



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**CARLOS EDUARDO CORDEIRO TEIXEIRA**

**ATIVIDADE DA MOLÉCULA TIROSOL, VANCOMICINA E ANTIBIÓTICOS  
BETA-LACTÂMICOS SOBRE O CRESCIMENTO DE *Candida* SPP. RESISTENTES  
A DERIVADOS AZÓLICOS, NA FORMA PLANCTÔNICA E BIOFILME**

**FORTALEZA**

**2014**

CARLOS EDUARDO CORDEIRO TEIXEIRA

ATIVIDADE DA MOLÉCULA TIROSOL, VANCOMICINA E ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS SOBRE O CRESCIMENTO DE *Candida* SPP. RESISTENTES A DERIVADOS AZÓLICOS, NA FORMA PLANCTÔNICA E BIOFILME

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rossana de Aguiar Cordeiro

FORTALEZA  
2014



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- T265a      Teixeira, Carlos Eduardo Cordeiro.  
              Atividade da molécula tirosol, vancomicina e antibióticos beta-lactâmicos sobre o crescimento de *candida* spp. resistentes a derivados azólicos, na forma planctônica e biofilme./ Carlos Eduardo Cordeiro Teixeira. – 2014.  
              87 f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Doutorado em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2014.  
              Área de Concentração: Microbiologia Humana e Animal.  
              Orientação: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.  
              Co-Orientação: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro
1. Candida. 2. Biofilmes. 3. Antibacterianos. I. Título.

---

CDD 616.969

CARLOS EDUARDO CORDEIRO TEIXEIRA

ATIVIDADE DA MOLÉCULA TIROSOL, VANCOMICINA E ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS SOBRE O CRESCIMENTO DE *Candida* SPP. RESISTENTES A DERIVADOS AZÓLICOS, NA FORMA PLANCTÔNICA E BIOFILME

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rossana de Aguiar Cordeiro

Aprovada em: 26/09/10

BANCA EXAMINADORA



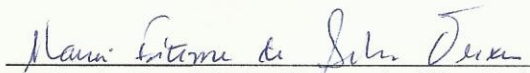
Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha (Orientador)  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)



Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro (Co - orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)



Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)



Profa. Dra. Debora Castelo Branco de Souza Collares Maia  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À professora Alzira Marques Teixeira (*in  
memoriam*, minha avó paterna), pelos  
primeiros ensinamentos e conhecimentos  
transmitidos.

Aos meus pais, Ilmarck Teixeira e Teresinha  
Cordeiro, por todo o apoio necessário para  
minha formação e mais ainda por estarem  
sempre ao meu lado, estendendo as mãos  
sempre que precisei.

Ao meu orientador, professor Dr. Marcos  
Fábio Gadelha Rocha, por todo apoio, carinho  
e dedicação à minha formação.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter concedido a minha vida e estar sempre comigo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica - PPGMM, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo e apoio financeiro.

Ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Universidade Federal do Ceará.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, orientador deste trabalho, pelas diversas oportunidades concedidas e os constantes ensinamentos em Microbiologia, por sempre estar disposto a me ajudar em todos os momentos de minha pós-graduação, a quem terei eterno respeito e admiração, pois sempre foi mais que um orientador... Um verdadeiro amigo.

À Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, co-orientadora deste trabalho, por todo o carinho e dedicação a minha formação, por ter sido a primeira pessoa a me orientar na pesquisa e, mais do que isso, por sempre ter tido total interesse em ajudar no desenvolvimento desse trabalho. Meu profundo respeito e admiração.

À professora Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, por todo o carinho a mim transmitido desde o primeiro momento que entrei no CEMM, a quem considero muito mais que uma professora ou uma amiga. Professora é difícil falar em você sem lembrar a figura de uma mãe e é isso que lhe considero (apesar de sua pouca idade).

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, que sempre foi um modelo de pesquisador e, acima de tudo, um ser humano com qualidades invejáveis... Muito obrigado pelo conhecimento transmitido, e mais ainda pela amizade e carinho que tens demonstrado por mim.

Ao professor Nilberto Robson Falcão do Nascimento e a professora Maria Fátima da Silva Teixeira pela grande contribuição na finalização desse trabalho.

À Profa. Dr.<sup>a</sup> Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira, exemplo de simpatia e otimismo, de quem sou fã de carteirinha.

Ao Prof. Dr. André Jalles Monteiro, pela análise estatística desta tese e dos artigos.

À professora Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, pela amizade, carinho, e acima de tudo pelo incentivo e ajuda incondicional na confecção deste trabalho.

Ao professor Manoel Paiva de Araújo Neto, pela amizade e incentivo ao longo de todas as etapas no decorrer dessa caminhada.

À Dra. Silviane Praciano Bandeira, por todo carinho e companheirismo, tornando nossas manhãs mais iluminadas.

Aos estudantes do Centro Especializado em Micologia Médica, em especial, Rosana Serpa, Charlline Melo, Lucas Alencar, Erica Pacheco, Paula Bittencourt, David por estarem sempre presente em minha vida e, acima de tudo, pela ajuda incondicional no desenvolvimento desse trabalho.

Ao amigo Jonathans Sales, pela ajuda incondicional na confecção e desenvolvimento desse trabalho.

À Terezinha de Jesus Santos Rodrigues, e ao Daniel Teixeira Lima, pelo apoio técnico para a realização deste e de outros trabalhos no laboratório.

A minha grande amiga Carol (secretaria do programa de pós graduação em microbiologia médica) pela amizade desenvolvida e pelo imenso carinho que tens pela minha pessoa.

A todas as outras pessoas que fizeram parte direta e indiretamente desse trabalho, o meu muito obrigado.



“Deus é o meu refúgio e fortaleza, socorro bem presente nas tribulações. Portanto não temerei mal nenhum, pois o Senhor dos exércitos está comigo; o Deus de Jacó é o meu refúgio”. (Salmos 46:1,7)

## RESUMO

Diversos são os relatos de resistência *in vitro* de cepas de *Candida* spp. a fármacos antifúngicos, em especial a derivados azólicos. A produção de biofilme é um importante fator de virulência e traz grandes repercussões clínica devido ao aumento da resistência à terapia antifúngica. Deste modo, a prospecção de novos compostos com propriedade antifúngica se faz necessária. Alguns estudos têm evidenciado a atividade das moléculas de *quorum-sensing* farnesol e tirosol e de antibióticos beta-lactâmicos e glicopeptídeos contra espécies de *Candida*. Por conseguinte, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da molécula *quorum-sensing* tirosol associados ou não a antifúngicos clássicos, e dos antimicrobianos vancomicina, meropenem, cefepime e piperacilina-tazobactam, sobre o crescimento de *Candida* spp., resistentes a derivados azólicos, nas formas planctônicas e em biofilme. Para tanto, foram utilizadas cepas de *C. albicans* (n=10) e *C. tropicalis* (n=10). A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por meio da técnica de microdiluição, preconizada pelo CLSI. Adicionalmente foi investigada a ação do tirosol e dos antibacterianos sobre o biofilme em formação e maduro de *Candida* spp. As CIM's para tirosol variaram de 2,5 a 5 mM e para os antibióticos variaram de 500 a 2000 µg/mL, para ambas as espécies. Foi observado efeito sinérgico na associação entre itraconazol e tirosol (18/20 cepas) e entre o fluconazol e tirosol (18/20 cepas), enquanto a associação anfotericina B e tirosol apresentou sinergismo em 5 cepas de *C. tropicalis* e 6 cepas de *C. albicans*. O tirosol isolado apresentou efeito sobre a formação de biofilme de ambas as espécies na concentração 50XMIC ( $P<0,0001$ ). Em relação ao efeito do tirosol sobre biofilme formado, observou-se um aumento na concentração 10XMIC e uma diminuição na concentração 50XMIC. A combinação entre tirosol e drogas antifúngicas apresentou um aumento na atividade do biofilme maduro diretamente proporcional á concentração testada, quando o tirosol foi associado a derivados azólicos e uma diminuição quando associado com anfotericina B. Todos os antibacterianos apresentaram efeito estatisticamente significativo sobre o biofilme em de *Candida* spp. em formação ( $P<0,0001$ ). Em relação ao efeito dos antibióticos vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam e cefepime sobre o biofilme formado de *Candida* spp., foram observadas reduções estatisticamente significativa na atividade celular nas concentrações MIC/10 ( $P<0,0001$ ), MIC ( $P<0,0001$ ), 10XMIC ( $P<0,0001$ ) e 50XMIC ( $P<0,0001$ ). Este estudo apresenta uma possível ação do tirosol isolado ou combinado com drogas antifúngicas e de antibacterianos, sobre *Candida* spp. na forma planctônica e em biofilme.

**Palavras-chave:** *Candida* spp.; sensibilidade; biofilme; tirosol; antibióticos

## ABSTRACT

Several reports of in vitro resistance of *Candida* spp. strains to antifungal drugs, in particular the azoles, have been reported. The biofilm production is an important virulence factor and has major clinical implications due to increased resistance to antifungal therapy. Thus, the search for new compounds with antifungal activity is necessary. Some studies have shown the activity of the quorum-sensing molecules farnesol and tyrosol, and beta-lactam and glycopeptides against *Candida* species. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of the quorum-sensing molecule tyrosol and the antimicrobials vancomycin, meropenem, cefepime and piperacillin-tazobactam, alone or combined with classic antifungals, on the growth of azoles resistant *Candida* spp. strains in the planktonic and biofilm forms. For this, strains of *C. albicans* (n = 10) and *C. tropicalis* (n = 10) were used. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution technique as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute. Additionally, we investigated the action of the antibacterials and tyrosol on biofilm formation and mature biofilm of *Candida* spp. The MIC's for tyrosol ranged from 2.5 to 5 mM and ranging from 500 to 2,000 mg/mL for antibiotics in both species. Synergistic effect was observed in the association between itraconazole and tyrosol (18/20 strains) and between fluconazole and tyrosol (18/20 strains), while amphotericin B and tyrosol combination showed synergism in 5 *C. tropicalis* strains and in 6 *C. albicans* strains. Tyrosol alone showed effect on biofilm formation of both species at 50XMIC concentration ( $P < 0.0001$ ). Regarding the effect of tyrosol on mature biofilm, it was observed an increase in production at 10XMIC and a decrease in production at 50XMIC. The combination of tyrosol and antifungal drugs showed an increase in the mature biofilm directly proportional to the concentration when tyrosol was associated with azoles and a decrease in the mature biofilm when combined with amphotericin B. All antibacterial showed statistically significant effect on biofilm formation of *Candida* spp. ( $P < 0.0001$ ). Regarding the effect of the antibiotics vancomycin, meropenem, piperacillin/tazobactam, and cefepime on the mature biofilm of *Candida* spp., significant reductions in cellular activity at the concentrations MIC/10 ( $P < 0.0001$ ), MIC ( $P < 0.0001$ ), 10XMIC ( $P < 0.0001$ ) and 50XMIC ( $P < 0.0001$ ) were observed. This study presents a possible action of antibacterial and tyrosol, alone or in combination with antifungal drugs, on *Candida* spp. in planktonic and biofilm forms.

