHLIN, L.A.; NEUBAUER, M.M.; KIM, J.; KIM, M.S.; ZHAN, X.; SIMMS-WALDRIP, T.R.; XIE, Y.; HOOPER, L.V.; KOH, A.Y. Activation of HIF-1 α and LL-37 by commensal bacteria inhibits *Candida albicans* colonization. **Nat Med**. v. 21, n. 7, p. 808-14, 2015.

FORTUN, J.; MEIJE, Y.; BUITRAGO, M.J.; GAGO, S.; BERNAL-MARTINEZ, L.; PEMAN, J.; PÉREZ, M.; GÓMEZ-G PEDROSA, E.; MADRID, N.; PINTADO, V.; MARTÍN-DÁVILA, P.; COBO, J.; FRESCO, G.; MORENO, S.; CUENCA-ESTRELLA, M. Clinical validation of a multiplex real-time PCR assay for detection of invasive candidiasis in intensive care unit patients. **J Antimicrob Chemother**. v. 69, n. 11, p. 3134-41, 2014.

FOTHERGILL, A.W.; SUTTON, D.A.; MCCARTHY, D.I.; WIEDERHOLD, N.P. Impact of new antifungal breakpoints on antifungal resistance in *Candida* species. **J Clin Microbiol**. v. 52, n. 3, p. 994-7, 2014.

FRAIHA, R.O.; PEREIRA, A.P.R.; BRITO, E.D.C.A.; BORGES, C.L.; PARENTE, A.F.A.; PERDOMO, R.T.; MACEDO, M.L.R.; WEBER, S.S. Stress conditions in the host induce persister cells and influence biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 52, e20180001, 2019.

FRANZ, R.; KELLY, S.L.; LAMB, D.C.; KELLY, D.E.; RUHNKE, M.; MORSCHHÄUSER, J. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 42, n. 12, p. 3065-72, 1998.

FROHNER, I.E.; BOURGEOIS, C.; YATSYK, K.; MAJER, O.; KUCHLER, K. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. **Mol Microbiol.** v. 71, n. 1, p. 240-52, 2009.

GABRIELLI, E.; SABBATINI, S.; ROSELLETTI, E.; KASPER, L.; PERITO, S.; HUBE, B.; CASSONE, A.; VECCHIARELLI, A.; PERICOLINI, E. In vivo induction of neutrophil chemotaxis by secretory aspartyl proteinases of *Candida albicans*. **Virulence.** v. 7, n. 7, p. 819-25, 2016.

GACSER, A.; STEHR, F.; KRÖGER, C.; KREDICS, L.; SCHÄFER, W.; NOSANCHUK, J.D. Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. **Infect Immun.** v. 75, n. 10, p. 4710-8, 2007.

GIACOBBE, D.R.; MIKULSKA, M.; TUMBARELLO, M.; FURFARO, E.; SPADARO, M.; LOSITO, A.R.; MESINI, A.; DE PASCALE, G.; MARCHESE, A.; BRUZZONE, M.; PELOSI, P.; MUSSAP, M.; MOLIN, A.; ANTONELLI, M.; POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M.; VISCOLI, C.; DEL BONO, V.; ISGRI-SITA (Italian Study Group on Resistant Infections of the Società Italiana Terapia Antinfettiva). Combined use of serum (1,3)- β -D-glucan and procalcitonin for the early differential diagnosis between candidaemia and bacteraemia in intensive care units. **Crit Care.** v. 21, n. 1, p. 176, 2017.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J.; STAMOU, A.; MARAKI, S.; SOLOMONIDI, N.; BELESIOTOU, E.; PISTIKI, A.; ANTONIADOU, E.; VLACHOGIANNI, G.; MANDRAGOS, K.; TASIOUDIS, C.; KATSEKOS, C.; Routsis, C.; SAMONIS, G.; DIMOPOULOS, G. Susceptibility profiles and clinical efficacy of antifungals against *candida* bloodstream isolates from critically ill patients: Focus on intravenous itraconazole. **Int J Antimicrob Agents.** v. 54, n. 4, p. 471-477, 2019.

GONZALEZ-LARA, M.F.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Invasive Candidiasis. **Semin Respir Crit Care Med.** v. 41, n. 1, p. 3-12, 2020.

GOODMAN, L.S. e GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2012. 2112 p.

GOUBA, N. e DRANCOURT, M. Digestive tract mycobiota: a source of infection. **Med. Mal. Infect.** v. 45, n. 1, p. 9-16, 2015.

GOW, N.A. e HUBE, B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. **Curr Opin Microbiol.** v. 15, n. 4, p. 406-12, 2012.

GOW, N.A.; VAN DE VEERDONK, F.L.; BROWN, A.J.; NETEA, M.G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nat Rev Microbiol.** v. 10, n. 2, p. 112-22, 2011.

GRUBY, D. Recherches anatomiques sur une plante cryptogame qui constitue le vrai muguet des enfants. **Comptes Rendus Hapdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Paris.** v. 14, p. 634-6, 1842.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clin Microbiol Infect.** v. 20, Suppl 6, p. 5-10, 2014.

GUSTINETTI, G. e MISULKA, M. Bloodstream infections in neutropenic cancer patients: a practical update. **Virulence.** v. 7, p. 280-297, 2016.

HANSON, K.E.; PFEIFFER, C.D.; LEASE, E.D.; BALCH, A.H.; ZAAS, A.K.; PERFECT, J.R.; ALEXANDER, B.D. β -D-glucan surveillance with preemptive anidulafungin for invasive candidiasis in intensive care unit patients: a randomized pilot study. **PLoS One.** v. 7, n. 8, e42282, 2012.

HARTL, B.; ZELLER, I.; MANHART, A.; SELITSCH, B.; LASS-FLÖRL, C.; WILLINGER, B. A Retrospective Assessment of Four Antigen Assays for the Detection of Invasive Candidiasis Among High-Risk Hospitalized Patients. **Mycopathologia.** v. 183, n. 3, p. 513-519, 2018.

HEDDERWICK, S.A.; LYONS, M.J.; LIU, M.; VAZQUEZ, J.A.; KAUFFMAN, C.A. Epidemiology of yeast colonization in the intensive care unit. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v. 19, n. 9, p. 663-70, 2000.

HIGGINS, P.G.; FLUIT, A.C.; SCHMITZ, F.J. Fluoroquinolones: structure and target sites. **Curr Drug Targets.** v. 4, n. 2, p. 181-90, 2003.

HOYER, L.L.; COTA, E. *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence (Als) Family Vignettes: A Review of Als Protein Structure and Function. **Front Microbiol.** v. 7, n. 280, 2016.

IBÁÑEZ DE ALDECOA, A.L.; ZAFRA, O.; GONZÁLEZ-PASTOR, J.E. Mechanisms and Regulation of Extracellular DNA Release and Its Biological Roles in Microbial Communities. **Front Microbiol.** v. 8, n. 1390, 2017.

JAYATILAKE, J.A. A review of the ultrastructural features of superficial candidiasis. **Mycopathologia**. v. 171, n. 4, p. 235-50, 2011.

JOHNSON, C.J.; CABEZAS-OLCOZ, J.; KERNIEN, J.F.; WANG, S.X.; BEEBE, D.J.; HUTTENLOCHER, A.; ANSARI, H.; NETT, J.E. The Extracellular Matrix of *Candida albicans* Biofilms Impairs Formation of Neutrophil Extracellular Traps. **PLoS Pathog**. v. 12, n. 9, e1005884, 2016.

KAGAN, S.; JABBOUR, A.; SIONOV, E.; ALQUNTAR, A.A.; STEINBERG, D.; SREBNIK, M.; NIR-PAZ, R.; WEISS, A.; POLACHEK, I. Anti-*Candida albicans* biofilm effect of novel heterocyclic compounds. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 69, p. 416-427, 2014.

KAJIHARA, T.; YAHARA, K.; NAGI, M.; KITAMURA, N.; HIRABAYASHI, A.; HOSAKA, Y.; ABE, M.; MIYAZAKI, Y.; SUGAI, M. Distribution, trends, and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia in Japan, 2010-2019: A retrospective observational study based on national surveillance data. **Med Mycol**. v. 60, n. 9, 2022.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **J Anaesthesiol Clin Pharmacol**. v. 33, n. 3, p. 300-305, 2017.

KARAGEORGOPOULOS, D.E.; QU, J.M.; KORBILA, I.P.; ZHU, Y.G.; VASILEIOU, V.A.; FALAGAS, M.E. Accuracy of β -D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. **Clin Microbiol Infect**. v. 19, n. 1, p. 39-49, 2013.

KARAGEORGOPOULOS, D.E.; VOULOUMANOU, E.K.; NTZIORA, F.; MICHALOPOULOS, A.; RAFAILIDIS, P.I.; FALAGAS, M.E. β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. **Clin Infect Dis**. v. 52, n. 6, p. 750-70, 2011.

KARYGIANNI, L.; REN, Z.; KOO, H.; THURNHEER, T. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. **Trends Microbiol**. v. 28, n. 8, p. 668-681, 2020.

KATRAGKOU, A.; SIMITSOPOULOU, M.; CHATZIMOSCHOU, A.; GEORGIADOU, E.; WALSH, T.J.; ROILIDES, E. Effects of interferon- γ and granulocyte colony-stimulating factor on antifungal activity of human polymorphonuclear neutrophils against *Candida albicans* grown as biofilms or planktonic cells. **Cytokine**. v. 55, n. 3, p. 330-4, 2011.

KAUR, H.; CHAKRABARTI, A. Strategies to Reduce Mortality in Adult and Neonatal Candidemia in Developing Countries. **J Fungi (Basel)**. v. 3, n. 3, p. 41, 2017.

KAUR, H.; SINGH, S.; RUDRAMURTHY, S.M.; GHOSH, A.K.; JAYASHREE, M.; NARAYANA, Y.; RAY, P.; CHAKRABARTI, A. Candidaemia in a tertiary care centre of developing country: Monitoring possible change in spectrum of agents and antifungal susceptibility. **Indian J Med Microbiol**. v. 38, n. 1, p. 110-116, 2020.

KIM, J. e SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **J Microbiol**. v. 49, n. 2, p. 171-7, 2011.

KOLLEF, M.; MICEK, S.; HAMPTON, N.; DOHERTY, J.A.; KUMAR, A. Septic shock attributed to *Candida* infection: importance of empiric therapy and source control. **Clin Infect Dis**. v. 54, n. 12, p. 1739-46, 2012.

KOTRA, L.P.; HADDAD, J.; MOBASHERY, S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 44, n. 12, p. 3249-56, 2000.

KOVACS, R. e MAJOROS, L. Fungal Quorum-Sensing Molecules: A Review of Their Antifungal Effect against *Candida* Biofilms. **J Fungi (Basel)**. v. 6, n. 3, p. 99, 2020.

KRAUSE, K.M.; SERIO, A.W.; KANE, T.R.; CONNOLLY, L.E. Aminoglycosides: An Overview. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v. 6, n. 6, a027029, 2016.