**Keywords:** *Candida* spp.; susceptibility; biofilm; tyrosol; antibacterials.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Blastocónídios de leveduras do gênero <i>Candida</i> . .....	18
Figura 2 – Aspecto micromorfológico de leveduras do gênero <i>Candida</i> em ágar Corn meal com Tween 80.....	18
Figura 3 – Estruturas morfológicas das leveduras.....	19
Figura 4 – Identificação de <i>Candida</i> spp.....	21
Figura 5 - Aspecto macromorfológico de <i>Candida</i> spp., exibindo colônias de coloração branca, superfície lisa e textura glabrosa úmida.....	23
Figura 6 – Principais mecanismos de resistência aos azólicos em <i>Candida</i> spp.....	26
Figura 7 – Estágios de desenvolvimento de biofilme.....	30
Figura 8 – Efeito da anfotericina B, itraconazol e fluconazol e tirosol sobre o biofilme em formação de <i>Candida</i> spp. ....	52
Figura 9 – Efeito do da anfotericina B, itraconazol e fluconazol e tirosol sobre o biofilme formado de <i>Candida</i> spp.....	53
Figura 10 – Efeito da combinação de tirosol e drogas antifúngicas sobre o biofilme em formação de <i>Candida</i> spp. ....	55
Figura 11 – Efeito da combinação de tirosol e drogas antifúngicas sobre o biofilme formado de <i>Candida</i> spp. ....	57
Figura 12: Efeito de diferentes concentrações de cefepime, meropenem, piperacilina-tazobactam e vancomicina sobre biofilme em formação e maduros de <i>Candida</i> spp., Analisados por meio de análise de redução do XTT.....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação das cepas de <i>Candida</i> spp. utilizadas na pesquisa. ....	41
Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) de drogas antifúngicas e tirosol frente a cepas de <i>Candida</i> spp. ....	49
Tabela 3 – Concentração inibitória mínima para vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam, cefepime e anfotericina B contra <i>Candida</i> spp.. ....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AMB	anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
TIR	Tirosol
FIC	Concentração Inibitória Fracionada
FICI	Índice de Concentração Inibitória Fracionária
FLC	Fluconazol
ITC	Itraconazol
KOH	Hidróxido de Potássio
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
RPMI	Meio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
VRZ	Voriconazol

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
<b>2.1 Gênero <i>Candida</i></b> .....	16
<b>2.1.1 Histórico e taxonomia</b> .....	16
<b>2.2 Aspectos morfológicos</b> .....	17
<b>2.3 Identificação de <i>Candida</i> spp.</b> .....	19
<b>2.4 Potencial patogênico de <i>Candida</i> spp.</b> .....	20
<b>2.5 Aspectos epidemiológicos</b> .....	22
<b>2.6 Antifúngicos e o fenômeno de resistência</b> .....	24
<b>2.7 Monitoramento de resistência antifúngica</b> .....	28
<b>2.8 Biofilme de <i>Candida</i> spp.</b> .....	29
<b>2.9 Quorum-sensing</b> .....	32
<b>2.10 Antibióticos e resistência em biofilme de <i>Candida</i> spp.</b> .....	33
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	37
<b>4. PERGUNTAS DE PARTIDA</b> .....	38
<b>5. HIPÓTESES CIENTÍFICAS</b> .....	38
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	39
<b>6.1 Objetivo Geral</b> .....	39
<b>6.2 Objetivos Específicos</b> .....	39
<b>7. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	40
<b>7.1 Recuperação das cepas</b> .....	40
<b>7.2 Antifúngicos e antibióticos</b> .....	41
<b>7.3 Preparo do inóculo</b> .....	42
<b>7.4 Teste de sensibilidade <i>in vitro</i></b> .....	42
<b>7.5 Combinação de drogas antifúngicas e tirosol</b> .....	43
<b>7.6 Formação do biofilme</b> .....	44
<b>7.7 Efeito do tirosol isolado e em combinação com drogas antifúngicas sobre a formação de biofilme de <i>Candida</i> spp.</b> .....	44
<b>7.8 Efeito do tirosol isolado e em combinação com drogas antifúngicas sobre o biofilme maduro de <i>Candida</i> spp.</b> .....	45
<b>7.9 Efeito de drogas antibacterianas sobre a formação de biofilme de <i>Candida</i> spp.</b> ....	46
<b>7.10 Efeito de drogas antibacterianas sobre a formação de biofilme de <i>Candida</i> spp.</b> ..	47

<b>8. RESULTADOS</b> .....	48
<b>8.1</b> Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> .....	48
<b>8.2</b> Combinação de drogas antifúngicas e tirosol... ..	51
<b>8.3</b> Efeito do tirosol e drogas antifúngicas isoladas sobre o biofilme em formação e formado de <i>Candida</i> spp. ....	52
<b>8.4</b> Efeito do tirosol sobre o biofilme maduro de <i>Candida</i> spp.....	53
<b>8.5</b> Efeito da combinação de tirosol e drogas antifúngicas sobre a formação de biofilme de <i>Candida</i> spp. ....	54
<b>8.6</b> Efeito da combinação de tirosol e drogas antifúngicas sobre o biofilme formado de <i>Candida</i> spp. ....	56
<b>8.7</b> Efeito dos antibióticos: vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam e cefepime sobre o biofilme em formação de <i>Candida</i> spp. ....	58
<b>8.8</b> Efeito dos antibióticos: vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam e cefepime sobre o biofilme formado de <i>Candida</i> spp. ....	59
<b>9. DISCUSSÃO</b> .....	60
<b>10. CONCLUSÃO</b> .....	65
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	66
<b>APÊNDICE</b> .....	79



## 1. INTRODUÇÃO

Leveduras são fungos oportunistas responsáveis pela maior parte das infecções fúngicas em seres humanos. A incidência de infecções causadas por esses micro-organismos em humanos aumentou durante as últimas décadas, especialmente de forma oportunista em indivíduos com o sistema imunológico comprometido, como pacientes transplantados, oncológicos, com doenças degenerativas ou apresentando aids. Dentre estas leveduras, as espécies do gênero *Candida* são os patógenos humanos e animais mais importantes, sendo *C. albicans* particularmente a mais diagnosticada, apresentando mortalidade em torno de 40%.

Em geral, a infecção causada por *Candida* spp. está relacionada a desequilíbrio ou alterações na relação micro-organismo-hospedeiro. Fatores de virulência inerentes ao micro-organismo facilitam o estabelecimento da infecção, e dentre estes citam-se: capacidade de crescimento a 37 °C, produção de enzimas hidrolíticas (lipases, proteinases, fosfolipases), pleomorfismo celular, aderência mediada por proteínas e formação de biofilmes.

Biofilmes são comunidades microbianas que crescem aderidas a alguma superfície sólida, envolvidos por uma matriz exopolimérica secretada pelos micro-organismos em associação. Grande parte das infecções no âmbito nosocomial está relacionada a biofilmes, sendo relatada a formação de biofilme em vários dispositivos médicos implantados. Além disso, os biofilmes tornam-se fontes de disseminação constante de micro-organismos no hospedeiro. Essas infecções são particularmente difíceis de tratar, demandando terapia antifúngica a longo-prazo e remoção do dispositivo implantado.

Quando em biofilme, os fungos produzem moléculas sinalizadoras envolvidas na comunicação celular. Este sistema de comunicação baseado na emissão de estímulos e respostas condicionados à densidade populacional é conhecido como *quorum-sensing*. Esse processo é de fundamental importância, uma vez que o controle populacional e nutricional no biofilme ocorre através dele. Atualmente, moléculas como farnesol e tirosol vêm sendo descritas como participantes desse processo. Em *Candida albicans* está sob complexa regulação positiva e negativa de condições ambientais, já que o tirosol é liberado continuamente durante o crescimento celular, acelerando a formação de tubos germinativos em culturas diluídas.

Tem-se verificado aumento na resistência antifúngica a derivados azólicos em cepas de *Candida*, sendo que, em comparação a sua forma planctônica, estas cepas apresentam maior redução de sua sensibilidade a antifúngicos quando em biofilmes. O conhecimento dessa dinâmica na associação torna-se importante, visando o tratamento de

infecções que apresentem resistência a derivados azólicos. Há relatos do efeito de drogas antibacterianas isoladamente ou em sinergismo com antifúngicos, contra cepas de várias espécies fúngicas patogênicas, entre elas *Candida* spp.

Entre os antibióticos estudados frente a cepas de *Candida* spp. estão representantes dos grupos dos beta-lactâmicos e dos glicopeptídeos. Já está descrito efeito sinérgico entre o antifúngico caspofungina e o antimicrobiano meropenem, tanto *in vitro* como *in vivo* no tratamento de candidíase disseminada em murinos.

Por fim, considerando-se os relatos de resistência *in vitro* em cepas de *Candida* spp. a fármacos antifúngicos, em especial a derivados azólicos, assim como a evidência da atividade das moléculas de *quorum-sensing* farnesol e tirosol e de antibióticos beta-lactâmicos e glicopeptídeos contra espécies de *Candida*, neste estudo buscou-se avaliar o efeito da molécula de *quorum-sensing* tirosol e dos antimicrobianos vancomicina, meropenem, cefepime e piperacilina-tazobactam, associados ou não a antifúngicos clássicos, sobre o crescimento de *Candida* spp. resistentes a derivados azólicos, nas formas planctônicas e biofilme.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Gênero *Candida*

#### 2.1.1 Histórico e taxonomia

O gênero *Candida* é composto por leveduras que podem ser encontradas na microbiota de homens e animais (SIDRIM; ROCHA, 2004). De maneira oportunista, estas leveduras podem invadir os tecidos do hospedeiro e estabelecer infecção. Embora desconhecendo a etiologia, provavelmente foi Hipócrates (460 a 337 a.C.) quem pela primeira vez descreveu a candidíase oral, ao observar placas esbranquiçadas na cavidade oral de uma criança recém-nascida. Anos mais tarde, Galeno (200 a 130 a.C.) também relatou achados semelhantes aos descritos por Hipócrates. Apesar dos sinais terem sido observados tempranamente na história, a associação das lesões características de candidíase somente foram relacionadas a um micro-organismo patógeno quando Langenbeck, em 1839, descreveu de forma pioneira o gênero *Candida*, observando o micro-organismo em lesões orais de pacientes com tifo e, erroneamente, o propôs como agente etiológico dessa doença (ODDS, 1988).

Em 1842, David Gruby definiu a patogenia da candidíase oral e classificou o seu agente etiológico como pertencente ao gênero *Sporotrichum*. Porém, somente em 1846, Berg estabeleceu definitivamente a relação do micro-organismo com a ocorrência de candidíase oral. Posteriormente, em 1853, Charles Robin denominou esse micro-organismo como *Oidium albicans* e, em 1861, Zenker descreveu o primeiro caso de infecção cerebral por disseminação hematogênica associado ao gênero *Candida*. Em 1862, Mayer descreveu seis casos de candidíase vaginal e foi capaz de reproduzir experimentalmente a infecção em coelhos (ODDS, 1988). Em 1875, Haussmann relatou vínculo entre candidíase vaginal da mãe e a ocorrência de candidose em recém-nascido.

Zopf, em 1890, redenominau o micro-organismo de *Monilia albicans*. Anos mais tarde, em 1923, Berkhout classificou esse micro-organismo como pertencente ao gênero *Candida* e à espécie *Candida albicans* (SIDRIM; ROCHA, 2004). Em 1940, H. Joachim e S. Polayes notificaram o primeiro caso de endocardite causada por *C. albicans*. Em 1954, durante o VIII Congresso Europeu de Botânica, o gênero foi definitivamente descrito e aceito como *Candida*, com base nos estudos de Robin (1853), Zopf (1890) e Berkhout (1923) (ODDS, 1988).

No final da década de 1970, várias espécies foram descritas como agentes patogênicos humanos, encontrados no sangue, urina e no trato respiratório, dentre os quais podemos destacar a *C. lusitaniae* e *C. glabrata*. Até a década de 1980, a candidíase disseminada era considerada uma doença rara, ocorrendo predominantemente em pacientes submetidos a cirurgias, com queimaduras graves ou vítimas de trauma, e em pacientes gravemente neutropênicos, com leucemia ou linfoma.

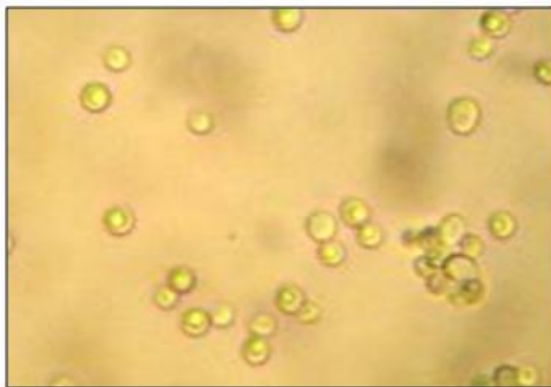
Em 1981, foi descrito o primeiro caso de infecção invasiva por *Candida*. Todavia, o marco da história das infecções por *Candida* ocorreu a partir da década de 1980, com o surgimento dos pacientes com aids e, conseqüentemente, a introdução do uso disseminado de antifúngicos (FERNANDES et al., 2007; YU et al., 2009). Em 1995, a espécie *Candida dubliniensis* foi identificada estando normalmente associada à colonização oral e a infecções em pacientes com aids. Em 1998, Birman e colaboradores, reconheceram a postulação de transmissão da forma leveduriforme via passagem vaginal do feto, descrita por Verón em 1835.

Atualmente as leveduras do gênero *Candida* são classificadas como pertencentes ao reino Fungi, divisão Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales, família Saccharomycetaceae. O gênero é constituído por mais de 300 espécies, sendo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* as mais frequentemente encontradas em amostras clínicas (NCBI, 2013).

## 2.2 Aspectos morfológicos

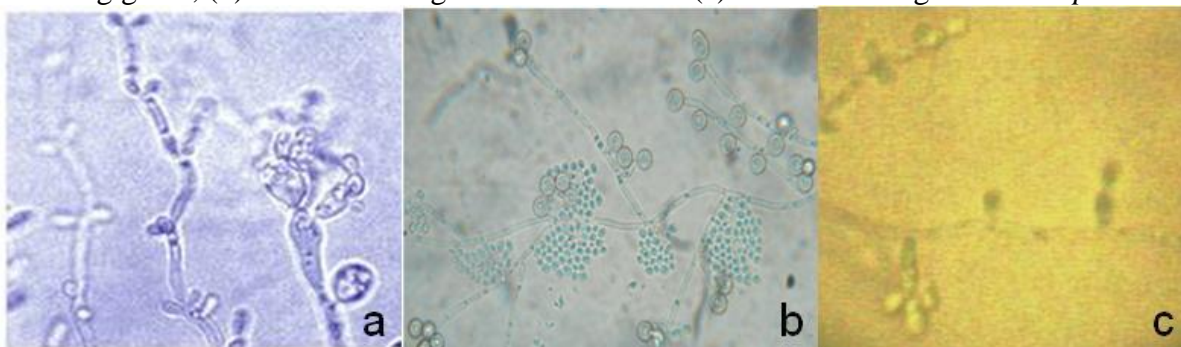
Espécies do gênero *Candida* apresentam células arredondadas ou ovais que medem em média aproximadamente 2,0 a 4,0  $\mu\text{m}$  (GUARRO, 1998), conforme Figura 1. Em condições de baixa tensão de oxigênio e suplementação lipídica, cada espécie pode exibir um padrão micromorfológico característico, o qual costuma ser empregado para auxiliar na identificação microbiana (FIGURA 2).

Figura 1 – Blastoconídios de leveduras do gênero *Candida*.



Fonte: Sidrim (2004).

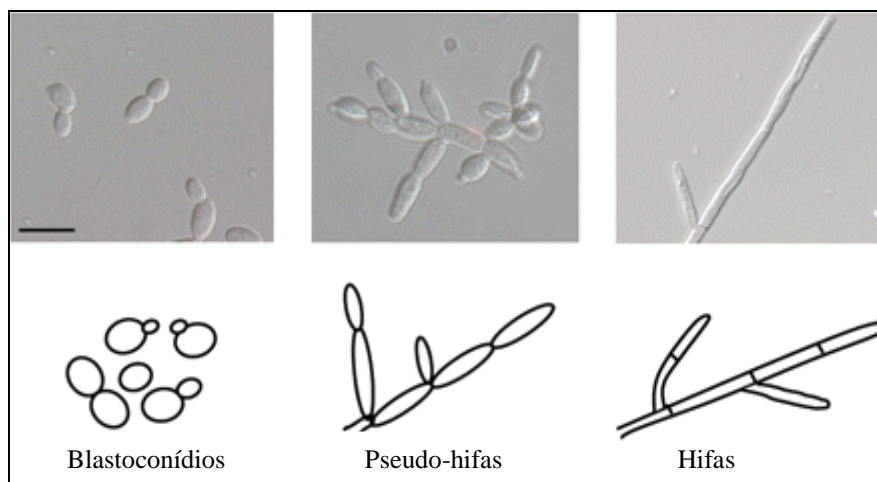
Figura 2 – Aspecto micromorfológico de leveduras do gênero *Candida* spp. em ágar *corn meal* com Tween 80; (a) micromorfologia de *C. parapsilosis*, evidenciando a presença de células gigante; (b) micromorfologia de *C. albicans* e (c) micromorfologia de *C. tropicalis*.



Fonte: CEMM, 2012.

A maioria das espécies de *Candida* podem crescer em três principais morfologias celulares: blastoconídios, pseudo-hifas e hifas (FIGURA 3). Os blastoconídios são células únicas e ovais que podem exibir tanto brotamento axial como bipolar (THOMPSON et al., 2011). Pseudo-hifas e hifas são comumente chamadas de "filamentos", pois as células crescem tipicamente de forma polarizada, são alongadas e estão ligadas ponta a ponta. O critério para a diferenciação entre hifa verdadeira e pseudo-hifa está na observação da formação do tubo germinativo. Na formação da hifa verdadeira não há a constrição entre a célula-mãe e o filamento, já pseudo-hifas possuem a constrição entre a célula-mãe e o comprimento do filamento (SIDRIM; ROCHA, 2004; BARBEDO; SGARBI, 2010).

Figura 3 – Estruturas morfológicas das leveduras.



Quanto à reprodução, o gênero *Candida* é formado por leveduras anamórficas, cujos mecanismos de divisão celular envolvem brotamento simples, brotamento fissão e divisão binária. Todavia, a espécie *C. albicans* produz blastoconídios que podem se associar em cadeias, denominadas pseudo-hifas, as quais são necessárias para invasão tecidual (MOLERO et al., 1998; ALBY; BENNETT, 2010). Alguns representantes do gênero são pleomórficos, ou seja, possuem a capacidade de se apresentar de diferentes formas morfológicas - pseudo-hifas, hifas verdadeiras, blastoconídios e clamidoconídios - de acordo com as condições às quais estão submetidos (OLIVEIRA, 2006).

### 2.3 Identificação de *Candida* spp.

Diferentes técnicas para identificação de leveduras do gênero *Candida* são utilizadas atualmente, desde diagnóstico baseado em morfologia, limitações nutricionais e características bioquímicas à utilização de técnicas mais modernas, como *kits* comerciais, testes imunológicos e técnicas moleculares (FAROOGI et al., 2012; COLOMBO et al., 2013; NEPPELENBROEK et al., 2013; NUCCI et al., 2013; WESTBLADE et al., 2013).

O diagnóstico laboratorial desse gênero consiste, inicialmente, na confecção de lâminas com material clínico, clarificado com hidróxido de potássio, permitindo uma melhor visualização de estruturas fúngicas. Em seguida, a cultura também deve ser realizada em ágar

Sabouraud, ágar Sabouraud com cloranfenicol e ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida (SIDRIM; ROCHA, 2004; FAROOGI et al., 2012).

Em meios de cultivo, os organismos do gênero apresentam crescimento em torno de quatro dias, entre as temperaturas de 25 a 37 °C. As culturas de *Candida* apresentam características macroscópicas semelhantes para todas as espécies, tais como colônias brancas ou cor creme, glabras, úmidas e sem pigmentos difusíveis (BUSCHELMAN et al., 1999; SIDRIM; ROCHA, 2004).

As características micromorfológicas são observadas após realização de microcultivo em ágar fubá ou ágar arroz acrescido de Tween 80. Essa técnica permite uma melhor visualização das estruturas fúngicas típicas de cada espécie, sendo estas, na maioria das vezes, suficientes para identificar de forma presuntiva o micro-organismo (SIDRIM; ROCHA, 2004; KOEHILER et al., 1999; PRADO, 2007; FAROOGI et al., 2012).

Vale destacar que a identificação pode não ser determinada através apenas de características macro e micromorfológicas, sendo necessária a realização de testes bioquímicos, como a assimilação e fermentação de carboidratos, a assimilação de nitrogênio e a prova da enzima urease (CASTELO-BRANCO, 2011). Adicionalmente, faz-se o uso de meio cromogênico específico para o gênero, o qual diferencia as espécies com base na coloração apresentada por elas quando crescidas nesse meio (HOSPENTHAL et al., 2006; ERASO et al., 2006) (FIGURA 4).

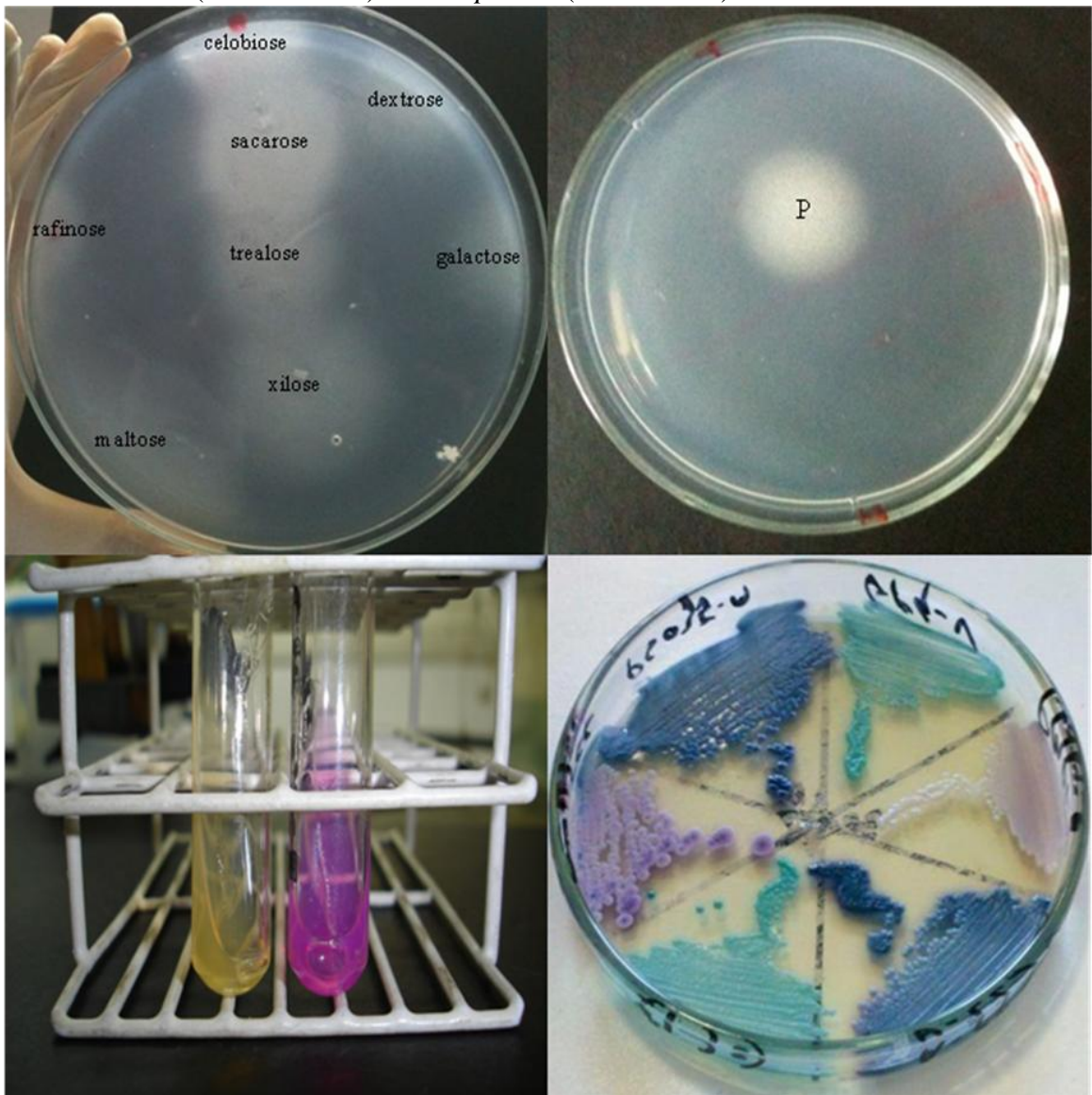
Atualmente são comercializados painéis manuais (API 20C AUX) e automatizados (Vitek 2) para identificação de leveduras, os quais se baseiam na capacidade de assimilar substratos bioquímicos e enzimáticos, os quais são de fáceis realização e interpretação, além de oferecer o resultado em menor tempo. Vários métodos de tipagem molecular vêm sendo utilizados devido à sensibilidade e especificidade, pois permitem a identificação intraespecífica dos isolados e a detecção de pequenas diferenças no conteúdo de ácidos nucleicos entre as espécies ou entre cepas de uma mesma espécie. Estes métodos consistem na análise do polimorfismo dos fragmentos gerados por enzimas de restrição RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), na cariotipagem eletroforética PFGE (*Pulsed-Field Gel Eletrophoresis*) e no RAPD-PCR (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*).

#### **2.4 Potencial patogênico de *Candida* spp.**

Em condições de equilíbrio, as leveduras do gênero *Candida* não causam danos ao hospedeiro. Entretanto, em determinadas situações, como na presença de distúrbios nas

proteções física, química e imunológica, estes micro-organismos podem se tornar patogênicos e causar enfermidades genericamente denominadas de candidíases. Aproximadamente 10% das espécies são consideradas patogênicas, sendo a maioria isolada como microbiota normal da pele, do trato gastrintestinal, do trato geniturinário, do trato respiratório superior, bem como do ambiente, particularmente em superfícies inanimadas (EGGIMANN et al., 2003; DESTIN et al., 2010).

Figura 4 – a) Prova de assimilação de carboidrato de *Candida* spp. Observa-se crescimento fúngico avaliada assimilou os açúcares. b) Prova de assimilação de nitrogênio de *Candida* spp. com crescimento fúngico na peptona (P), que é a fonte de nitrogênio controle do teste. c) Prova de produção de urease em meio ágar ureia de Christensen. d) Placa contendo ágar cromogênico, permitindo a identificação presuntiva de *C. albicans* (colônia verde) e *C. tropicalis* (colônia azul).