KRAUSE, R.; MOISSEL-EICHINGER, C.; HALWACHS, B.; GORKIEWICZ, G.; BERG, G.; VALENTIN, T.; PRATTES, J.; HÖGENAUER, C.; ZOLLNER-SCHWETZ, I. Mycobiome in the Lower Respiratory Tract – A Clinical Perspective. **Front. Microbiol**. v. 7, n. 2169, p. 1–9, 2016.

KULLBERG, B.J.; ARENDRUP, M.C. Invasive Candidiasis. **N Engl J Med**. v. 373, n. 15, p. 1445-56, 2015.

KULLBERG, B.J.; SOBEL, J.D.; RUHNKE, M.; PAPPAS, P.G.; VISCOLI, C.; REX, J.H.; CLEARY, J.D.; RUBINSTEIN, E.; CHURCH, L.W.; BROWN, J.M.; SCHLAMM, H.T.; OBORSKA, I.T.; HILTON, F.; HODGES, M.R. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. **Lancet**. v. 366, n. 9495, p. 1435-42, 2005.

KULLBERG, B.J.; VISCOLI, C.; PAPPAS, P.G.; VAZQUEZ, J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; ROTSTEIN, C.; SOBEL, J.D.; HERBRECHT, R.; RAHAV, G.;

JARURATANASIRIKUL, S.; CHETCHOTISAKD, P.; VAN WIJNGAERDEN, E.; DE WAELE, J.; LADEMACHER, C.; ENGELHARDT, M.; KOVANDA, L.; CROOS-DABRERA, R.; FREDERICKS, C.; THOMPSON, G.R. Isavuconazole Versus Caspofungin in the Treatment of Candidemia and Other Invasive *Candida* Infections: The ACTIVE Trial. **Clin Infect Dis.** v. 68, n. 12, p. 1981-1989, 2019.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P.D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harb Protoc.** 2018.

LACROIX, C.; GICQUEL, A.; SENDID, B.; MEYER, J.; ACCOCEBERRY, I.; FRANÇOIS, N.; MORIO, F.; DESOUBEAUX, G.; CHANDENIER, J.; KAUFFMANN-LACROIX, C.; HENNEQUIN, C.; GUITARD, J.; NASSIF, X.; BOUGNOUX, M.E. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. **Clin Microbiol Infect.** v. 20, n. 2, p. 153-8, 2014.

LAFLEUR, M.D.; KUMAMOTO, C.A.; LEWIS, K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrob Agents Chemother.** 50(11):3839-46, 2006.

LEACH, M.D.; KLIPP, E.; COWEN, L.E.; BROWN, A.J. Fungal Hsp90: a biological transistor that tunes cellular outputs to thermal inputs. **Nat Rev Microbiol.** 10(10):693-704, 2012.

LEDERMANN, W. Brief history of *Candida*, white but not so much. **Rev. chil. infectol.** v. 34, n. 5, 2017.

LEE, K.K.; MACCALLUM, D.M.; JACOBSEN, M.D.; WALKER, L.A.; ODDS, F.C.; GOW, N.A.; MUNRO, C.A. Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance in vivo. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 56, n. 1, p. 208-17, 2012.

LEON, C.; RUIZ-SANTANA, S.; SAAVEDRA, P.; CASTRO, C.; LOZA, A.; ZAKARIYA, I.; ÚBEDA, A.; PARRA, M.; MACÍAS, D.; TOMÁS, J.I.; REZUSTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; GÓMEZ, F.; MARTÍN-MAZUELOS, E.; CAVA TREM STUDY GROUP. Contribution of *Candida* biomarkers and DNA detection for the diagnosis of invasive candidiasis in ICU patients with severe abdominal conditions. **Crit Care.** v. 20, n. 1, p. 149, 2016.

LEVETIN, E.; HORNER, W.E.; SCOTT, J.A.; WORKGROUP, E.A. Taxonomy of allergenic fungi. **J. Allergy Clin. Immunol. Pract.** v. 4, n. 3, p. 375-385, 2016.

LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nat Rev Microbiol.** v. 5, n. 1, p. 48-56, 2007.

LI, P.; SENEVIRATNE, C.J.; ALPI, E.; VIZCAINO, J.A.; JIN, L. Delicate Metabolic Control and Coordinated Stress Response Critically Determine Antifungal Tolerance of *Candida albicans* Biofilm Persisters. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 59, n. 10, p. 6101-12, 2015.

LIM, C.S.; ROSLI, R.; SEOW, H.F.; CHONG, P.P. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v. 31, n. 1, p. 21-31, 2012.

LIM, S.J.; MOHAMAD ALI, M.S.; SABRI, S.; MUHD NOOR, N.D.; SALLEH, A.B.; OSLAN, S.N. Opportunistic yeast pathogen *Candida* spp.: Secreted and membrane-bound virulence factors. **Med Mycol.** v. 59, n. 12, p. 1127-1144, 2021.

LIMA-NETO, R.G.; SANTOS, C.; LIMA, N.; SAMPAIO, P.; PAIS, C.; NEVES, R.P. Application of MALDI-TOF MS for requalification of *Candida* clinical isolates culture collection. **Braz J Microbiol.** v. 45, p. 515–522. 2014.

LOHSE, M.B.; GULATI, M.; JOHNSON, A.D.; NOBILE, C.J. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nat Rev Microbiol.** v. 16, n. 1, p. 19-31, 2018.

LOPES, J.P. e LIONAKIS, M.S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence.** v. 13, n. 1, p. 89-121, 2022.

LOPEZ-RIBOT, J.L.; MCATEE, R.K.; LEE, L.N.; KIRKPATRICK, W.R.; WHITE, T.C.; SANGLARD, D.; PATTERSON, T.F. Distinct patterns of gene expression associated with development of fluconazole resistance in serial *candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 42, n. 11, p. 2932-7, 1998.

LORTHOLARY, O.; DESNOS-OLLIVIER, M.; SITBON, K.; FONTANET, A.; BRETAGNE, S.; DROMER, F.; GROUP, F. M. S. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 55, n. 2, p. 532–538, 2011.

MACDONALD, T.M.; BEARDON, P.H.; MCGILCHRIST, M.M.; DUNCAN, I.D.; MCKENDRICK, A.D.; MCDEVITT, D.G. The risks of symptomatic vaginal candidiasis after oral antibiotic therapy. **Q J Med.** v. 86, n. 7, p. 419-24, 1993.

MACLEAN, K. **Medical Treatment.** 2nd Ed. London: Churchill. 1962.

MAGILL, S.S.; EDWARDS, J.R.; BAMBERG, W.; BELDAVS, Z.G.; DUMYATI, G.; KAINER, M.A.; LYNFIELD, R.; MALONEY, M.; MCALLISTER-HOLLOD, L.; NADLE, J.; RAY, S.M.; THOMPSON, D.L.; WILSON, L.E.; FRIDKIN, S.K. Emerging Infections Program Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use Prevalence Survey Team. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **N Engl J Med.** v. 370, n. 13, p. 1198-208, 2014.

MAGILL, S.S.; O'LEARY, E.; JANELLE, S.J.; THOMPSON, D.L.; DUMYATI, G.; NADLE, J.; WILSON, L.E.; KAINER, M.A.; LYNFIELD, R.; GREISSMAN, S.; RAY, S.M.; BELDAVS, Z.; GROSS, C.; BAMBERG, W.; SIEVERS, M.; CONCANNON, C.; BUHR, N.; WARNKE, L.; MALONEY, M.; OCAMPO, V.; BROOKS, J.; OYEWUMI, T.; SHARMIN, S.; RICHARDS, K.; RAINBOW, J.; SAMPER, M.; HANCOCK, E.B.; LEAPTROT, D.; SCALISE, E.; BADRUN, F.; PHELPS, R.; EDWARDS, J.R. Emerging Infections Program Hospital Prevalence Survey Team. Changes in Prevalence of Health Care-Associated Infections in U.S. Hospitals. **N Engl J Med.** v. 379, n. 18, p. 1732-1744, 2018.

MAIONE, A.; PIETRA, A.; SALVATORE, M.M.; GUIDA, M.; GALDIERO, E.; DE ALTERIIS, E. Undesired Effect of Vancomycin Prolonged Treatment: Enhanced Biofilm Production of the Nosocomial Pathogen *Candida auris*. **Antibiotics (Basel).** v. 11, n. 12, p. 1771, 2022.

MAN, A.; CIUREA, C.N.; PASAROIU, D.; SAVIN, A.I.; TOMA, F.; SULAR, F.; SANTACROCE, L.; MARE, A. New perspectives on the nutritional factors influencing growth rate of *Candida albicans* in diabetics. An in vitro study. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** V. 112, n. 9, p. 587-592, 2017.

MARIETTE, C.; TAVERNIER, E.; HOCQUET, D.; HUYNH, A.; ISNARD, F.; LEGRAND, F., et al. Epidemiology of invasive fungal infections during induction therapy in adults with acute lymphoblastic leukemia: a GRAALL-2005 study. **Leuk. Lymphoma.** v. 58, p. 586–593, 2017.

MARKLEIN, G.; JOSTEN, M.; KLANKE, U.; MÜLLER, E.; HORRÉ, R.; MAIER, T.; WENZEL, T.; KOSTRZEWA, M.; BIERBAUM, G.; HOERAUF, A.; SAHL, H.G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. **J Clin Microbiol.** v. 47, n. 9, p. 2912-7, 2009.

MARTINEZ-JIMENEZ, M.C.; MUNOZ, P.; VALERIO, M.; VENA, A.; GUINEA, J.; BOUZA, E. Combination of *Candida* biomarkers in patients receiving empirical antifungal therapy in a Spanish tertiary hospital: a potential role in reducing the duration of treatment. **J Antimicrob Chemother.** v. 70, n. 11, p. 3107-15, 2015.

MARTINS, M.; UPPULURI, P.; THOMAS, D.P.; CLEARY, I.A.; HENRIQUES, M.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; OLIVEIRA, R. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans*

biofilm matrix and its contribution to biofilms. **Mycopathologia**. v. 169, n. 5, p. 323-31, 2010.

MATTOS, K.; RODRIGUES, L.C.; OLIVEIRA, K.M.P.; DINIZ, P.F.; MARQUES, L.I.; ARAUJO, A.A.; CHANG, M.R. Variability in the clinical distributions of *Candida* species and the emergence of azole-resistant non-*Candida albicans* species in public hospitals in the Midwest region of Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 50, n. 6, p. 843-847, 2017.

MCCARTY, T.P.; PAPPAS, P.G. Invasive Candidiasis. **Infect Dis Clin North Am**. v. 30, n. 1, p. 103-24, 2016.

MCCARTY, T.P.; WHITE, C.M.; PAPPAS, P.G. Candidemia and Invasive Candidiasis. **Infect Dis Clin North Am**. v. 35, n. 2, p. 389-413, 2021.

MEDEIROS, M.A.P.; MELO, A.P.V.; BENTO, A.O.; SOUZA, L.B.F.C.; NETO, F.A.B.; GARCIA, J.B.; ZUZA-ALVES, D.L.; FRANCISCO, E.C.; MELO, A.S.A.; CHAVES, G.M. Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **PLoS One**. v. 14, n. 8, e0221033, 2019.