Fonte: CEMM, 2014.



As infecções causadas por espécies desse gênero podem ser do tipo aguda ou crônica, superficial ou profunda, localizada ou disseminada (SILVA, 2005). Em determinadas situações, podem causar inúmeras enfermidades que vão desde dermatomicoses a quadros de fungemia. Tal fato se deve, em parte, a uma deficiência no número e na função dos neutrófilos, a maior fragilidade da mucosa cutânea, bem como ao uso indiscriminado de antibióticos, de quimioterápicos citotóxicos, de contraceptivos e de agentes imunossupressores e à ocorrência de infecções e de disfunções endócrinas, os quais podem favorecer a colonização e a infecção por este gênero fúngico (DHAMMIKA et al., 2007; ANTONY et al., 2009; DESTIN et al., 2010).

Embora, na maioria dos casos, a enfermidade causada por *Candida* spp. esteja relacionada ao desequilíbrio ou a alterações fisiológicas do hospedeiro, alguns fatores são inerentes ao patógeno, tais como: a capacidade de crescer a 37 °C, a produção de metabólitos capazes de causar manifestações alérgicas do tipo tardio e imediato, a produção de enzimas (lipases, proteinases, fosfolipases etc.), o pleomorfismo e a aderência mediada por proteínas, que são necessárias para formação de comunidades microbianas, denominadas de biofilmes (LINDE et al., 2010; BLANCO et al., 2010; LIU et al., 2010).

Biofilme pode ser definido como uma comunidade estruturada de células de micro-organismos, embebida em uma matriz extracelular polimérica e aderida a uma superfície inerte ou viva, formando uma estrutura tridimensional (CHANDRA, 2001). Espécies de *Candida* são frequentemente encontradas na microbiota normal dos seres humanos, o que facilita a colonização em superfícies de acolhimento, como por exemplo, *stents*, próteses, implantes, tubos endotraqueais, marca-passos e vários tipos de cateteres. Isto é de particular importância, visto que atualmente uma proporção significativa de todas as infecções microbianas humanas envolve a formação de biofilme, principalmente por *C. albicans*.

A formação de biofilme traz grandes repercussões clínicas devido ao aumento da resistência à terapia antifúngica e a capacidade das células em biofilme de evadir as defesas imunológicas do hospedeiro.

## **2.5 Aspectos epidemiológicos**

*Candida* spp. são leveduras oportunistas responsáveis pela maior parte das infecções fúngicas nos seres humanos. Durante as últimas décadas, a incidência de infecções causadas por esses micro-organismos em humanos sofreu um grande aumento, especialmente

em indivíduos com o sistema imunológico comprometido, como pacientes acometidos pela aids ou transplantados (CORNISTEIN et al., 2013; SARDEI et al., 2013). Os avanços da medicina permitiram que indivíduos com doenças terminais e imunocomprometedoras sobrevivessem em decorrência dos tratamentos aplicados. No entanto, muitos destes pacientes vêm a óbito, não em consequência da doença de que realmente padecem, mas devido às infecções fúngicas secundárias, principalmente aquelas ocasionada pelas leveduras do gênero *Candida*, (FIGURA 5) (HA et al., 2011; CHADER, et al., 2013; WILE et al., 2013).

As espécies desse gênero têm se apresentado como importantes patógenos em humanos e animais. Nas últimas duas décadas, houve um aumento significativo na incidência de infecções fúngicas oportunistas, causadas em especial por *C. albicans*, as quais apresentam mortalidade em torno de 40% (PFALLER, 2012; BONFIETTI et al., 2012). Este aumento tem sido atribuído, em parte, ao crescente número de pacientes portadores de neoplasias ou doenças degenerativas, indivíduos transplantados e portadores do vírus HIV (CONDE-ROSA et al., 2010).

Figura 5 – Aspecto macromorfológico de *Candida* spp., exibindo colônias de coloração branca, superfície lisa e textura glabrosa úmida.



Fonte: CEMM, 2012.

Neste cenário, a candidíase tem sido reconhecida como a mais importante infecção fúngica oportunista, sendo *C. albicans* o quarto micro-organismo mais isolado em hemocultura nos Estados Unidos da América (PFALLER; DIEKEMA, 2007; PFALLER, 2012). No Brasil, de acordo com Guimarães et al. (2012), esta levedura também se apresenta

como o quarto micro-organismo mais isolado em hemoculturas, ficando atrás apenas de espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella* spp.

Nos últimos anos, outras espécies como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* têm sido descritas como importantes agentes de fungemia em seres humanos (MEDRANO et al., 2006; AVRELLA; GOULART, 2008; NUCCI et al., 2010; KOTHAVADE et al., 2010; COLOMBO et al., 2012; KUMARI et al., 2013).

## 2.6 Antifúngicos e o fenômeno de resistência

Acredita-se que parte da dificuldade existente no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas e/ou oportunistas esteja relacionada ao limitado número de drogas de uso terapêutico (ESPINEL-INGROFF et al., 2007; GERONIKAKI et al., 2013; FLEVARI et al., 2013). Atualmente, as drogas antifúngicas disponíveis para o tratamento de micoses podem ser divididas em quatro diferentes classes, de acordo com os seus mecanismos de ação, como: alteração na permeabilidade da membrana plasmática (poliênicos); inibição da síntese de DNA ou RNA (fluocitosina e griseofulvina); inibição da síntese do ergosterol (derivados azólicos) e; inibição da síntese de glucanos da parede celular fúngica (equinocandinas) (REX et al., 2000; CHAPMAN et al., 2008; GAFTER-GVILI et al., 2008; FLEVARI et al., 2013). Apesar do surgimento de novos derivados azólicos, como o ravuconazol, posaconazol e albaconazol, especialistas acreditam que o número de drogas antifúngicas ainda é bastante reduzido (ULLMANN, 2003; MCCORMACK; PERRY 2005; TORRES et al., 2005; SCOTT; SIMPSON, 2007; TAMURA et al., 2009).

Os derivados azólicos possuem boa absorção por via oral e seus efeitos colaterais são reduzidos quando comparados aos antifúngicos poliênicos. Desta forma, esta é a classe de escolha no tratamento de infecções superficiais e profilaxia de paciente imunocomprometido. Os fármacos deste grupo agem inibindo a produção de ergosterol fúngico pela inibição da enzima lanosterol 14- $\alpha$  demetilase (Erg11p), alterando a funções da membrana plasmática e acumulando compostos no citosol que são tóxicos para a célula. Estes fármacos possuem uma ação fungistática. (ATIQUÉ, 2006; ZHANG et al., 2013; TAFF et al., 2013).

Devido à característica fungistática e o vasto uso destes fármacos na clínica humana e animal, além da agricultura, diversas vezes de forma indiscriminada, têm-se observado relatos de resistência em cepas de *Candida* spp. frente a fármacos antifúngicos, em especial a derivados azólicos, sendo as espécies *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* as mais citadas quanto à resistência ao fluconazol (POSTERARO et al., 2006; KALKANCI et al.,

2007; CHONG et al., 2007; MOLEPO; MUSENGE, 2012; YOUNGSAYE et al., 2013). Nos últimos anos, um aumento no número de espécies de *Candida não-albicans* resistentes a drogas antifúngicas clássicas, em especial aos derivados azólicos, tem sido relatado. Esta resistência é mais frequentemente observada em pacientes HIV positivos, nos quais foi inicialmente relatada a resistência foi relacionado ao cetoconazol (NUCCI et al., 2010; GRANDESSO et al., 2012; BORGHI et al., 2014).

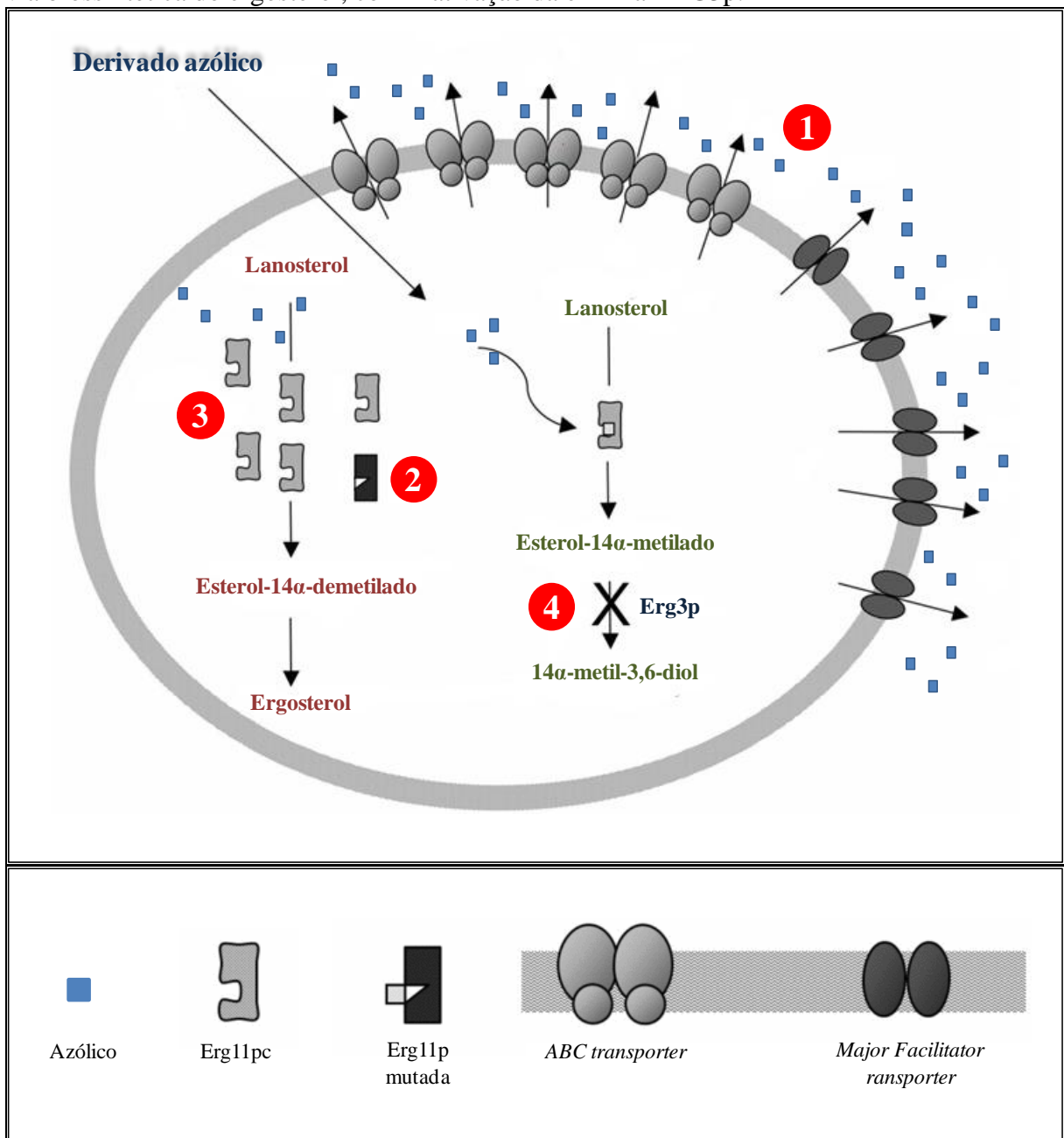
A resistência aos antifúngicos pode ser dividida em resistência clínica e resistência *in vitro*. A resistência clínica está relacionada a uma deficiência na resposta ao tratamento, a qual pode estar associada a uma baixa concentração da droga no sangue e/ou nos tecidos do paciente. Aliado a isso, temos também um sistema imunológico do hospedeiro deficiente, podendo haver também uma má penetração da droga e a presença de focos permanentes de infecção, como cateteres e abscessos (MOLEPO; MUSENGE, 2012; YOUNGSAYE et al., 2013). Em pacientes HIV positivos, o antifúngico isolado é incapaz de eliminar a infecção devido ao quadro de imunossupressão acentuado (REX et al., 1995; SANGLARD; ODDS, 2002; RAMAGE; LOPEZ-RIBOT, 2006; FILIPPIN; SOUZA, 2006).

A resistência *in vitro*, por sua vez, pode ser dividida em primária e secundária. A resistência primária, também denominada de intrínseca ou inata, é aquela em que o micro-organismo naturalmente apresenta resistência a antifúngicos, como observado para *C. krusei* e *C. glabrata* frente ao fluconazol (MOLEPO; MUSENGE, 2012; YOUNGSAYE et al., 2013). Já a resistência secundária ou adquirida ocorre devido à seleção de cepas resistentes, estando estritamente relacionada ao uso indiscriminado de drogas antifúngicas, tanto na terapia em humanos como na agricultura (PFALLER; DIEKEMA, 2007; ROMEO; CRISEO, 2009; COLOMBO et al., 2009; TAFF et al., 2013). Entretanto, algumas espécies de *Candida* podem manifestar resistência através da exposição contínua a antifúngicos, ocasionando alterações na expressão de genes que codificam as bombas de efluxo e alterações na biossíntese do ergosterol (ATIQUE, 2006; ZHANG et al., 2013; TAFF et al., 2013).

Diversos mecanismos que contribuem para o fenômeno de resistência aos azólicos vêm sendo descritos, dentre eles, destacam-se a superexpressão ou mutação do gene *ERG11*, o qual codifica a enzima molécula-alvo dos azólicos, a lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase; a superexpressão dos genes *CDR1*, *CDR2* e *MDR1*, os quais codificam bombas de efluxo; e alterações no gene *ERG3*, indispensável para biossíntese do ergosterol (FIGURA 6). Vale destacar que outros mecanismos ainda não totalmente elucidados podem ocorrer simultaneamente, contribuindo para o fenômeno da resistência (USER et al., 2007; FERRARI et al., 2009; SANGLARD et al., 2009; COSTA et al., 2010; ZHU et al., 2010; EDDOUZI et

al., 2013; HILL et al., 2013). Diferente do fenômeno de resistência apresentado pelas bactérias aos agentes antibacterianos, nos fungos não existem evidências de que sejam capazes de inativar ou modificar os agentes antifúngicos como mecanismo de resistência (KALKANCI et al., 2007; ESPINEL-INGROFF, 2009).

Figura 6 – Principais mecanismos de resistência aos azólicos em *Candida* spp. (1) Diminuição da concentração da droga, devido à super-expressão de proteínas tipo ABC (*ATP-binding cassette*) *transporter* e *Major Facilitator transporter*. (2) Afinidade reduzida da enzima ERG11p ao azólico; (3) Aumento do número de cópias da enzima ERG11p; (4) Alteração da via biossintética do ergosterol, com inativação da enzima ERG3p.



Fonte: Pinjon et al. (2005).

O mecanismo de resistência molecular aos antifúngicos azólicos em cepas de *Candida* spp. geralmente está associado a mais de um fator atuando de forma simultânea, resultando na expressão da característica de resistência. A super-expressão dos genes *MDR1* e *CDR1*, codificadores da bomba de efluxo, foram detectadas em 85% dos isolados com esta característica fenotípica (PEREA et al., 2001; FERRARI et al., 2009).

De acordo com Perea et al. (2001), cepas resistentes a fluconazol não obrigatoriamente se apresentam resistentes às demais drogas antifúngicas. No entanto, é notória a diminuição da sensibilidade de cepas resistentes a fluconazol a outros derivados azólicos, como itraconazol, voriconazol e posaconazol (ULLMANN, 2003; MCCORMACK; PERRY 2005; TORRES et al., 2005; SCOTT; SIMPSON, 2007; TAMURA et al., 2009).

Outro fator que pode interferir na sensibilidade antifúngica é a estocagem do micro-organismo a baixas temperaturas, o que pode levar a uma diminuição na eficiência da produção de proteínas, à baixa fluidez da membrana celular, à estabilização da dupla hélice ou da estrutura secundária da molécula de DNA ou de RNA, ao lento arranjo estrutural das proteínas e ao decréscimo da atividade enzimática (MATTA et al., 2010). É pouco provável, no entanto, que tal forma de estocagem resulte na resistência de espécies fúngicas a azólicos, visto que cepas de *Candida* ATCC, existentes há anos, já foram estocadas das mais diversas formas, sem, no entanto, apresentarem qualquer alteração em suas características fenotípicas e morfológicas, incluindo a sensibilidade antifúngica (BRITO et al., 2007; ESPINEL-INGROFF, 2009; ZHU et al., 2010; EDDOUZI et al., 2013; HILL et al., 2013).

A resistência aos azólicos começou a ser observada com o aparecimento de cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol entre pacientes HIV positivos que apresentavam candidose oral e esofágica previamente à introdução de terapia anti-retroviral (JOHNSON, 2008; KANAFANI; PERFECT, 2008; HILL et al., 2013). No geral, a taxa de resistência aos azólicos permanece baixa entre a maioria das espécies de *Candida*, variando de 1-2% em *C. albicans*, de 0,4-4,6% em *C. parapsilosis* e de 1,4-6,6% em *C. tropicalis*. No entanto, *C. glabrata*, a segunda espécie mais prevalente em infecções fúngicas sistêmicas nos Estados Unidos, apresenta crescente resistência ao fluconazol, cuja taxa de resistência aumentou de 7 para 12% entre os anos de 2001 e de 2004 (KANAFANI; PERFECT, 2008, HILL et al., 2013).

## 2.7 Monitoramento de resistência antifúngica

Nos últimos anos, infecções causadas por fungos e, em particular, por leveduras do gênero *Candida*, têm aumentado significativamente, principalmente em pacientes infectado com o vírus da imunodeficiência humana ou indivíduo com câncer (JOHNSON, 2008) ou até mesmo em pacientes imunocompetentes (CAFARCHIA et al., 2008). Acompanhado a esse aumento, também tem sido descrito na literatura um aumento no número de cepas resistentes à terapia convencional, em especial aos derivados azólicos.

Baseado nessa problemática foi que, em 1985, o comitê da área de micologia do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) elaborou e publicou seu primeiro relatório para sensibilidade a agentes antifúngicos. Contudo, constatou-se que 20% dos laboratórios que faziam teste de sensibilidade através da técnica de microdiluição obtinham resultados discrepantes.

Com isso em 1997, foi publicada a Norma M27-A, onde ficaram especificados os pontos de corte para os antifúngicos disponíveis e, em 2002, a Norma M27-A2 padronizou as faixas de referência de CIM 24 e 48 horas para drogas previamente estabelecidas. Mais recentemente, em 2008, foi publicado o documento M27-A3, que apresenta como principal novidade em relação ao documento M27-A2 a percentagem na leitura em relação aos derivados azólicos. A leitura para concentração inibitória mínima para os derivados azólicos, que antes era de 80% de inibição, no M27-A3 essa percentagem é de 50% em relação ao crescimento fúngico sem contato algum com as drogas testadas (CLSI, 2008).

Em resumo, o teste de microdiluição em caldo consiste em expor o fungo em contato com diferentes concentrações da droga em teste. Para tanto, são utilizadas placas de acrílicos estéreis, com 96 poços em formato de U, com capacidade de 200 µl por poço, onde as drogas em teste são diluídas 10 vezes. O inóculo fúngico é preparado em salina e posteriormente diluído em meio RPMI 1640. A leitura final determina a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento do micro-organismo, denominada de concentração inibitória mínima (CIM) (CLSI, 2008).

O teste de sensibilidade tem por finalidade prever uma resposta *in vivo* próxima daquela apresentada *in vitro*. No entanto, vale lembrar que, nas infecções fúngicas, muitos fatores, além do perfil de sensibilidade *in vitro*, influenciam a resposta clínica, tais como sítio de infecção, o *status* imunológico do hospedeiro, a farmacocinética da droga e a adesão do paciente à terapia (PAPPAS et al. 2003; HOSPENTHAL et al., 2004). Entretanto, dados da literatura demonstram que micro-organismo que se apresentam sensíveis através da técnica de

microdiluição respondem à terapêutica apropriada em 90% dos casos e que infecções por micro-organismo resistentes, a resposta terapêutica é de apenas 60% (REX; PFALLER, 2002; COSTA et al., 2009).

## **2.8 Biofilme de *Candida* spp.**

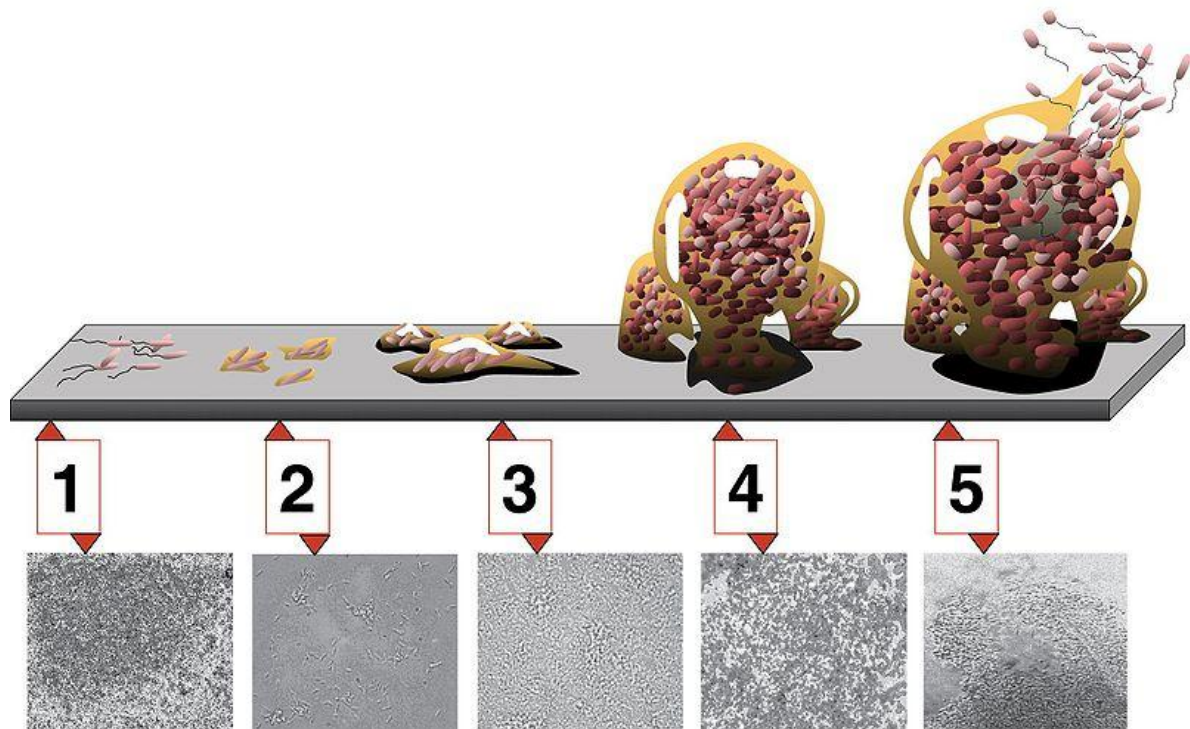
Biofilmes são comunidades microbianas que crescem aderidas a alguma superfície sólida, envolvidas por uma matriz exopolimérica secretada pelos micro-organismos em associação. Alguns fatores contribuem para a formação de biofilme dentre os quais podemos destacar a quantidade de nutrientes, pH, temperatura natureza do substrato, moléculas de *quorum-sensing* e o contato com superfícies (FANNING; MITCHELL, 2012).

O desenvolvimento do biofilme geralmente consiste em cinco etapas: células planctônicas tendem a fixação em superfícies de uma forma reversível através de flagelos, pili, fímbrias e polissacarídeo de adesão. Em seguida as células começam a se multiplicar e tornam-se mais firmemente ligadas e subsequentemente imobilizadas sobre a superfície de uma maneira irreversível devido à produção de polissacarídeos e proteínas da matriz extracelular. Posteriormente, as células crescem uma sobre as outras e começam a segregar componentes da matriz envolvente, transformando-se em grupos de células chamadas de microcolônias; essas microcolônias crescem e formam as macrocolônias, ou biofilme maduro; a partir da macrocolônia as células podem se desprender e formar novo biofilme. A arquitetura do biofilme é bastante complexa, onde cada grupo de células é separado por canais abertos ao longo do biofilme. Esses canais atuam como um sistema circulatório primitivo para o fornecimento de nutrientes e oxigênio, bem como a remoção de resíduos metabólicos, conforme exemplificado na Figura 7 (SUN, 2013).

A formação de biofilme oferece ao micro-organismo proteção contra adversidades do ambiente, resistência a estresses físicos e químicos, cooperação metabólica e regulação da expressão gênica baseada na comunidade (RAMAGE et al., 2012). O material extracelular complexo que compõe a matriz do biofilme tem papel fundamental na defesa contra células fagocitárias, como suporte na manutenção da integridade do biofilme e limita a difusão das substâncias tóxicas (NEGRI et al., 2012). Segundo Shi e Zhu (2009), biofilme é a forma prevalente de crescimento dos micro-organismos na natureza.