MERSEGUEL, K.B.; NISHIKAKU, A.S.; RODRIGUES, A.M.; PADOVAN, A.C.; FERREIRA, R.C.; AZEVEDO, M.A.S.; BRIONES, M.R.; COLOMBO, A.L. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. **BMC Infectious Diseases**. v. 15, n. 57, p. 1-11, 2015.

MIMICA, L.M.J.; UEDA, S.M.Y.; MARTINO, M.D.V.; NAVARINI, A.; MARTINI, I.J. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 45, n. 1, p. 17-23, 2009.

MINGEOT-LECLERCQ, M.P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P.M. Aminoglycosides: activity and resistance. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 43, n. 4, p. 727-37, 1999.

MIRAMON, P.; DUNKER, C.; WINDECKER, H.; BOHOVYCH, I.M.; BROWN, A.J.; KURZAI, O.; HUBE, B. Cellular responses of *Candida albicans* to phagocytosis and the extracellular activities of neutrophils are critical to counteract carbohydrate starvation, oxidative and nitrosative stress. **PLoS One**. v. 7, n. 12, e52850, 2012.

MITCHELL, K.F.; ZARNOWSKI, R.; SANCHEZ, H.; EDWARD, J.A.; REINICKE, E.L.; NETT, J.E.; MITCHELL, A.P.; ANDES, D.R. Community participation in biofilm matrix assembly and function. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 112, n. 13, p. 4092-7, 2015.

MOHR, J.F.; SIMS, C.; PAETZNICK, V.; RODRIGUEZ, J.; FINKELMAN, M.A.; REX, J.H.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Prospective survey of (1→3)-beta-D-glucan and its relationship to invasive candidiasis in the surgical intensive care unit setting. **J Clin Microbiol.** v. 49, n. 1, p. 58-61, 2011.

MOLERO, G.; DíEZ-OREJAS, R.; NAVARRO-GARCÍA, F.; MONTEOLIVA, L.; PLA, J.; GIL, C.; SÁNCHEZ-PÉREZ, M.; NOMBELA, C. *Candida albicans*: Genetics, dimorphism and pathogenicity. **Int. Microbiol.** v. 1, p. 95–106, 1998.

MORATO, E.P.; LEOMIL, L.; BEUTIN, L.; KRAUSE, G.; MOURA, R.A.; PESTANA, D.E.; CASTRO, A.F. Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* types. **Zoonoses Public Health.** v. 56, n. 5, p. 229-37, 2009.

MOTA, L.M; VILAR, F.C; DIAS, L.B.A; NUNES, T.F.; MORIGUTI, J.C. Uso racional de antimicrobianos. **Medicina (Ribeirão Preto).** v. 43, n. 2, p. 164-172, 2010.

MOYED, H.S. e BERTRAND, K.P. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. **J. Bacteriol.** v. 155, p. 768–775, 1983.

MOYES, D.L.; WILSON, D.; RICHARDSON, J.P.; MOGAVERO, S.; TANG, S.X.; WERNECKE, J.; HÖFS, S.; GRATACAP, R.L.; ROBBINS, J.; RUNGLALL, M.; MURCIANO, C.; BLAGOJEVIC, M.; THAVARAJ, S.; FÖRSTER, T.M.; HEBECKER, B.; KASPER, L.; VIZCAY, G.; IANCU, S.I.; KICHIK, N.; HÄDER, A.; KURZAI, O.; LUO, T.; KRÜGER, T.; KNIEMEYER, O.; COTA, E.; BADER, O.; WHEELER, R.T.; GUTSMANN, T.; HUBE, B.; NAGLIK, J.R. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. **Nature.** v. 532, n. 7597, p. 64-8, 2016.

NAGLIK, J.R.; GAFFEN, S.L.; HUBE, B. Candidalysin: discovery and function in *Candida albicans* infections. **Curr Opin Microbiol.** v. 52, p. 100-109, 2019.

NAILIS, H.; KUCHARÍKOVÁ, S.; RICICOVÁ, M.; VAN DIJCK, P.; DEFORCE, D.; NELIS, H.; COENYE, T. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. **BMC Microbiol.** v. 10, p. 114, 2010.

NETT, J.E. e ANDES, D.R. Contributions of the Biofilm Matrix to *Candida* Pathogenesis. **J Fungi (Basel).** v. 6, n. 1, p. 21, 2020.

NETT, J.E. The Host's Reply to *Candida* Biofilm. **Pathogens.** v. 5, n. 1, p. 33, 2016.

NOBILE, C.J. e JOHNSON, A.D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annu Rev Microbiol.** v. 69, p. 71-92, 2015.

OIDIUM. **Dorland's Illustrated Medical Dictionary.** 28th Edition, W.B. Saunders Company, Phil. (USA). 1171. 1990.

O'MEARA, T.R.; ROBBINS, N. e COWEN, L.E. The Hsp90 Chaperone Network Modulates *Candida* Virulence Traits. **Trends Microbiol.** v. 25, n. 10, p. 809-819, 2017.

PAPON, N.; BOUGNOUX, M.E.; D'ENFERT, C. Tracing the Origin of Invasive Fungal Infections. **Trends Microbiol.** v. 28, n. 4, p. 240-242, 2020.

PAPON, N.; COURDAVAULT, V.; CLASTRE, M.; BENNETT, R.J. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm, **PLoS Pathogens.** v. 9, n. 9, 2013.

PAPPAS, P.G.; KAUFFMAN, C.A.; ANDES, D.R.; CLANCY, C.J.; MARR, K.A.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI AC; SCHUSTER, M.G.; VAZQUEZ, J.A.; WALSH, T.J.; ZAOUTIS, T.E.; SOBEL, J.D. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis.** v. 62, n. 4, p. e1-50, 2016.

PAPPAS, P.G.; LIONAKIS, M.S.; ARENDRUP, M.C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; KULLBERG, B.J. Invasive candidiasis. **Nat Rev Dis Primers.** v. 4, p. 18026, 2018.

PAPPAS, P.G.; ROTSTEIN, C.M.; BETTS, R.F.; NUCCI, M.; TALWAR, D.; DE WAELE, J.J.; VAZQUEZ, J.A.; DUPONT, B.F.; HORN, D.L.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A.C.; SUH, B.; DIGUMARTI, R.; WU, C.; KOVANDA, L.L.; ARNOLD, L.J.; BUELL, D.N. Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis. **Clin Infect Dis.** v. 45, n. 7, p. 883-93, 2007.

PARRA-SANCHEZ, M.; ZAKARIYA-YOUSEF BREVAL I, CASTRO MÉNDEZ C, GARCÍA-REY S, LOZA VAZQUEZ A, ÚBEDA IGLESIAS A, MACÍAS GUERRERO D, ROMERO MEJÍAS A, LEÓN GIL C, MARTÍN-MAZUELOS E; CAVA Trem Study Group. *Candida albicans* Germ-Tube Antibody: Evaluation of a New Automatic Assay for Diagnosing Invasive Candidiasis in ICU Patients. **Mycopathologia.** v. 182, n. 7-8, p. 645-652, 2017.

PASCOE, J.; CULLEN, M. The prevention of febrile neutropenia. **Curr Opin Oncol.** v. 18, n. 4, p. 325-9, 2006.

PEETERS, E.; NELIS, H.J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **J Microbiol Methods**. v. 72, n. 2, p. 157-65, 2008.

PEREIRA, L.M.G.; ANDRADE, A.R.C.; PORTELA, F.V.M.; AGUIAR, A.L.R.; SILVA, B.N.D.; MOURA, S.G.B.; PERGENTINO, M.L.M.; ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.D.C.; CASTELO BRANCO, D.S.C.M.; CORDEIRO, R.A. Heterologous extracellular DNA facilitates the development of *Trichosporon asahii* and *T. inkin* biofilms and enhances their tolerance to antifungals. **Biofouling**. v. 38, n. 8, p. 778-785, 2022.

PEREIRA, R.; DOS SANTOS FONTENELLE, R.O.; DE BRITO, E.H.S.; DE MORAIS, S.M. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **J Appl Microbiol**. v. 131, n. 1, p. 11-22, 2021.

PERICOLINI, E.; GABRIELLI, E.; AMACKER, M.; KASPER, L.; ROSELLETTI, E.; LUCIANO, E.; SABBATINI, S.; KAESER, M.; MOSER, C.; HUBE, B.; VECCHIARELLI, A.; CASSONE, A. Secretory Aspartyl Proteinases Cause Vaginitis and Can Mediate Vaginitis Caused by *Candida albicans* in Mice. **mBio**. v. 6, n. 3, e00724, 2015.

PFALLER, M.A. e DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev**. v. 20, n. 1, p. 133-63, 2007.

PFALLER, M.A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J.; KROEGER, J.; MESSER, S.A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D.J. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for posaconazole and voriconazole and *Candida* spp. as determined by 24-hour CLSI broth microdilution. **J Clin Microbiol**. v. 49, n. 2, p. 630-7. 2011a.

PFALLER, M.A.; CASTANHEIRA, M.; LOCKHART, S.R.; AHLQUIST, A.M.; MESSER, S.A.; JONES, R.N. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. **J Clin Microbiol**. v. 50, n. 4, p. 1199-203, 2012b.

PFALLER, M.A.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, S.A.; MOET, G.J.; JONES, R.N. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). **Diagn Microbiol Infect Dis**. v. 68, n. 3, p. 278-83, 2010.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of *Clinical and Laboratory Standards Institute* broth microdilution methods, 2010 to 2012. **J Clin Microbiol**. v. 50, n. 9, p. 2846-2856. 2012.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; ANDES, D.; ARENDRUP, M.C.; BROWN, S.D.; LOCKHART, S.R.; MOTYL, M.; PERLIN, D.S.; CLSI Subcommittee for Antifungal Testing. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. **Drug Resist Updat.** v. 14, n. 3, p. 164-76, 2011b.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; TURNIDGE, J.D.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R.N. Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species From 1997-2016. **Open Forum Infect Dis.** v. 6, Suppl 1, p. S79-S94, 2019.

PFALLER, M.A.; ESPINEL-INGROFF, A.; CANTON, E.; CASTANHEIRA, M.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DIEKEMA, D.J.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; GHANNOUM, M.; JONES, R.N.; LOCKHART, S.R.; MARTIN-MAZUELOS, E.; MELHEM, M.S.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAPPAS, P.; PELAEZ, T.; PEMAN, J.; REX, J.; SZESZS, M.W. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. **J Clin Microbiol.** v. 50, n. 6, p. 2040-2046. 2012a.

PFEIFFER, C.D.; SAMSA, G.P.; SCHELL, W.A.; RELLER, L.B.; PERFECT, J.R.; ALEXANDER, B.D. Quantitation of *Candida* CFU in initial positive blood cultures. **J Clin Microbiol.** v. 49, n. 8, p. 2879-83, 2011.

PHAM, T.D.M.; ZIORA, Z.M.; BLASKOVICH, M.A.T. Quinolone antibiotics. **Medchemcomm.** v. 10, n. 10, p. 1719-1739, 2019.

PHE. *Candida auris* identified in England. **Public Health England.** Updated 11 August 2017.

PLAYFORD, E.G.; LIPMAN, J.; KABIR, M.; MCBRYDE, E.S.; NIMMO, G.R.; LAU, A.; SORRELL, T.C. Assessment of clinical risk predictive rules for invasive candidiasis in a prospective multicentre cohort of ICU patients. **Intensive Care Med.** v. 35, n. 12, p. 2141-5, 2009.

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I.D. *Candida* survival strategies. **Adv Appl Microbiol.** v. 91, p. 139-235, 2015.

PONDE, N.O.; LORTAL, L.; RAMAGE, G.; NAGLIK, J.R.; RICHARDSON, J.P. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. **Crit Rev Microbiol.** v. 47, n. 1, p. 91-111, 2021.

PRADHAN, A.; MA, Q.; DE ASSIS, L.J.; LEAVES, I.; LARCOMBE, D.E.; RODRIGUEZ RONDON, A.V.; NEV, O.A.; BROWN, A.J.P. Anticipatory Stress Responses and Immune Evasion in Fungal Pathogens. **Trends Microbiol.** v. 29, n. 5, p. 416-427, 2021.

RAJENDRAN, R.; MAY, A.; SHERRY, L.; KEAN, R.; WILLIAMS, C.; JONES, B.L.; BURGESS, K.V.; HERINGA, J.; ABELN, S.; BRANDT, B.W.; MUNRO, C.A.; RAMAGE, G. Integrating *Candida albicans* metabolism with biofilm heterogeneity by transcriptome mapping. **Sci Rep.** v. 6, p. 35436, 2016.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **Int J Microbiol.** v. 2012, p. 528521, 2012.

RAMIREZ, M.S.; TOLMASKY, M.E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resist Updat.** v. 13, n. 6, p. 151-71, 2010.

REBOLI, A.C.; ROTSTEIN, C.; PAPPAS, P.G.; CHAPMAN, S.W.; KETT, D.H.; KUMAR, D.; BETTS, R.; WIBLE, M.; GOLDSTEIN, B.P.; SCHRANZ, J.; KRAUSE, D.S.; WALSH, T.J. Anidulafungin Study Group. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. **N Engl J Med.** v. 356, n. 24, p. 2472-82, 2007.

REVIE, N.M.; LYER, K.R.; ROBBINS, N.; COWEN, L.E. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 12, n. 45, p. 70–76, 2018.

REYNOLDS, P.E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v. 8, p. 943–50, 1989.

RISS, T.L.; MORAVEC, R.A.; NILES, A.L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H.A.; WORZELLA, T.J.; MINOR, L. **Cell Viability Assays. The Assay Guidance Manual.** 2013. Bookshelf URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>

ROBIN, P.C. Hystorie naturelle des végétaux parasites qui croissent sur l’homme et les animaux vivants. **Balliere et fils, éditeurs.** Paris, 1853.

ROGERS, H.; WILLIAMS, D.W.; FENG, G.J.; LEWIS, M.A.; WEI, X.Q. Role of bacterial lipopolysaccharide in enhancing host immune response to *Candida albicans*. **Clin Dev Immunol.** v. 2013, p. 320168, 2013.

ROSSOW, J.A.; GHARPURE, R.; BRENNAN, J.; RELAN, P.; WILLIAMS, S.R.; VALLABHANENI, S.; JACKSON, B.R.; GRABER, C.R.; HILLIS, S.R.; SCHAFFNER, W.; DUNN, J.R.; JONES, T.F. Injection Drug Use-Associated Candidemia: Incidence, Clinical

Features, and Outcomes, East Tennessee, 2014-2018. **J Infect Dis.** v. 222, Suppl 5, p. S442-S450, 2020.

RUHNKE, M.; BEHRE, G.; BUCHHEIDT, D.; CHRISTOPEIT, M.; HAMPRECHT, A.; HEINZ, W.; HEUSSEL, C.P.; HORGER, M.; KURZAI, O.; KARTHAUS, M.; LÖFFLER, J.; MASCHMEYER, G.; PENACK, O.; RIEGER, C.; RICKERTS, V.; RITTER, J.; SCHMIDT-HIEBER, M.; SCHUELPER, N.; SCHWARTZ, S.; ULLMANN, A.; VEHRESCHILD, J.J.; VON LILIENFELD-TOAL, M.; WEBER, T.; WOLF, H.H. Diagnosis of invasive fungal diseases in haematology and oncology: 2018 update of the recommendations of the infectious diseases working party of the German society for hematology and medical oncology (AGIHO). **Mycoses.** v. 61, n. 11, p. 796-813, 2018.

SAFAVIEH, M.; COARSEY, C.; ESIÖBU, N.; MEMIC, A.; VYAS, J.M.; SHAFIEE, H.; ASGHAR, W. Advances in *Candida* detection platforms for clinical and point-of-care applications. **Crit. Rev. Biotechnol.** v. 37, n. 4, p. 441-458, 2017.

SAMONIS, G.; GALANAKIS, E.; NTAOUKAKIS, M.; SARCHIANAKI, E.; SPATHOPOULOU, T.; DIMIPOULOU, D.; KOFTERIDIS, D. P.; MARAKI, S. Effects of carbapenems and their combination with amikacin on murine gut colonisation by *Candida albicans*. **Mycoses,** v. 56, n. 2, p. 105-109, 2013.

SAMONIS, G.; MARAKI, S.; BARBOUNAKIS, E.; LEVENTAKOS, K.; LAMARIS, G.; ROVITHI, M.; HATJIOANNOU, I.; POTOLIDIS, E.; TSELENTIS, Y.; MANTADAKIS, E. Effects of vancomycin, teicoplanin, linezolid, quinupristin-dalfopristin, and telithromycin on murine gut colonization by *Candida albicans*. **Medical Mycology.** v. 44, n. 2, p. 193-196, 2006a.

SAMONIS, G.; MARAKI, S.; LEVENTAKOS, K.; SPANAKI, A. M.; KETEIFIDIS, A.; GALANAKIS, E.; TSELENTIS, Y.; FALAGAS, M. E.; MANTADAKIS, E. Comparative effects of ertapenem, imipenem, and meropenem on the colonization of the gastrointestinal tract of mice by *Candida albicans*. **Medical Mycology.** v. 44, p. 233-235, 2006b.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; KOYMANS, L.; BILLE, J. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 42, n. 2, p. 241-53, 1998.

SANGLARD, D.; KUCHLER, K.; ISCHER, F.; PAGANI, J.L.; MONOD, M.; BILLE, J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 39, n. 11, p. 2378-86, 1995.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; BEIGELMAN-AUBRY, C.; LAMOTH, F.; DUNET, V.; SLAVIN, M.; RICHARDSON, M.D. Diagnosis and treatment of invasive fungal infections: looking ahead. **J Antimicrob Chemother.** v. 74, Suppl 2, 2019.

SAPAAR, B.; NUR, A.; HIROTA, K.; YUMOTO, H.; MURAKAMI, K.; AMOH, T.; MATSUO, T.; ICHIKAWA, T.; MIYAKE, Y. Effects of extracellular DNA from *Candida albicans* and pneumonia-related pathogens on *Candida* biofilm formation and hyphal transformation. **J Appl Microbiol.** v. 116, n. 6, p. 1531-42, 2014.

SHEPPARD, D.C. e FILLER, S.G. Host cell invasion by medically important fungi. **Cold Spring Harb Perspect Med.** v. 5, n. 1, a019687, 2014.

SHOPOVA, I.; BRUNS, S.; THYWISSEN, A.; KNIEMEYER, O.; BRAKHAGE, A.A.; HILLMANN, F. Extrinsic extracellular DNA leads to biofilm formation and colocalizes with matrix polysaccharides in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Front Microbiol.** v. 4, p. 141, 2013.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiol Rev.** v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SILVA, S.; RODRIGUES, C.F.; ARAÚJO, D.; RODRIGUES, M.E.; HENRIQUES, M. *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. **J Fungi (Basel).** v. 3, n. 1, p. 8, 2017.

SINGH, S.; FATIMA, Z.; HAMEED, S. Predisposing factors endorsing *Candida* infections. **Le Infez. Med. Riv. Period. di eziologia, Epidemiol. diagnostica, Clin. e Ter. delle Patol. Infett.** v. 23, n. 3, p. 211–223, 2015.

SOUZA, C.O.; MELO, T.R.B.; MELO, C.S.B.; MENEZES, E.M.; CARVALHO, A.C. MONTEIRO, L.C.R. Enteropathogenic *Escherichia coli*: a versatile diarrheagenic category. **Rev Pan-Amaz Saude.** v. 7, n. 2, p. 79-91. 2016.

SPINILLO, A.; CAPUZZO, E.; ACCIANO, S.; DE SANTOLO, A.; ZARA, F. Effect of antibiotic use on the prevalence of symptomatic vulvovaginal candidiasis. **Am J Obstet Gynecol.** v. 180, 1 Pt 1, p. 14-7, 1999.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J Microbiol Methods**. v. 40, n. 2, p. 175-9, 2000.

STERGIOPOULOU, T.; MELETIADIS, J.; SEIN, T.; PAPAIOANNIDOU, P.; TSIOURIS, I.; ROILIDES, E.; WALSH, T.J. Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **J Antimicrob Chemother**. v. 63, n. 2, p. 343-8, 2009.

STROLLO, S.; LIONAKIS, M.S.; ADJEMIAN, J.; STEINER, C.A.; PREVOTS, D.R. Epidemiology of Hospitalizations Associated with Invasive Candidiasis, United States, 2002-20121. **Emerg Infect Dis**. v. 23, n. 1, p. 7-13, 2016.

TALAPKO, J.; JUZBAŠIĆ, M.; MATIJEVIĆ, T.; PUSTIJANAC, E.; BEKIĆ, S.; KOTRIS, I.; ŠKRLEC, I. *Candida albicans* - The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. **J Fungi (Basel)**. v. 7, n. 2, p. 79, 2021.

TAN, C.T.; XU, X.; QIAO, Y.; WANG, Y. A peptidoglycan storm caused by β -lactam antibiotic's action on host microbiota drives *Candida albicans* infection. **Nat Commun**. v. 12, n. 1, p. 3510, 2021.

TAN, K.E.; ELLIS, B.C.; LEE, R.; STAMPER, P.D.; ZHANG, S.X.; CARROLL, K.C. Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. **J Clin Microbiol**. v. 50, n. 10, p. 3301-8, 2012.

TEO, J.Q.; LEE, S.J.; TAN, A.L.; LIM, R.S.; CAI, Y.; LIM, T.P.; KWA, A.L. Molecular mechanisms of azole resistance in *Candida* bloodstream isolates. **BMC Infect Dis**. v. 19, n. 1, p. 63, 2019.

TERRERO-SALCEDO, D. e POWERS-FLETCHER, M.V. Updates in Laboratory Diagnostics for Invasive Fungal Infections. **J Clin Microbiol**. v. 58, n. 6, e01487-19, 2020.

THOMAS-RUDEL, D.O.; SCHLATTMANN, P.; PLETZ, M.; KURZAI, O.; BLOOS, F. Risk Factors for Invasive *Candida* Infection in Critically Ill Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. **Chest**. v. 161, n. 2, p. 345-355, 2022.