Figura 7 – Estágios de desenvolvimento de biofilme: (1) ligação inicial, (2) ligação irreversível, (3) maturação I, (4) maturação II e (5) dispersão. Cada estágio de desenvolvimento no diagrama está emparelhado com um foto micrografia.



Fonte: Don Monroe , 2007.

O biofilme é composto por aproximadamente 97% de água, variando conforme as características do ambiente onde se encontra. A matriz é composta por um complexo de polímeros, nutrientes, produtos de lise celular e partículas de materiais do meio onde vive (SUTHERLAND, 1997).

O estudo de modelos de biofilme tem sido essencial na investigação deste modo de crescimento para a caracterização de propriedades fenotípicas associadas e padrões de expressão de genes (NETT, 2012). A formação de biofilme está diretamente associada à presença de alguns dispositivos como prótese dentária, cateteres venosos e cateteres urinários.

Atualmente, o modelo *in vivo* mais habitualmente utilizado para o estudo de biofilme de *Candida* spp. é o que utiliza catéter venoso. Este modelo simula uma das infecções clínicas mais comuns de biofilme e imita as condições de acolhimento ambientais neste sitio, incluindo a localização anatômica, condições de fluxo e exposição a células hospedeiras, proteínas séricas e fatores imunológicos.

Os estudos *in vitro* em placas tornaram-se uma ferramenta fundamental para a investigação da formação de biofilme de *Candida* spp., fornecendo informações importantes sobre a sua composição e propriedade. Um elemento necessário destas experiências é a

capacidade para quantificar de forma precisa e reprodutível as células viáveis no biofilme. Isso não só serve como um parâmetro importante do estudo, mas fornece os dados necessários para a normalização dos ensaios bioquímicos.

As células em biofilme demonstram um fenótipo mais resistente do que em estados planctônicos. Estudos demonstram que, na realidade, a formação de biofilme está diretamente ligada à expressão gênica, pois estudos detalhados do comportamento de cepas de *C. albicans* em biofilme e na fase planctônica comprovam relativa mudança na expressão gênica nos dois estados (GARCIA-SANCHEZ, 2004; GIBBONS, 2011).

A deficiência na quantidade de nutrientes ao longo do biofilme faz com que muitas cepas passem a reciclar nutriente e a ter uma maior expressão de genes envolvidos na síntese de proteínas (NETT, 2011). A espécie *C. albicans* apresenta a capacidade de auto-regulação dos genes ligados à resistência multidrogas como o *MDR*, *CDR1* e *CDR2* (GIBBONS, 2011), além do que, a expressão de genes ligados ao ergosterol pode também estar relacionada ao aumento do perfil de resistência do biofilme (NETT, 2011). Em geral, existe um aumento nos níveis de expressão de genes envolvidos também na glicólise e no metabolismo de lípidos.

Muitas leveduras de importância médica apresentam a capacidade de formação de biofilme como, por exemplo, as do gênero *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporon*. Infecções causadas por *C. albicans* ocorrem com frequência em pacientes hospitalizados. Com isso, já foram relatadas formações de biofilme em cateteres venosos centrais, cateteres urinários, dispositivos de diálise, aparelhos cardiovasculares, próteses de voz, implantes penianos, dentaduras e implantes oculares (MUKHERJEE; CHANDRA, 2004; RAMAGE et al., 2006; ESTIVILL et al., 2011). Essas infecções associadas a implantes são inerentemente difíceis de tratar e podem requerer terapia antifúngica a longo prazo e a remoção física do implante para controle da infecção (RAMAGE et al., 2012).

A comunicação entre células dentro biofilme é feita pelo um processo conhecido como *quorum-sensing*. Esse processo é de fundamental importância, pois é através dele que ocorre o controle populacional e nutricional dentro do biofilme. Atualmente, algumas moléculas vêm sendo descritas como participantes desse processo, dentre as quais podemos destacar o farnesol e o tirosol. Adicionalmente, sabe-se que não só as moléculas de *quorum sensing* influenciam o processo de formação do biofilme como também diversos outros compostos químicos, como: antifúngicos, poluentes, uso prolongado de antibióticos etc.

## 2.9 Quorum-sensing

*Quorum-sensing*, ou expressão gênica, é um sistema de sinalização entre micro-organismos constituído por pequenas moléculas, estando diretamente ligado à formação de biofilmes tanto de bactérias como de fungos. As células monitoram sua densidade populacional através da liberação dessas moléculas sinalizadoras.

Em bactérias, esses compostos são normalmente moléculas pequenas, estando sua liberação diretamente relacionada à quantidade de bactérias envolvidas no processo. Após atingir um limiar de concentração, estas moléculas de *quorum-sensing* induzem a população a cooperar em diversos comportamentos, tais como a bioluminescência, produção de antibióticos, virulência e formação de biofilme (STEINBACH, 2004).

Em eucariotos, até o presente momento, o mecanismo de *quorum-sensing* foi relatado em fungos, sendo que a maioria dos casos descritos está relacionada com a transição morfológica desses organismos. O fenômeno em fungos tem sido alvo de várias revisões (CHEN; FINK, 2006; HORNBY et al., 2006; SPRAGUE; WINANS, 2006). O primeiro estudo relatando a possibilidade de existir o fenômeno de *quorum-sensing* em eucariotos foi realizado em *Histoplasma capsulatum*, verificando-se a regulação da transição de micélio para levedura nesse fungo (KUGLER et al., 2000). Já para *C. albicans*, foram purificadas e caracterizadas, até o presente momento, duas moléculas de *quorum-sensing*, o farnesol (HORNBY et al., 2001) e o tirosol (CHEN et al., 2004).

O farnesol foi descrito pela primeira vez por Hornby et al. (2001) como sendo uma molécula *quorum-sensing* secretada por *C. albicans*, cuja principal função é inibir a conversão da forma levedura para micélio, sem, contudo, interferir no crescimento celular (KLEIN; TEBBETS, 2007). Em *C. albicans*, o farnesol é gerado endogenamente na célula por ação enzimática da desfosforilação de farnesil difosfato, um precursor da síntese de esteróis na via de biossíntese dos esteróis (SILVA, 2009).

O tirosol foi identificado como uma molécula auto-reguladora com implicações importantes sobre a dinâmica de crescimento e morfogênese em cepas de *C. albicans*. Chen e colaboradores (2004) demonstraram que o mesmo é liberado continuamente durante o crescimento e acelera a formação de tubos germinativos em culturas diluídas, sugerindo que a morfogênese de *Candida* está sob regulação complexa positiva e negativa de condições ambientais. Westwater et al. (2005) apresentaram evidências de que *C. albicans* é capaz de regular sua resposta ao estresse oxidativo em nível da população celular global pela liberação de moléculas protetoras no meio circudante.

A atividade específica do tirosol ainda não foi totalmente elucidada. Todavia, estudos demonstram que ele não apresenta nenhum efeito sobre o crescimento exponencial de *C. albicans*. No entanto, tirosol promove um aumento na taxa de filamentação (CHEN, 2004). Alem (2006) demonstrou que o tirosol é produzido por *C. albicans* em biofilme e na sua forma planctônica. Além disso, o tirosol é capaz de promover a formação de hifas durante os estágios iniciais e intermediários de desenvolvimento do biofilme. Ademais, estudos demonstram que a secreção de tirosol por *C. albicans* dificulta a ação fagocitária (CREMER, 1999).

Curiosamente, a secreção de tirosol por *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* é maior que as de outras espécies como, por exemplo, *C. glabrata*, sugerindo uma possível ligação com a virulência desses micro-organismos (CREMER, 1999).

Tirosol é um dos principais compostos fenólicos presentes em azeite e é conhecido por ter propriedades antioxidantes potentes (MORENO, 2003). Westwater e colaboradores (2005) demonstraram que a molécula farnesol pode ter um papel mais importante do que o tirosol na proteção das células contra estresse oxidativo.

Recentemente, em estudo realizado por Marcos-Arias et al. (2011), o tirosol demonstrou atividade *in vitro* frente a cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis*, apontando o potencial antifúngico desse composto contra *Candida* spp.

## **2.10 Antibióticos e resistência em biofilme de *Candida* spp.**

Uma das características mais intrigantes e clinicamente relevante dos biofilmes microbianos é a taxa de resistência aos antimicrobianos, o que gera sérias consequências para a terapia de infecções por biofilme. Estudos relatam que a concentração inibitória mínima dos antibióticos contra bactérias em biofilme pode ser até 1000 vezes mais elevada do que na fase planctônica (HOIBY et al., 2010).

Vários mecanismos específicos do biofilme são operados simultaneamente numa forma reversível contribuindo para os níveis elevados de resistência aos antibióticos. Estes podem ser intrínsecos ou caracterizados por mecanismos de resistência como, por exemplo, a expressão de enzimas que degradam o antibiótico, diminuição induzida em influxo de antibiótico e alteração em sítios-alvo de antibióticos, empregados em células planctônicas.

Os beta-lactâmicos são antibacterianos amplamente utilizados na clínica atual. A sua estrutura comum apresenta um anel beta-lactâmico de quatro membros altamente reativo. Os antibióticos beta-lactâmicos apresentam efeito antibacteriano inibindo enzimas envolvidas

na síntese do peptidoglicano, importante componente da parede celular. A integridade da parede celular é essencial para manter a forma celular em um ambiente hipertônico e hostil (DRAWZ; BONOMO, 2010; KONG et al., 2011). Os beta-lactâmicos utilizados na clínica são subdivididos em penicilinas, cefalosporinas (de espectro curto e estendido), monobactâmicos e carbapenens (DRAWZ; BONOMO, 2010).

Cefepime é uma cefalosporina de quarta geração prototípica, diferindo das cefalosporinas de terceira geração por apresentar uma substituição *N*-metilpirrolidina quartenizada carregada positivamente na posição 3 do núcleo defem e um grupo alcoximino na posição C-7. Cefepime possui maior atividade contra Enterobacteriaceae, incluindo cepas que produzem beta-lactamases de amplo espectro (KESSLER, 2001).

O meropenem é um antibiótico da classe dos carbapenêmicos, drogas beta-lactâmicas utilizadas com frequência na terapia empírica de pacientes críticos ou para o tratamento de organismos com multi-resistência a antimicrobianos (MATTOES et al., 2004). Meropenem apresenta grande potencial contra micro-organismos Gram-negativos, sendo utilizado para o tratamento de infecções nosocomiais moderadas e graves e infecções polimicrobianas (ZHANEL et al., 2007).

A piperacilina é uma penicilina semissintética de amplo espectro, geralmente utilizada na clínica associada ao tazobactam, um inibidor de beta-lactamases. Piperacilina-tazobactam é um antibiótico intravenoso prescrito preferencialmente no tratamento de infecções moderadas e graves, como pneumonias adquiridas no hospital, infecções do trato urinário, infecções sanguíneas relacionadas a cateteres e infecções de pele e tecidos (HAYASHI et al., 2010).

Os glicopeptídeos, como a vancomicina e a teicoplanina, são antibacterianos polipeptídicos glicosilados de alto peso molecular que atuam bloqueando a biossíntese da camada de peptidoglicano da parede celular de bactérias (KAHNE et al., 2005; LOFFLER; MACDOUGALL, 2007). A vancomicina foi isolada em 1952 do organismo de solo *Streptomyces orientalis* e foi considerada por muito tempo o padrão ouro para a terapia de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (LOFFLER; MACDOUGALL, 2007; CATALDO et al., 2012). O tamanho da molécula de vancomicina restringe sua penetração através da membrana externa de micro-organismos Gram-negativos, limitando seu espectro de ação a Gram-positivos (LOFFLER; MACDOUGALL, 2007).

São raros os trabalhos que relatam o efeito da cefepime, meropenem, vancomicina e piperacilina contra espécies de *Candida*. Maraki e colaboradores (1998) avaliaram o efeito da cefepime, entre outras cefalosporinas, sobre a colonização de intestino de murinos por *C.*

*albicans*. Como resultado, a concentração de *C. albicans* nas fezes dos animais alimentados com *Candida* e tratados com cefepime não teve um aumento significativo quando comparado aos animais alimentados com *Candida* que não tiveram tratamento antifúngico. Não foi observado disseminação de *Candida* e os animais que eram alimentados com ração regular não apresentaram *Candida* em suas fezes.

Um estudo do efeito da cefepime e do meropenem sobre a colonização gastrointestinal de *C. albicans* em pacientes cirúrgicos foi realizado por Samonis e colaboradores (2001). Os dois antibióticos aumentaram a colonização gastrointestinal de *Candida*, sendo que o meropenem causou um aumento mais elevado quando comparado a cefepime. Porém, esses aumentos não foram significantes estatisticamente. Pultz e colaboradores (2005) observaram o efeito de vários antibióticos no estabelecimento da colonização intestinal por *C. glabrata* em camundongos adultos. Entre as drogas utilizadas, a piperacilina-tazobactam promoveu um aumento na densidade na colonização, enquanto a droga cefepime não apresentou um aumento significativo na colonização por *C. glabrata*.