TISSOT, F.; LAMOTH, F.; HAUSER, P.M.; ORASCH, C.; FLÜCKIGER, U.; SIEGEMUND, M.; ZIMMERLI, S.; CALANDRA, T.; BILLE, J.; EGGIMANN, P.; MARCHETTI, O.; Fungal Infection Network of Switzerland (FUNGINOS). β -glucan

antigenemia anticipates diagnosis of blood culture-negative intraabdominal candidiasis. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 188, n. 9, p. 1100-9, 2013.

TUMBARELLO, M.; FIORI, B.; TRECARCHI, E.M.; POSTERARO, P.; LOSITO, A.R.; DE LUCA, A.; SANGUINETTI, M.; FADDA, G.; CAUDA, R.; POSTERARO, B. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. **PLoS One.** v. 7, n. 3, e33705, 2012.

UNDERHILL, D.M.; ILIEV, I.D. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. **Nature Reviews Immunology.** v. 14, n. 6, p. 405-416, 2014.

VADKERTIOVÁ, R. e SLÁVIKOVÁ, E. Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. **J. Basic Microbiol.** v. 46, n. 2, p. 145–152, 2006.

VANNINI, M.; EMERY, S.; LIEUTIER-COLAS, F.; LEGUEULT, K.; MONDAIN, V.; RETUR, N.; GASTAUD, L.; POMARES, C.; HASSEINE, L. Epidemiology of candidemia in NICE area, France: A five-year study of antifungal susceptibility and mortality. **J Mycol Med.** v. 32, n. 1, p. 101210, 2022.

VAUTIER, S.; DRUMMOND, R.A.; CHEN, K.; MURRAY, G.I.; KADOSH, D.; BROWN, A.J.; GOW, N.A.; MACCALLUM, D.M.; KOLLS, J.K.; BROWN, G.D. *Candida albicans* colonization and dissemination from the murine gastrointestinal tract: the influence of morphology and Th17 immunity. **Cell Microbiol.** v. 17, n. 4, p. 445-50, 2015.

VAZQUEZ, J.; REBOLI, A.C.; PAPPAS, P.G.; PATTERSON, T.F.; REINHARDT, J.; CHIN-HONG, P.; TOBIN, E.; KETT, D.H.; BISWAS, P.; SWANSON, R. Evaluation of an early step-down strategy from intravenous anidulafungin to oral azole therapy for the treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis: results from an open-label trial. **BMC Infect Dis.** v. 14, p. 97, 2014.

VERDUYN LUNEL, F.M.; DONNELLY, J.P.; VAN DER LEE, H.A.; BLIJLEVENS, N.M.; VERWEIJ, P.E. Circulating *Candida*-specific anti-mannan antibodies precede invasive candidiasis in patients undergoing myelo-ablative chemotherapy. **Clin Microbiol Infect.** v. 15, n. 4, p. 380-6, 2009.

VERGIDIS, P.; CLANCY, C.J.; SHIELDS, R.K.; PARK, S.Y.; WILDFEUER, B.N.; SIMMONS, R.L.; NGUYEN, M.H. Intra-abdominal Candidiasis: The Importance of Early Source Control and Antifungal Treatment. **PLoS One.** v. 11, n. 4, e0153247, 2016.

VON LILIENFELD-TOAL, M.; WAGENER, J.; EINSELE, H., CORNELLY, O.A.; KURZAI, O. Invasive Fungal Infection. **Deutsches Ärzteblatt International.** v. 116, n. 16, p. 271-278, 2019.

WALKER, G.M.; WHITE, N.A. Introduction to Fungal Physiology. **In Fungi: Biology and Applications**; Kavanagh, K., Ed.; Wiley-Blackwell: Chichester, UK, p. 4, 2017.

WALL, G.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; VIDAL BONIFACIO, B.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; UPPULURI, P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Curr Opin Microbiol.** v. 52, p. 1-6, 2019.

WANG H.; XU, Y.C.; HSUEH, P.R. Epidemiology of candidemia and antifungal susceptibility in invasive *Candida* species in the Asia-Pacific region. **Future Microbiol.** v. 11, p. 1461-1477, 2016.

WEBB, B.J.; FERRARO, J.P.; REA, S.; KAUFUSI, S.; GOODMAN, B.E.; SPALDING, J. Epidemiology and Clinical Features of Invasive Fungal Infection in a US Health Care Network. **Open Forum Infect Dis.** v. 5, n. 8, ofy187, 2018.

WHITE, T.C. Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 41, n. 7, p. 1482-7, 1997a.

WHITE, T.C. The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14 α demethylase in *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 41, n. 7, p. 1488-94, 1997b.

WIGHTMAN, R.; BATES, S.; AMORNRRATTANAPAN, P.; SUDBERY, P. In *Candida albicans*, the Nim1 kinases Gin4 and Hsl1 negatively regulate pseudohypha formation and Gin4 also controls septin organization. **J Cell Biol.** v. 164, n. 4, p. 581-91, 2004.

WILLIAMS, D.W.; JORDAN, R.P.; WEI, X.Q.; ALVES, C.T.; WISE, M.P.; WILSON, M.J.; LEWIS, M.A. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. **J Oral Microbiol.** v. 5, 2013.

WILLIAMS, R.B.; LORENZ, M.C. Multiple Alternative Carbon Pathways Combine To Promote *Candida albicans* Stress Resistance, Immune Interactions, and Virulence. **mBio.** v. 11, n. 1, e03070-19, 2020.

WILSON, D.N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. **Nat Rev Microbiol.** v. 12, n. 1, p. 35-48, 2014.

WISE, R. A review of the mechanisms of action and resistance of antimicrobial agents. **Can Respir J.** v. 6, Suppl A, p. 20A-2^a, 1999.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin Infect Dis.** v. 39, n. 3, p. 309-17, 2004.

WUYTS, J.; VAN DIJCK, P.; HOLTAPPELS, M. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? **PLoS Pathog.** v. 14, n. 10, e1007301, 2018.

XIAO, Z.; WANG, Q.; ZHU, F.; NA, Y. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and mortality risk factors of candidemia among critically ill patients: a retrospective study from 2011 to 2017 in a teaching hospital in China. **Antimicrob Resist Infect Control.** p. 8:89, 2019.

XIE, Z.; THOMPSON, A.; SOBUE, T.; KASHLEVA, H.; XU, H.; VASILAKOS, J.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. *Candida albicans* biofilms do not trigger reactive oxygen species and evade neutrophil killing. **J Infect Dis.** v. 206, n. 12, p. 1936-45, 2012.

XU, J.; SCHWARTZ, K.; BARTOCES, M.; MONSUR, J.; SEVERSON, R.K.; SOBEL, J.D. Effect of antibiotics on vulvovaginal candidiasis: a MetroNet study. **J Am Board Fam Med.** v. 21, n. 4, p. 261-8, 2008.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Ther Clin Risk Manag.** v. 10, p. 95– 105, 2014.

YONEYAMA, H.; KATSUMATA, R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. **Biosci Biotechnol Biochem.** v. 70, n. 5, p. 1060-75, 2006.

ZAGAGLIA, C.; AMMENDOLIA, M.G.; MAURIZI, L.; NICOLETTI, M.; LONGHI, C. Urinary Tract Infections Caused by Uropathogenic *Escherichia coli* Strains-New Strategies for an Old Pathogen. **Microorganisms.** v. 10, n. 7, p. 1425. 2022.

ZARNOWSKI, R.; WESTLER, W.M.; LACMBOUH, G.A.; MARITA, J.M.; BOTHE, J.R.; BERNHARDT, J.; LOUNES-HADJ SAHRAOUI, A.; FONTAINE, J.; SANCHEZ, H.; HATFIELD, R.D.; NTAMBI, J.M.; NETT, J.E.; MITCHELL, A.P.; ANDES, D.R. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. **mBio.** v. 5, n. 4, e01333-14, 2014.

ZENG, D.; DEBABOV, D.; HARTSELL, T.L.; CANO, R.J.; ADAMS, S.; SCHUYLER, J.A.; MCMILLAN, R.; PACE, J.L. Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance. **Cold Spring Harb Perspect Med.** v. 6, n. 12, a026989, 2016.

ZHAI, B.; OLA, M.; ROLLING, T.; TOSINI, N.L.; JOSHOWITZ, S.; LITTMANN, E.R.; AMORETTI, L.A.; FONTANA, E.; WRIGHT, R.J.; MIRANDA, E.; VEELKEN, C.A.; MORJARIA, S.M.; PELED, J.U.; VAN DEN BRINK, M.R.M.; BABADY, N.E.; BUTLER, G.; TAUR, Y.; HOHL, T.M. High-resolution mycobiota analysis reveals dynamic intestinal translocation preceding invasive candidiasis. **Nat Med.** v. 26, n. 1, p. 59-64, 2020.

ZILBERBERG, M.D.; NATHANSON, B.H.; HARRINGTON, R.; SPALDING, J.R.; SHORR, A.F. Epidemiology and Outcomes of Hospitalizations With Invasive Aspergillosis in the United States, 2009-2013. **Clin Infect Dis.** v. 67, n. 5, p. 727-735, 2018.

APÊNDICES

- **Artigo submetido**

Medical Mycology



Antibacterials promote the development of persistent cells in biofilms of *Candida albicans* from cases of fungemia

Journal:	<i>Medical Mycology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Portela, Fernando Victor; Federal University of Ceará Andrade, Ana Raquel; Federal University of Ceará Pereira, Livia; Federal University of Ceará Silva, Bruno; Federal University of Ceará Peixoto, Paulo Henrique ; Federal University of Ceará Amando, Bruno Rocha; Federal University of Ceará Fiallos, Nicole; Federal University of Ceará; University of Florida Freitas, Pedro; Federal University of Ceara Lima-Neto, Reginaldo; Federal University of Pernambuco Guedes, Glaucia; Federal University of Ceará Castelo-Branco, Débora; Federal University of Ceará Cordeiro, Rossana; Federal University of Ceará
Keyword:	BIOFILMS, persistent cells, antibiotics, infections, <i>Candida</i>
Abstract:	<p>Background. <i>Candida albicans</i> candidemia is one of the main causes of invasive infections and is considered a global health problem. In such cases, the formation of biofilms on implanted devices represents a therapeutic challenge and the presence of metabolically inactive persistent cells (PCs) in these communities increases the tolerance of biofilms to fungicidal drugs.</p> <p>Objectives. The present study investigated the influence of six antibiotics (amoxicillin, AMX; cefepime, CEF; gentamicin, GEN; amikacin, AMK; vancomycin, VAN; and ciprofloxacin, CIP) on the production of PCs in <i>C. albicans</i> biofilms.</p> <p>Methods. Biofilms (n=6) were formed on polystyrene plates containing RPMI 1640 supplemented with antibiotics at a concentration equivalent to the plasmatic peak of each drug, treated with amphotericin B and analyzed for viable cells. All the isolates tested were able to produce biofilms and form PCs.</p> <p>Results. Biofilms formed with antibiotics produced greater quantities of PCs (up to 10x in AMX and CIP; 5x in CEF; and 6x in GEN and VAN); only CIP was unable to stimulate the production of PCs.</p> <p>Conclusions. The results suggested that antibiotics can modulate PC production in <i>C. albicans</i> biofilms. This scenario may have clinical repercussions in vulnerable patients, making it difficult to treat biofilm-mediated infections and facilitating recurrences</p>

<http://mc.manuscriptcentral.com/tmmy>

- **Publicações (coautoria)**



Medical Mycology, 2019, 0, 1–8
 doi: 10.1093/mmy/myy160
 Advance Access Publication Date: 0 2019
 Original Article



Original Article

Farnesol inhibits planktonic cells and antifungal-tolerant biofilms of *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin*

Rossana de Aguiar Cordeiro^{1,2}, Livia Maria Galdino Pereira¹, José Kleybson de Sousa¹, Rosana Serpa¹, Ana Raquel Colares Andrade¹, Fernando Victor Monteiro Portela², Antônio José de Jesus Evangelista², Jamille Alencar Sales³, Ana Luiza Ribeiro Aguiar¹, Patrícia Bruna Leite Mendes¹, Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante^{1,2}, José Júlio da Costa Sidrim^{1,2}, Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco^{1,*} and Marcos Fabio Gadelha Rocha^{1,3}

¹Faculty of Medicine, Post Graduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Brazil, ²Faculty of Medicine, Post Graduate Program in Medical Sciences, Federal University of Ceará, Brazil and ³Faculty of Veterinary Medicine, Post Graduate Program in Veterinary Science, State University of Ceará, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. Prof. Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco, PhD, Faculty of Medicine, Post Graduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Brazil. Tel: +55 85 33668594. E-mail: deb_castelobranco@yahoo.com

Received 29 August 2018; Revised 20 November 2018; Accepted 21 December 2018; Editorial Decision 7 December 2018

Abstract

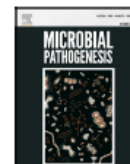
Trichosporon species have been considered important agents of opportunistic systemic infections, mainly among immunocompromised patients. Infections by *Trichosporon* spp. are generally associated with biofilm formation in invasive medical devices. These communities are resistant to therapeutic antifungals, and therefore the search for anti-biofilm molecules is necessary. This study evaluated the inhibitory effect of farnesol against planktonic and sessile cells of clinical *Trichosporon asahii* ($n = 3$) and *Trichosporon inkin* ($n = 7$) strains. Biofilms were evaluated during adhesion, development stages and after maturation for metabolic activity, biomass and protease activity, as well as regarding morphology and ultrastructure by optical microscopy, confocal laser scanning microscopy, and scanning electron microscopy. Farnesol inhibited *Trichosporon* planktonic growth by 80% at concentrations ranging from 600 to 1200 μM for *T. asahii* and from 75 to 600 μM for *T. inkin*. Farnesol was able to reduce cell adhesion by 80% at 300 μM for *T. asahii* and *T. inkin* at 600 μM , while biofilm development of both species was inhibited by 80% at concentration of 150 μM , altering their structure. After biofilm maturation, farnesol decreased *T. asahii* biofilm formation by 50% at 600 μM concentration and *T. inkin* formation at 300 μM . Farnesol inhibited gradual filamentation in a concentration range between 600 and 1200 μM . Farnesol caused reduction of filament structures of *Trichosporon* spp. at every stage of biofilm development analyzed. These data show the potential of farnesol as an anti-biofilm molecule.

Key words: *Trichosporon*, biofilm, farnesol, filamentation.



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpathSodium butyrate inhibits planktonic cells and biofilms of *Trichosporon* spp.

Rossana de Aguiar Cordeiro^{a,b}, Ana Luíza Ribeiro Aguiar^a, Vandbergue Santos Pereira^a,
Lívia Maria Galdino Pereira^a, Fernando Victor Monteiro Portela^b,
Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante^{a,b}, Zoilo Pires de Camargo^c, José Júlio Costa Sidrim^a,
Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco^{a,*}, Marcos Fábio Gadelha Rocha^{a,d}

^a Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil

^b Postgraduate Program in Medical Sciences, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil

^c Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of São Paulo, São Paulo-SP, Brazil

^d School of Veterinary, Postgraduate Program in Veterinary Science, State University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

*Trichosporon asahii**Trichosporon inkin*

Biofilms

Sodium butyrate

ABSTRACT

Trichosporon spp. have been increasingly recognized as an important pathogen of invasive and disseminated infections in immunocompromised patients. These species are prone to form biofilms in medical devices such as catheters and prosthesis, which are associated with antifungal resistance and therapeutic failure. Therefore, new antifungals with a broader anti-biofilm activity need to be discovered. In the present study we evaluate the inhibitory potential of sodium butyrate (NaBut) – a histone deacetylase inhibitor that can alter chromatin conformation – against planktonic and sessile cells of *T. asahii* and *T. inkin*. Minimum inhibitory concentration (MIC) of NaBut against planktonic cells was evaluated by microdilution and morphological changes were analyzed by optical microscopy on malt agar supplemented with NaBut. Biofilms were evaluated during adhesion, development and after maturation for metabolic activity and biomass, as well as regarding ultrastructure by scanning electron microscopy and confocal laser scanning microscopy. NaBut inhibited the growth of planktonic cells by 50% at 60 mM or 120 mM ($p < 0.05$) and also reduced filamentation of *Trichosporon* spp. NaBut reduced adhesion of *Trichosporon* cells by 45% (10xMIC) on average ($p < 0.05$). During biofilm development, NaBut (10xMIC) reduced metabolic activity and biomass up to 63% and 81%, respectively ($p < 0.05$). Mature biofilms were affected by NaBut (10xMIC), showing reduction of metabolic activity and biomass of approximately 48% and 77%, respectively ($p < 0.05$). Ultrastructure analysis showed that NaBut (MIC and 10xMIC) was able to disassemble mature biofilms. The present study describes the antifungal and anti-biofilm potential of NaBut against these opportunist emerging fungi.

1. Introduction

In the last decades invasive fungal infections (IFIs) have been considered a public health problem, especially in immunocompromised patients [1,2]. Although most IFIs are caused by *Candida*, *Cryptococcus* and *Aspergillus*, other fungal genera have been prominent in this scenario in the last years, being considered emerging pathogens in systemic infections [2–4]. In this context, *Trichosporon* spp. are considered the second leading cause of IFIs caused by yeasts in patients with malignant hematological diseases [5]. These pathogens presents intrinsic resistance to echinocandins and, in certain cases, reduced susceptibility to amphotericin B and azoles, which evidences the limited therapeutic arsenal to combat invasive trichosporonosis infections [5–7].

The growing incidence of IFI caused by *Trichosporon* spp. could be explained by its ability to express several virulence factors, such as hyphal differentiation, synthesis of extracellular enzymes and biofilm formation [8–10]. The latter is directly associated with invasive trichosporonosis with high morbidity and mortality rates in patients with intracorporeal medical devices [11]. The tolerance of *Trichosporon* biofilms to antifungal agents demands alternative strategies for prevention, treatment and control of such structures, especially regarding nosocomial infections [11,12].

The present study aimed to evaluate the effect of sodium butyrate (NaBut) - a histone deacetylase inhibitor drug - on clinical strains of *Trichosporon* spp. Previous studies have shown that histone deacetylase inhibitors (HDACi) are important regulators of the expression of genes

* Corresponding author. .

E-mail address: deb.castelobranco@ufc.br (D.d.S.C.M. Castelo-Branco).

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.013>

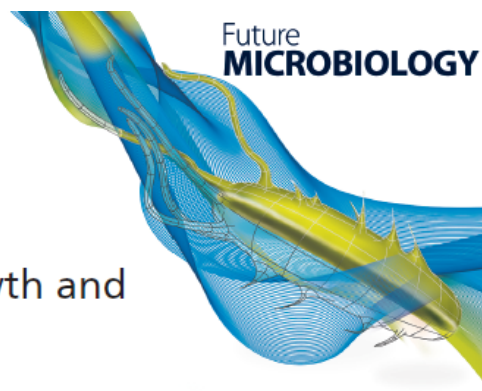
Received 13 November 2018; Received in revised form 8 March 2019; Accepted 8 March 2019

Available online 14 March 2019

0882-4010/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.

Short Communication

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com



Efflux pump inhibition controls growth and enhances antifungal susceptibility of *Fusarium solani* species complex

Rossana de A Cordeiro^{‡,1}, Fernando VM Portela^{‡,1}, Livia MG Pereira¹, Ana RC de Andrade¹, José K de Sousa¹, Ana LR Aguiar¹, Mariana LM Pergentino¹, Gyrliane S de Sales¹, Jonathas S de Oliveira¹, Delia JA Medrano¹, Raimunda SN Brilhante¹, Marcos FG Rocha^{1,2}, Débora de SCM Castelo-Branco^{*,1} & José JC Sidrim¹

¹Department of Pathology and Legal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

²Post Graduate Program in Veterinary Sciences, College of Veterinary Medicine, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

*Author for correspondence: Tel.: +55 853 366 8594; deb.castelobranco@yahoo.com

‡ Authors contributed equally

Aim: To evaluate the inhibition of efflux pumps by using promethazine (PMZ) as a strategy to control *Fusarium solani* species complex (FSSC). **Materials & methods:** The susceptibility of FSSC strains to PMZ and the interaction between PMZ and antifungals were evaluated. The efflux pump activity was confirmed by flow cytometry with rhodamine 6G. Finally, PMZ was tested against FSSC biofilms. **Results:** PMZ inhibited FSSC planktonic growth and showed synergism with antifungals. PMZ reduced R6G efflux and inhibited cell adhesion, impaired the development of biofilms and disrupted mature biofilms. PMZ-challenged biofilms showed increased sensitivity to amphotericin B. **Conclusion:** The study provides indirect evidence of the occurrence of efflux pumps in FSSC and opens a perspective for this target in the control of fusariosis.

First draft submitted: 17 June 2019; Accepted for publication: 19 December 2019; Published online: 11 February 2020

Keywords: antifungal resistance • biofilm resistance • biofilms • fungal keratitis • *Fusarium solani* • promethazine • synergism

Fungal keratitis is a severe infection that occurs in the layers of the cornea. In this process, fungi may invade tissues the corneal surface, resulting in an immune-mediated inflammatory process, which finally leads to more tissue damage and scarring with cornea opacification [1]. Trauma, contact lenses wear and immunosuppressive disease or medication are recognized as important risk factors for fungal keratitis [1–4]. In tropical and subtropical areas, the disease is caused mainly by fungi species [4], such as *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. and *Candida* spp. [1]. Although epidemiology data of fungal keratitis in Brazil is scarce, previous studies have shown a great variation in the etiology of fungal keratitis in the country; frequencies ranged from 51.9 to 67% for *Fusarium*, 9.1–23.53% for *Aspergillus* and 10–93.9% for *Candida* [5–8].