Em estudo do efeito comparativo do ertapenem, imipenem e meropenem sobre colonização do trato gastrointestinal de camundongos por *C. albicans* realizado por Samonis e colaboradores (2006a), observou-se que camundongos colonizados por *Candida* tratados com carbapenens apresentaram concentrações substancialmente mais altas de *C. albicans* do que os animais controles. Porém, não foi observado a disseminação de *Candida* nos camundongos. Um estudo semelhante foi realizado por Samonis e colaboradores (2013), onde foi avaliado o efeito de carbapenens, entre eles o meropenem, isolados e combinados com amicacina na colonização de intestino em murinos por *C. albicans*. Houve aumento da colonização por *Candida* em animais tratados com as drogas, sendo que não houve disseminação de *C. albicans* nos animais.

Samonis e colaboradores (2006b) avaliaram o efeito da vancomicina e outros antibióticos sobre a colonização intestinal em murinos por *C. albicans*. Animais que foram tratados com vancomicina apresentaram aumento na contagem de colônias quando comparados a animais controles, porém o aumento não foi estatisticamente significativo.

Ozcan et al. (2006) observaram o efeito da combinação de caspofungina e meropenem *in vitro* e no tratamento de candidíase disseminada em murinos. Houve sinergismo *in vitro* entre os dois compostos. Além disso, foi observado também que os animais que receberam as duas drogas apresentaram cargas residuais de micro-organismos inferiores aos do controle, indicando um possível benefício em uma terapia utilizando caspofungina e meropenem.

Miceli e colaboradores (2009) observaram que a combinação de doxiciclina e fluconazol apresentou efeito contra biofilme de *Candida* spp. estando esse efeito diretamente relacionado ao aumento da concentração de doxiciclina.

Ku e colaboradores (2010) realizaram um trabalho onde avaliaram o perfil de sensibilidade em biofilmes de *C. albicans* frente a vancomicina e outros antibióticos. A vancomicina não teve nenhuma atividade antifúngica contra biofilme de *C. albicans* em nenhuma concentração. Tsun e colaboradores (2010) demonstraram que azitromicina e tigeciclina nas concentrações de 1024 µg/mL e de 256 µg/mL, respectivamente, apresentaram efeito sobre o biofilme formado de *Candida* spp.

Keeçeli et al. (2013) avaliaram a interação entre caspofungina e voriconazol e piperacilina-tazobactam por métodos *in vitro* e *in vivo* frente a *C. albicans*. Foi observado sinergismo entre a caspofungina e a piperacilina-tazobactam em modelos *in vitro*. Houve também uma redução na carga fúngica nos tecidos de rins de camundongos tratados em comparação aos controles. A mesma interação não foi observada com o voriconazol e os antibacterianos.

### 3. JUSTIFICATIVA

Leveduras do gênero *Candida* são agentes etiológicos da candidíase, uma micose de caráter oportunista que afeta tanto homem como animais. O arsenal antifúngico disponível para o tratamento da candidíase atualmente é limitado e restrito a poucas classes de drogas. Tal fato gera a necessidade da realização de estudos de prospecção de novos compostos com potencial antifúngico. Há também uma crescente preocupação com a resistência intrínseca de biofilmes fúngicos aos antimicrobianos, bem como com a refratariedade terapêutica em infecções relacionadas a biofilmes. Ademais, têm sido destacados estudos que visam apontar diferenças na sensibilidade antifúngica de diferentes espécies de *Candida*, bem como entre cepas da mesma espécie. Dessa forma, torna-se importante avaliar o efeito de diferentes compostos sobre a formação de biofilmes e sobre biofilmes maduros. Portanto, foram avaliados os efeitos de tirosol, uma molécula de *quorum sensing* de *Candida* spp., e dos antibióticos vancomicina, meropenem, piperacilina-tazobactam e cefepime sobre *Candida* spp. na forma planctônica e de biofilme.



#### 4. PERGUNTAS DE PARTIDA

1. Qual o perfil de sensibilidade *in vitro* de cepas de *Candida* spp. frente ao composto tirosol?
2. O tirosol exerce efeito sobre o biofilme de *Candida* spp.?
3. Qual o perfil de sensibilidade *in vitro* de cepas de *Candida* spp. frente ao antibacterianos vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam e cefepime?
4. Os antibacterianos vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam e cefepime, exercem efeito sobre biofilme de *Candida* spp.?

#### 5. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

1. O composto tirosol inibe o crescimento, *in vitro*, de cepas de *Candida* spp.;
2. O composto tirosol exerce efeito sobre o biofilme de *Candida* spp.;
3. Os antibacterianos vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam e cefepime apresentam efeito inibitório sobre espécies de *Candida* spp. na forma planctônica e em biofilme.
4. Os antibacterianos vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam e cefepime apresentam, mesmo que dose alta, ação sobre o biofilme de *Candida* spp.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da molécula de *quorum-sensing* tirosol associados ou não a antifúngicos clássicos, e dos antimicrobianos: vancomicina, meropenem, cefepime e piperacilina-tazobactam, sobre o crescimento de *Candida* spp. resistentes a derivados azólicos, nas formas planctônicas e biofilme.

### 6.2 Objetivos específicos

1. Determinar a concentração inibitória mínima para tirosol ante a cepas de *Candida* spp. resistentes a derivados azólicos;
2. Investigar o efeito das combinações de tirosol e drogas antifúngicas sobre a sensibilidade de cepas de *Candida* spp.;
3. Avaliar o efeito das combinações de tirosol e drogas antifúngicas sobre a formação de biofilme de *Candida* spp.;
4. Avaliar o efeito das combinações de tirosol e drogas antifúngicas sobre biofilme maduro de *Candida* spp.;
5. Determinar a concentração inibitória mínima para vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam e cefepime ante a cepas de *Candida* spp. resistentes a derivados azólicos;
6. Determinar o efeito de vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam e cefepime sobre a formação de biofilme de *Candida* spp.;
7. Averiguar o efeito de vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam e cefepime sobre o biofilme maduro de *Candida* spp.

## 7. MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.1 Recuperação das cepas

Neste estudo foram utilizadas 20 cepas de *Candida* spp. oriundas de animais saudáveis (6 *C. albicans* e 4 *C. tropicalis*) e casos humanos de candidemia (4 *C. albicans* e 6 *C. tropicalis*) previamente descritas como resistentes a antifúngicos (BRITO, 2005; MEDRANO, 2006; CASTELO-BRANCO, 2009), pertencentes a micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), conforme apresentado na Tabela 1.

As cepas encontravam-se estocadas em ágar batata-dextrose acrescido de glicerol a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou em salina 0,9% a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para avaliação da viabilidade celular, as culturas foram repicadas em ágar batata e incubadas por até 96 horas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com observações diárias. Após esse período, foram realizados testes fenotípicos baseados em análises macro e micromorfológicas, bem como testes fisiológicos (De HOOG, 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004), a fim de se confirmar a identificação de cada isolado. Todo o procedimento foi realizado sob normas de biossegurança nível 2. Para controle do experimento foi utilizada a cepa padrão *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Adicionalmente, foi analisado o crescimento de cada isolado em meio cromogênico (HiCrome *Candida differential* Agar, HiMedia, Mumbai, Índia), o qual foram incubados por 48 horas para constatar a pureza das colônias (ALFONSO et al., 2010; SIDRIM et al. 2010). Por fim, a ausência de contaminação bacteriana foi determinada por meio do método de Gram.

Tabela 1 – Relação das cepas de *Candida* spp. utilizadas na pesquisa.

Nº CEMM	Identificação	Origem	Fenótipo de resistência	Referência
01-02-184	<i>C. tropicalis</i>	Humana	AMB, FLC, ITC	Medrano, 2004
02-01-016	<i>C. tropicalis</i>	Humana	ITC	Medrano, 2004
03-02-048	<i>C. tropicalis</i>	Humana	FLC, ITC	Medrano, 2004
01-01-031	<i>C. tropicalis</i>	Calopsita	FLC, ITC	Castelo-Branco, 2009
02-01-012	<i>C. tropicalis</i>	Humana	FLC, ITC	Medrano, 2004
02-02-179	<i>C. tropicalis</i>	Humana	FLC, ITC	Medrano, 2004
02-02-199	<i>C. tropicalis</i>	Humana	FLC, ITC	Medrano, 2004
03-02-047	<i>C. tropicalis</i>	Cão	ITC	Brito, 2005
01-02-078	<i>C. tropicalis</i>	Cão	ITC	Brito, 2005
01-03-075	<i>C. tropicalis</i>	Cão	ITC	Brito, 2005
01-05-005	<i>C. albicans</i>	Humana	ITC	Medrano, 2004
01-05-006	<i>C. albicans</i>	Humana	FLC, ITC	Medrano, 2004
01-05-004	<i>C. albicans</i>	Humana	ITC	Medrano, 2004
02-01-070	<i>C. albicans</i>	Humana	AMB	Medrano, 2004
01-03-069	<i>C. albicans</i>	Cão	ITC	Brito, 2005
01-03-037	<i>C. albicans</i>	Calopsita	ITC	Castelo-Branco, 2009
01-01-027	<i>C. albicans</i>	Calopsita	FLC	Castelo-Branco, 2009
03-02-033	<i>C. albicans</i>	Cão	AMB, ITC	Brito, 2005
01-03-068	<i>C. albicans</i>	Cão	FLC	Brito, 2005
01-02-081	<i>C. albicans</i>	Cão	FLC, ITC	Brito, 2005

AMB – anfotericina B; FLC – fluconazol; ITC – itraconazol.

## 7.2 Antifúngicos e antibióticos

Nesta pesquisa foram incluídas três drogas antifúngicas: fluconazol (FLC) (Janssen Pharmaceutica, Bélgica), itraconazol (ITC) (Janssen Pharmaceutica, Bélgica) e anfotericina B (AMB) (Sigma Chemical Corporation, EUA); e quatro antibióticos: vancomicina (Wyeth, EUA), meropenem (AstraZeneca, British-Swedish), piperacilina/tazobactam (Wyeth, EUA), cefepime (Biochimico, Brasil) e o composto tirosol (Sigma Chemical Corporation, EUA).

As soluções de fluconazol (FLC), itraconazol (ITC) e anfotericina B (AMB) foram diluídas em água destilada (PFALLER et al., 2006; CLSI, 2008). As drogas antibacterianas vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam e cefepime foram diluídas em água destilada estéril, como recomendado pelo fabricante, em uma concentração estoque de 50 mg/mL. O tirosol foi diluído em água destilada estéril para uma solução estoque de 25 mg/mL e, logo em seguida, em meio RPMI 1640 para obter a concentração de 12 mg/mL. As drogas antifúngicas foram diluídas para uma concentração estoque de 2 mg/ml e estocadas a – 20 °C.

As concentrações das drogas testadas variaram de 0,125 a 64 µg/ml para fluconazol, de 0,03125 a 16 µg/ml para itraconazol e anfotericina B (PFALLER et al., 2006; CLSI, 2008), de 0.0039 a 4 mg/mL para vancomicina, meropenem, piperacilina-tazobactam e cefepime, e de 5,86 to 3000 µg/mL para tirosol.

### **7.3 Preparo do inóculo**

Para preparo do inóculo foram utilizadas cepas de *Candida* spp. cultivadas em ágar batata e incubadas a 35 °C por 24 h. Primeiramente, foi retirado uma porção da colônia com o auxílio de alça microbiológica, sendo a mesma resuspendida em 5 ml de solução salina a 0,9%, a qual foi agitada em vórtex por 15 segundos e, em seguida, feito o ajuste do inóculo a concentração de 0,5 na escala de McFarland para aquisição de uma concentração de 5,0 – 6,5 x 10<sup>6</sup> UFC/mL. Posteriormente, foram realizadas duas diluições consecutivas, a primeira na proporção de 1:50 e a segunda de 1:20, em meio RPMI 1640, tamponado com MOPS 0,156 M, pH 7,0, para a obtenção de uma concentração final entre 0,25 e 2,5 x 10<sup>3</sup> células/mL, respectivamente (CLSI, 2008).

### **7.4 Teste de sensibilidade *in vitro***

Nesta etapa, foi realizado teste de sensibilidade *in vitro* por meio da técnica de microdiluição em caldo, segundo o documento M27-A3 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), para as cepas *Candida* spp. selecionadas frente aos derivados azólicos e anfotericina B, afim de reavaliar a persistência do fenômeno de resistência após a estocagem das culturas. Foi investigada também a sensibilidade dos isolados frente aos antibióticos em estudo e ao tirosol isoladamente.