Fusarium keratitis is recognized as a challenging infection, frequently showing refractoriness and poor outcome [4]. *Fusarium* keratitis is caused mainly by the *Fusarium solani* species complex [4] (FSSC), whose members are resistant to fluconazole, itraconazole [9,10] and voriconazole [11] and exhibit tolerance to amphotericin B [9,12]. Although resistance mechanisms in *Fusarium* are not fully understood, some authors suggest that mutations in 14 α -demethylase gene might be related to azole tolerance/resistance [9]. In addition, *Fusarium* spp. are able to form biofilms on contact lenses and biotic surfaces [3,13–15]. These sessile communities provide greater protection to antimicrobials and the immune response of the host and are even more difficult to eradicate than their planktonic counterparts [16–18].

For other fungal species, such as *Candida albicans* [19], *Candida tropicalis* [20] and *Malassezia* [21], overexpression of drugs efflux pumps have also been associated with the azole resistance [22–24]. Therefore, efflux pumps inhibitors have been considered a strategy to overcome fungal resistance [23]. Promethazine (PMZ), for instance, shows antimicrobial activity against bacteria [25] and fungi [19,20] in both planktonic and sessile forms.

Future
Medicine



Biofouling

The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research





ISSN: 0892-7014 (Print) 1029-2454 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gbif20>


Proposal for a microcosm biofilm model for the study of vulvovaginal candidiasis

Rossana de Aguiar Cordeiro, Ana Raquel Colares de Andrade, **Fernando Victor Monteiro Portela**, Lívia Maria Galdino Pereira, Santiago Gonçalves Bezerra Moura, Mônica Dantas Sampaio, Estefania Mota Araripe Pereira, Gláucia Morgana de Melo Guedes, Silviane Praciano Bandeira, Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto, Vânia Maria Maciel Melo, Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, Débora Souza Collares Maia Castelo-Branco, Marcos Fábio Gadelha Rocha & José Júlio Costa Sidrim



To cite this article: Rossana de Aguiar Cordeiro, Ana Raquel Colares de Andrade, Fernando Victor Monteiro Portela, Lívia Maria Galdino Pereira, Santiago Gonçalves Bezerra Moura, Mônica Dantas Sampaio, Estefania Mota Araripe Pereira, Gláucia Morgana de Melo Guedes, Silviane Praciano Bandeira, Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto, Vânia Maria Maciel Melo, Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, Débora Souza Collares Maia Castelo-Branco, Marcos Fábio Gadelha Rocha & José Júlio Costa Sidrim (2020): Proposal for a microcosm biofilm model for the study of vulvovaginal candidiasis, *Biofouling*, DOI: [10.1080/08927014.2020.1785435](https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1785435)



To link to this article: <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1785435>

 View supplementary material 

 Published online: 03 Jul 2020.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 

 View Crossmark data 

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gbif20>



Trichosporon asahii and *Trichosporon inkin* Biofilms Produce Antifungal-Tolerant Persister Cells

Rossana de Aguiar Cordeiro^{1*}, Ana Luiza Ribeiro Aguiar^{1†}, Bruno Nascimento da Silva¹, Lívia Maria Galdino Pereira¹, Fernando Victor Monteiro Portela¹, Zoilo Pires de Camargo², Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto³, Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco¹, Marcos Fábio Gadelha Rocha^{1,4} and José Júlio Costa Sidrim¹

¹ Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, ² Department of Medicine, Discipline of Infectious Diseases, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ³ Tropical Medicine Department, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil, ⁴ College of Veterinary, State University of Ceará, Fortaleza, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Maria José Soares Mendes Giannini,
São Paulo State University, Brazil

Reviewed by:

Aylin Döğen,
Mersin University, Turkey
Taissa Villa,
Federal University of Rio de Janeiro,
Brazil

*Correspondence:

Rossana de Aguiar Cordeiro
rossanacordeiro@ufc.br

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Fungal Pathogenesis,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

Received: 24 December 2020

Accepted: 17 February 2021

Published: 22 April 2021

Citation:

Cordeiro RdA, Aguiar ALR, Silva BN,
Pereira LMG, Portela FVM,
Camargo ZP, Lima-Neto FG,
Castelo-Branco DdSCM, Rocha MFG
and Sidrim JJC (2021) *Trichosporon*
asahii and *Trichosporon inkin*
Biofilms Produce Antifungal-
Tolerant Persister Cells.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 11:645812.
doi: 10.3389/fcimb.2021.645812

Persister cells are metabolically inactive dormant cells that lie within microbial biofilms. They are phenotypic variants highly tolerant to antimicrobials and, therefore, associated with recalcitrant infections. In the present study, we investigated if *Trichosporon asahii* and *T. inkin* are able to produce persister cells. *Trichosporon* spp. are ubiquitous fungi, commonly found as commensals of the human skin and gut microbiota, and have been increasingly reported as agents of fungemia in immunocompromised patients. Biofilms derived from clinical strains of *T. asahii* (n=5) and *T. inkin* (n=7) were formed in flat-bottomed microtiter plates and incubated at 35°C for 48 h, treated with 100 µg/ml amphotericin B (AMB) and incubated at 35°C for additional 24 h. Biofilms were scraped from the wells and persister cells were assayed for susceptibility to AMB. Additionally, we investigated if these persister cells were able to generate new biofilms and studied their ultrastructure and AMB susceptibility. Persister cells were detected in both *T. asahii* and *T. inkin* biofilms and showed tolerance to high doses of AMB (up to 256 times higher than the minimum inhibitory concentration). Persister cells were able to generate biofilms, however they presented reduced biomass and metabolic activity, and reduced tolerance to AMB, in comparison to biofilm growth control. The present study describes the occurrence of persister cells in *Trichosporon* spp. and suggests their role in the reduced AMB susceptibility of *T. asahii* and *T. inkin* biofilms.

Keywords: antifungal susceptibility, dormant cells, *Trichosporon* spp., amphotericin B, trichosporonosis

INTRODUCTION

Trichosporon spp. are ubiquitous fungi, commonly found as commensals of the human skin and gastrointestinal tract (Duarte-Oliveira et al., 2017). *Trichosporon* species are emerging opportunistic fungi that have been increasingly reported as agents of fungemia in the last years, especially in immunocompromised patients (Challapilla et al., 2019; Sah et al., 2019; Alp et al., 2020). Furthermore,



Original Article

Vancomycin enhances growth and virulence of *Trichosporon* spp. planktonic cells and biofilms

Rossana de Aguiar Cordeiro^{1,†}, Bruno Nascimento da Silva^{1,†}, Ana Luiza Ribeiro de Aguiar¹, Livia Maria Galdino Pereira¹, Fernando Victor Monteiro Portela¹, Maria Gleiciane da Rocha², Mariana Lara Mendes Pergentino¹, Gyrliane de Santos Sales¹, José Kleybson de Sousa¹, Zoilo Pires de Camargo³, Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante¹, Marcos Fábio Gadelha Rocha^{1,2}, Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco^{1,*} and José Júlio Costa Sidrim¹

¹Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará. Rua Cel. Nunes de Melo, 1315 - Rodolfo Teófilo - CEP: 60430-275, Fortaleza, Ceará, Brazil, ²Postgraduate Program in Veterinary Sciences, College of Veterinary, State University of Ceará. Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, CEP: 60714–903, Fortaleza, Ceará, Brazil and ³Federal University of São Paulo (UNIFESP), Department of Medicine, Discipline of Infectious Diseases, São Paulo-SP, CEP: 04023-062, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco, E-mail: deb_castelobranco@yahoo.com

†These authors contributed equally to this work.

Received 30 November 2020; Accepted 13 January 2021; Editorial Decision 4 January 2021

Abstract

Invasive fungal infections (IFIs) are important worldwide health problem, affecting the growing population of immunocompromised patients. Although the majority of IFIs are caused by *Candida* spp., other fungal species have been increasingly recognized as relevant opportunistic pathogens. *Trichosporon* spp. are members of skin and gut human microbiota. Since 1980's, invasive trichosporonosis has been considered a significant cause of fungemia in patients with hematological malignancies. As prolonged antibiotic therapy is an important risk factor for IFIs, the present study investigated if vancomycin enhances growth and virulence of *Trichosporon*. Vancomycin was tested against *T. inkin* (n = 6) and *T. asahii* (n = 6) clinical strains. Planktonic cells were evaluated for their metabolic activity and virulence against *Caenorhabditis elegans*. Biofilms were evaluated for metabolic activity, biomass production, amphotericin B tolerance, induction of persister cells, and ultrastructure. Vancomycin stimulated planktonic growth of *Trichosporon* spp., increased tolerance to AMB, and potentiates virulence against *C. elegans*. Vancomycin stimulated growth (metabolic activity and biomass) of *Trichosporon* spp. biofilms during all stages of development. The antibiotic increased the number of persister cells inside *Trichosporon* biofilms. These cells showed higher tolerance to AMB than *persister cells* from VAN-free biofilms. Microscopic analysis showed that VAN increased production of extracellular matrix and cells in *T. inkin* and *T. asahii* biofilms. These results suggest that antibiotic exposure may have a direct impact on the pathophysiology of opportunistic trichosporonosis in patients at risk.



Biofouling

The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gbif20>

Heterologous extracellular DNA facilitates the development of *Trichosporon asahii* and *T. inkin* biofilms and enhances their tolerance to antifungals

Lívia Maria Galdino Pereira, Ana Raquel Colares de Andrade, Fernando Victor Monteiro Portela, Ana Luiza Ribeiro Aguiar, Bruno Nascimento da Silva, Santiago Gonçalves Bezerra Moura, Mariana Lara Mendes Pergentino, Marcos Fábio Gadelha Rocha, José Júlio da Costa Sidrim, Débora de Souza Collares Maia Castelo Branco & Rossana de Aguiar Cordeiro

To cite this article: Lívia Maria Galdino Pereira, Ana Raquel Colares de Andrade, Fernando Victor Monteiro Portela, Ana Luiza Ribeiro Aguiar, Bruno Nascimento da Silva, Santiago Gonçalves Bezerra Moura, Mariana Lara Mendes Pergentino, Marcos Fábio Gadelha Rocha, José Júlio da Costa Sidrim, Débora de Souza Collares Maia Castelo Branco & Rossana de Aguiar Cordeiro (2022) Heterologous extracellular DNA facilitates the development of *Trichosporon asahii* and *T. inkin* biofilms and enhances their tolerance to antifungals, *Biofouling*, 38:8, 778-785, DOI: [10.1080/08927014.2022.2130788](https://doi.org/10.1080/08927014.2022.2130788)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/08927014.2022.2130788>



Published online: 09 Oct 2022.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 28



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gbif20>



Malassezia spp. and *Candida* spp. from patients with psoriasis exhibit reduced susceptibility to antifungals

Rossana de Aguiar Cordeiro¹ · Ane Teles Reis¹ · Xinaida Taligare Vasconcelos Lima¹ · Ana Raquel Colares de Andrade¹ · Ana Luiza Ribeiro Aguiar¹ · Fernando Victor Monteiro Portela¹ · Lívia Maria Galdino Pereira¹ · Santiago Gonçalves Bezerra Moura¹ · Bruno Nascimento da Silva¹ · Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto² · Débora Castelo-Branco Souza Collares Maia¹ · Marcos Fábio Gadelha Rocha^{1,3} · José Júlio Costa Sidrim¹

Received: 17 November 2021 / Accepted: 22 November 2022
© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Microbiologia 2022

Abstract

Introduction Psoriasis is a chronic inflammatory disease that affects over 125 million people worldwide. Many studies have shown the importance of the microbiome for psoriasis exacerbation.

Aim Explore the fungal load and species composition of cultivable yeasts on the skin of psoriatic patients (PP) and healthy volunteers living in a tropical area and evaluate the susceptibility to antifungals.

Methodology A cross-sectional study with 61 participants (35 patients and 26 healthy controls) was performed during August 2018 and May 2019. Clinical data were collected from patient interviewing and/or medical records review. Samples were collected by swabbing in up to five anatomic sites. Suggestive yeast colonies were counted and further identified by phenotypical tests, PCR-REA, and/or MALDI-TOF. Susceptibility of *Malassezia* spp. and *Candida* spp. to azoles, terbinafine, and amphotericin B was evaluated by broth microdilution.

Results Nearly 50% of the patients had moderate to severe psoriasis, and plaque-type psoriasis was the most common clinical form. Yeast colonies count was significantly more abundant among PP than healthy controls. *Malassezia* and *Candida* were the most abundant genus detected in all participants. Higher MIC values for ketoconazole and terbinafine were observed in *Malassezia* strains obtained from PP. Approximately 42% of *Candida* isolates from PP showed resistance to itraconazole in contrast to 12.5% of isolates from healthy controls. MIC values for fluconazole and amphotericin B were significantly different among *Candida* isolates from PP and healthy individuals.

Conclusion This study showed that *Malassezia* and *Candida* strains from PP presented higher MIC values to widespread antifungal drugs than healthy individuals.

Keywords Psoriasis · Yeast · Mycobiota · Antifungal susceptibility

Introduction

Psoriasis is a chronic inflammatory disease that affects over 125 million people worldwide—approximately 2 to 3% of the global population [1, 2]. Scientific evidences attest that psoriasis is a T-cell mediated disease in which the interaction between T lymphocytes and keratinocytes triggers innate and adaptative responses, with up regulation of proinflammatory cytokines [1, 3]. Genetic and immunological factors of the host are well related to the pathobiology of the disease. In addition, environmental conditions and allergens from skin microbiota exacerbate the disease: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, and *Malassezia* have been repeatedly related to psoriasis [3–5].

Rossana de Aguiar Cordeiro and Ane Teles Reis contributed equally to this work.

Responsible Editor: Luis Nero

✉ Rossana de Aguiar Cordeiro
rossanacordeiro@ufc.br




¹ Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

² Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

³ State University of Ceará, Fortaleza, Brazil

Article

Clinical, Epidemiological and Laboratory Features of Invasive *Candida parapsilosis* Complex Infections in a Brazilian Pediatric Reference Hospital during the COVID-19 Pandemic

Paulo Henrique Peixoto ¹, Maria Laina Silva ¹, Fernando Victor Portela ¹, Bruno da Silva ¹, Edlány Milanez ¹, Denis de Oliveira ¹, Aldaiza Ribeiro ², Henrique de Almeida ³, Reginaldo Lima-Neto ³ , Gláucia Morgana Guedes ¹ , Débora Castelo-Branco ¹  and Rossana Cordeiro ^{1,*}

¹ Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza 60430-160, Brazil; a59517c@gmail.com (P.H.P.); mlaina.silva@gmail.com (M.L.S.); portelafvm@gmail.com (F.V.P.); brunnonascimentoasilva@gmail.com (B.d.S.); edlanybio@gmail.com (E.M.); denisfgo@ufc.br (D.d.O.); glauciaguades@ufc.br (G.M.G.); deb_castelo@branco@yahoo.com (D.C.-B.)

² Albert Sabin Children Hospital, Fortaleza 60410-794, Brazil; aldaizamr@gmail.com

³ Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Recife 50670-901, Brazil; mrschinaski@gmail.com (H.d.A.); reginaldo.limant@ufpe.br (R.L.-N.)

* Correspondence: rossanacordeiro@ufc.br

Abstract: The present study aimed to describe the clinical, epidemiological and laboratory characteristics of invasive candidiasis by *C. parapsilosis* complex (CPC) in a Brazilian tertiary pediatric hospital during the COVID-19 pandemic. Clinical samples were processed in the BACT/ALERT[®] 3D system or on agar plates. Definitive identification was achieved by MALDI-TOF MS. Antifungal susceptibility was initially analyzed by the VITEK 2 system (AST-YS08 card) and confirmed by the CLSI protocol. Patient data were collected from the medical records using a structured questionnaire. CPC was recovered from 124 patients over an 18-month period, as follows: *C. parapsilosis* (83.87%), *C. orthopsilosis* (13.71%) and *C. metapsilosis* (2.42%). Antifungal resistance was not detected. The age of the patients with invasive CPC infections ranged from <1 to 18 years, and most of them came from oncology-related sectors, as these patients were more affected by *C. parapsilosis*. *C. orthopsilosis* infections were significantly more prevalent in patients from critical care units. Invasive infections caused by different pathogens occurred in 75 patients up to 30 days after the recovery of CPC isolates. Overall, 23 (18.55%) patients died within 30 days of CPC diagnosis. Catheter removal and antifungal therapy were important measures to prevent mortality. COVID-19 coinfection was only detected in one patient.

Keywords: *Candida parapsilosis* complex; invasive candidiasis; immunocompromised patients; oncological patients



Citation: Peixoto, P.H.; Silva, M.L.; Portela, F.V.; da Silva, B.; Milanez, E.; de Oliveira, D.; Ribeiro, A.; de Almeida, H.; Lima-Neto, R.; Guedes, G.M.; et al. Clinical, Epidemiological and Laboratory Features of Invasive *Candida parapsilosis* Complex Infections in a Brazilian Pediatric Reference Hospital during the COVID-19 Pandemic. *J. Fungi* 2023, 9, 844. <https://doi.org/10.3390/jof9080844>

Academic Editors: Ivana Mameković and Andreas Groll

Received: 1 June 2023

Revised: 31 July 2023

Accepted: 9 August 2023

Published: 13 August 2023



Copyright © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In the last decades, epidemiological studies have shown the dramatic worldwide increase in infections caused by non-albicans *Candida* species [1–5]. According to such studies, *C. parapsilosis* complex (CPC) are important agents of invasive candidiasis, becoming the second or third most prevalent pathogen, depending on the patient group and their geographic origin [6–8]. CPC species may be the second most common cause of candidemia in children [9,10] and have become widespread in some pediatric hospitals [11–13]. In general, *C. parapsilosis* sensu stricto is the most prevalent species, followed by *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* [10,13,14].

C. parapsilosis sensu stricto and, possibly, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*, are commensal microorganisms of the human microbiota [15], but may act as opportunistic pathogens causing systemic infections in immunocompromised patients [16,17]. Accordingly, *C. parapsilosis* sensu stricto is frequently isolated from the hands, which makes it

**Biofouling**

The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gbif20>

Promethazine inhibits efflux, enhances antifungal susceptibility and disrupts biofilm structure and functioning in *Trichosporon*

Ana Luiza Ribeiro Aguiar, Bruno Nascimento da Silva, Nicole de Mello Fiallos, Lívia Maria Galdino Pereira, Maria Laína Silva, Pedro Freitas Santos Manzi de Souza, Fernando Victor Monteiro Portela, José Júlio Costa Sidrim, Marcos Fábio Gadelha Rocha, Débora Souza Collares Maia Castelo-Branco & Rossana de Aguiar Cordeiro

To cite this article: Ana Luiza Ribeiro Aguiar, Bruno Nascimento da Silva, Nicole de Mello Fiallos, Lívia Maria Galdino Pereira, Maria Laína Silva, Pedro Freitas Santos Manzi de Souza, Fernando Victor Monteiro Portela, José Júlio Costa Sidrim, Marcos Fábio Gadelha Rocha, Débora Souza Collares Maia Castelo-Branco & Rossana de Aguiar Cordeiro (2023) Promethazine inhibits efflux, enhances antifungal susceptibility and disrupts biofilm structure and functioning in *Trichosporon*, *Biofouling*, 39:2, 218-230, DOI: [10.1080/08927014.2023.2202315](https://doi.org/10.1080/08927014.2023.2202315)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/08927014.2023.2202315>



Published online: 25 Apr 2023.

Submit your article to this journal [↗](#)

Article views: 95

View related articles [↗](#)View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gbif20>



Biofouling

The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gbif20>



β -Estradiol and progesterone enhance biofilm development and persister cell formation in monospecies and microcosms biofilms derived from vulvovaginal candidiasis

Ana Raquel Colares de Andrade, Mônica Dantas Sampaio Rezende, Fernando Victor Monteiro Portela, Livia Maria Galdino Pereira, Bruno Nascimento da Silva, Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto, Marcos Fábio Gadelha Rocha, José Júlio Costa Sidrim, Débora Souza Collares Maia Castelo-Branco & Rossana de Aguiar Cordeiro

To cite this article: Ana Raquel Colares de Andrade, Mônica Dantas Sampaio Rezende, Fernando Victor Monteiro Portela, Livia Maria Galdino Pereira, Bruno Nascimento da Silva, Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto, Marcos Fábio Gadelha Rocha, José Júlio Costa Sidrim, Débora Souza Collares Maia Castelo-Branco & Rossana de Aguiar Cordeiro (2023): β -Estradiol and progesterone enhance biofilm development and persister cell formation in monospecies and microcosms biofilms derived from vulvovaginal candidiasis, *Biofouling*, DOI: [10.1080/08927014.2023.2256674](https://doi.org/10.1080/08927014.2023.2256674)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/08927014.2023.2256674>



Published online: 12 Sep 2023.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gbif20>



Biofouling

The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: www.tandfonline.com/journals/gbif20

Antibiotics stimulates the development of persistent cells in biofilms of *Candida albicans* bloodstream isolates

Fernando Victor Monteiro Portela, Ana Raquel Colares de Andrade, Livia Maria Galdino Pereira, Bruno Nascimento da Silva, Paulo Henrique Soares Peixoto, Bruno Rocha Amando, Nicole de Mello Fiallos, Pedro de Freitas Santos Manzi de Souza, Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto, Glauca Morgana de Melo Guedes, Débora Souza Collares Maia Castelo-Branco & Rossana de Aguiar Cordeiro

To cite this article: Fernando Victor Monteiro Portela, Ana Raquel Colares de Andrade, Livia Maria Galdino Pereira, Bruno Nascimento da Silva, Paulo Henrique Soares Peixoto, Bruno Rocha Amando, Nicole de Mello Fiallos, Pedro de Freitas Santos Manzi de Souza, Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto, Glauca Morgana de Melo Guedes, Débora Souza Collares Maia Castelo-Branco & Rossana de Aguiar Cordeiro (01 Sep 2024): Antibiotics stimulates the development of persistent cells in biofilms of *Candida albicans* bloodstream isolates, Biofouling, DOI: [10.1080/08927014.2024.2396013](https://doi.org/10.1080/08927014.2024.2396013)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/08927014.2024.2396013>



Published online: 01 Sep 2024.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gbif20>