Para realização do teste, foram utilizadas placas de 96 poços com capacidade de 200  $\mu\text{L}$ , onde primeiramente foram adicionado 100  $\mu\text{L}$  do meio RPMI em cada poço, e em seguida acrescentaram-se 100  $\mu\text{L}$  da droga na primeira coluna, em uma concentração 4 vezes maior que a concentração esperada no primeiro poço e, posteriormente, a droga foi diluída até a décima coluna. A coluna 11 de cada placa foi separada para controle negativo do experimento, ou seja, o inóculo e o meio sem a droga; a coluna 12 foi dividida em duas partes com quatro poços cada uma, onde em uma metade era feito o controle de esterilidade da droga em teste e a outra era usada para controle de esterilidade do meio RPMI 1640. As placas foram incubadas a 35 °C por até 48 h, quando então foi feita a leitura visual da inibição do crescimento.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada como sendo aquela capaz de inibir 50% do crescimento para os derivados azólicos, antibacterianos e tirosol e de 100% de inibição para anfotericina B (PFALLER et al., 2006; CLSI, 2008).

Para avaliar a ocorrência de resistência, foram levados em consideração os seguintes valores: CIM > 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para anfotericina B; CIM  $\geq$  1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para itraconazol e CIM  $\geq$  32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para fluconazol (CLSI, 2008). Todo o experimento foi realizado em duplicata e com a presença de controles (esterilidade da droga, do meio e de crescimento fúngico sem a presença da droga) em cada placa, assim como a presença das cepas padrões *C. parapsilosis* ATCC 22019, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

## 7.5 Combinação de drogas antifúngicas e tirosol

Após a determinação da CIM de cada cepa isoladamente, foi feita uma combinação de drogas antifúngicas e tirosol, a fim de averiguar a presença de sinergismo entre as drogas. A interação entre as drogas foi analisada através do cálculo do índice da concentração inibitória fracionária (FICI), segundo Odds (2003). O índice FICI é definido como a soma dos valores da Concentração Inibitória Fracionada (FIC) para cada droga. O valor de FIC, por sua vez, corresponde à relação entre o CIM de cada droga combinada e o CIM da mesma droga testada isoladamente. Desta forma, foram considerados os seguintes parâmetros: FICI  $\leq$  0,5: sinergismo, FICI > 4,0: antagonismo e 0,5 < FICI < 4,0: sem interação (ODDS, 2003).

## 7.6 Formação do biofilme

O método para a produção de biofilme foi realizado de acordo com o protocolo de Chatzimoschou et al. (2011), com algumas modificações. Resumidamente, as cepas de *C. albicans* (n = 10) e *C. tropicalis* (n = 10) foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose a 30 °C por 48 horas e transferidas para caldo Sabouraud dextrose, sendo incubadas na mesma temperatura por 24 horas, sob agitação constante (150 rpm). Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação (3000 rpm, 10 minutos), lavadas duas vezes com tampão PBS estéril e, em seguida, resuspendidas em 1 mL de meio RPMI 1640. Alíquotas de 200 µL da suspensão fúngica foram transferidas para poços de placa de polipropileno de fundo chato, sendo incubado a 37 °C por 48 horas. Após incubação, o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente e a camada de células foi lavada três vezes com TBS (0,05% Tween 20 em tampão Tris). Após incubação a 37 °C durante 48 h, o sobrenadante foi aspirado e atividade metabólica do biofilme foi quantificada por 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [(fenilamino) carbonil] - ensaio de redução; hidróxido 2H-tetrazólio (XTT, Sigma, Alemanha). Para cada cepa, 75 mL de solução de sal de XTT (1 mg/mL em PBS), 6 mL de solução de menadiona (1 mM em acetona; Sigma, Alemanha) e 50 µL de PBS estéril foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas a 36 °C durante 5h. A atividade metabólica, no interior do biofilme foi avaliada através da redução enzimática do sal de tetrazólio XTT à XTT formazano, resultando numa alteração colorimétrica, a qual foi então medida a 492 nm. Como controle, foram utilizados poços contendo meio de cultura RPMI sem a presença de inóculo fúngico, além de poços controle para cada solução utilizada (solução salina e drogas testadas). Todo o experimento foi realizado em duplicata e repetido três vezes, independentemente.

## 7.7 Efeito do tirosol isolado e em combinação com drogas antifúngicas sobre a formação de biofilme de *Candida* spp.

Foi investigada a capacidade de inibição da formação do biofilme de *Candida* spp. pelo composto tirosol isolado e em combinação com drogas antifúngicas conforme sugerido por Yu et al. (2012). A formação do biofilme seguiu o descrito no item anterior, com a utilização das mesmas cepas, exceto pela adição do composto tirosol e antifúngicos durante a etapa de inoculação das placas. Aliquotas de 100 µL de soluções de tirosol, tirosol + anfotericina B, tirosol + fluconazol e tirosol + itraconazol foram adicionados a cada poço.

O tirosol isolado foi testado nas concentrações CIM, 10xCIM e 50xCIM. As combinações entre tirosol e antifúngicos foram testadas em três concentrações diferentes (CIM, 10xCIM e 50xCIM). Após incubação a 37 °C durante 48 h, o sobrenadante foi aspirado e a placa lavada duas vezes com 200 µL de PBS. Após incubação a 37 °C durante 48 h, o sobrenadante foi aspirado e atividade metabólica do biofilme foi quantificada por 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [(fenilamino) carbonil] - ensaio de redução; hidróxido 2H-tetrazólio (XTT, Sigma, Alemanha). Para cada cepa, 75 mL de solução de sal de XTT (1 mg/mL em PBS), 6 mL de solução de menadiona (1 mM em acetona; Sigma, Alemanha) e 50 µL de PBS estéril foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas a 36 °C durante 5 h. A atividade metabólica no interior do biofilme foi avaliada através da redução enzimática do sal de tetrazólio XTT à XTT formazano, resultando numa alteração colorimétrica, a qual foi então medida a 492 nm. Como controle, foram utilizados poços contendo meio de cultura RPMI sem a presença de inóculo fúngico, além de poços controle para cada solução utilizada (solução salina e drogas testadas). Todo o experimento foi realizado em duplicata e repetido três vezes, independentemente.

### **7.8 Efeito do tirosol isolado e em combinação com drogas antifúngicas sobre o biofilme maduro de *Candida* spp.**

A atividade inibidora do tirosol isolado e em combinações com antifúngicos contra biofilme maduro de *C. albicans* e *C. tropicalis* foi avaliada de acordo com Yu e colaboradores (2012), com ligeiras modificações. A formação do biofilme seguiu o descrito no item anterior, com a utilização das mesmas cepas.

O tirosol isolado foi testado nas concentrações: CIM, 10xCIM e 50xCIM, as combinações tirosol e antifúngicos foram testadas em três concentrações diferentes (CIM, 10xCIM e 50xCIM). Após incubação a 37 °C durante 48 h, o sobrenadante foi aspirado e a placa lavada duas vezes com 200 µL de PBS. Em seguida, uma alíquota de 200 µL de uma solução de meio RPMI 1640 e drogas antifúngicas foram adicionadas a cada poço da placa, incubadas por mais 48 h a 37 °C. Após incubação, o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente e a camada de células lavadas três vezes com TBS (0,05% Tween 20 em tampão Tris). Após incubação a 37 °C durante 48 h, o sobrenadante foi aspirado e atividade metabólica do biofilme foi quantificada por 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [(fenilamino) carbonil] - ensaio de redução; hidróxido 2H-tetrazólio (XTT, Sigma, Alemanha). Para cada cepa, 75 mL de solução de sal de XTT (1 mg/mL em PBS), 6 mL de solução de



menadiona (1 mM em acetona; Sigma, Alemanha) e 50 µL de PBS estéril foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas a 36 °C durante 5 h. A atividade metabólica, no interior do biofilme foi avaliada através da redução enzimática do sal de tetrazólio XTT à XTT formazano, resultando numa alteração colorimétrica, a qual foi então medida a 492 nm. Como controle, foram utilizados poços contendo meio de cultura RPMI sem a presença de inóculo fúngico, além de poços controle para cada solução utilizada (solução salina e drogas testadas). Todo o experimento foi realizado em duplicata e repetido três vezes, independentemente.

### **7.9 Efeito de drogas antibacterianas sobre a formação de biofilme de *Candida* spp.**

A capacidade da vancomicina, meropenem, piperacilina-tazobactam e cefepime, em inibir a formação de biofilme de *C. albicans* (n=10) e *C. tropicalis* (n=10) foi avaliada conforme sugerido por Miceli e colaboradores (2012). A formação de biofilme foi realizada conforme descrito na seção anterior desta pesquisa, com a utilização das mesmas cepas.

Resumidamente, durante a etapa de inoculação da placa, alíquotas de 100 µL das soluções antibacterianas foram adicionados a cada poço. Cada droga foi testada em cinco concentrações diferentes, CIM/50, CIM/10, CIM, 10xCIM e 50xCIM. Após incubação a 37 °C durante 48 h, o sobrenadante foi aspirado e atividade metabólica do biofilme foi quantificada por 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [(fenilamino) carbonil] - ensaio de redução; hidróxido 2H-tetrazólio (XTT, Sigma, Alemanha). Para cada cepa, 75 mL de solução de sal de XTT (1 mg/mL em PBS), 6 mL de solução de menadiona (1 mM em acetona; Sigma, Alemanha) e 50 µL de PBS estéril foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas a 36 °C durante 5 h. A atividade metabólica, no interior do biofilme foi avaliada através da redução enzimática do sal de tetrazólio XTT à XTT formazano, resultando numa alteração colorimétrica, a qual foi então medida a 492 nm. Como controle, foram utilizados poços contendo meio de cultura RPMI sem a presença de inóculo fúngico, além de poços controle para cada solução utilizada (solução salina e drogas testadas). Todo o experimento foi realizado em duplicata e repetido três vezes, independentemente.

Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos em três momentos independentes. Os controles foram cultivados em meio sem antibióticos e anfotericina B foi usada como controle para a inibição da formação de biofilme.

### 7.10 Efeito de drogas antibacterianas sobre o biofilme maduro

A atividade inibitória de vancomicina, meropenem, piperacilina-tazobactam e cefepime, contra biofilmes maduros de *C. albicans* (n=10) e *C. tropicalis* (n=10) foi avaliada de acordo com Miceli et al. (2012), com ligeiras modificações. A formação de biofilme foi realizada conforme descrito na seção anterior desta pesquisa, com a utilização das mesmas cepas.

Após incubação a 37 °C durante 48 h, o sobrenadante foi aspirado e a placa lavada duas vezes com 200 µL de PBS em seguida uma alíquota de 200 µL de uma solução de meio RPMI 1640 e drogas antibacterianas foram adicionadas a cada poço da placa, incubadas por mais 48 h a 37 °C. Após incubação a 37 °C durante 48 h, o sobrenadante foi aspirado e atividade metabólica do biofilme foi quantificada por 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) - 5 - [(fenilamino) carbonil] - ensaio de redução; hidróxido 2H-tetrazólio (XTT, Sigma, Alemanha). Para cada cepa, 75 mL de solução de sal de XTT (1 mg / ml em PBS), 6 mL de solução de menadiona (1 mM em acetona; Sigma, Alemanha) e 50 µL de PBS estéril foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas a 36 °C durante 5 h. A atividade metabólica, no interior do biofilme foi avaliada através da redução enzimática do sal de tetrazólio XTT à XTT formazano, resultando numa alteração colorimétrica, a qual foi então medida a 492 nm. Como controle, foram utilizados poços contendo meio de cultura RPMI sem a presença de inóculo fúngico, além de poços controle para cada solução utilizada (solução salina e drogas testadas). Todo o experimento foi realizado em duplicata e repetido três vezes, independentemente.

### 7.11 Análise estatística

Os resultados obtidos neste trabalho foram avaliados estatisticamente pelo Teste *t-Student* pareado, para efeitos de comparação entre os valores encontrados. A análise estatística teve como critério de significância  $p < 0,05$ .

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Teste de sensibilidade *in vitro*

Os valores da CIM para as cepas de *Candida* spp. testadas frente a drogas antifúngicas e o composto tirosol encontram-se mostrados na Tabela 2. Os valores da CIM para *C. albicans* (10) e *C. tropicalis* (10) frente ao composto tirosol variaram de 2,5 a 5 mM, demonstrando uma variação da CIM dentro de um valor comum próximo para todas as cepas estudadas.

Para os derivados azólicos, o intervalo dos valores da CIM para fluconazol foi de 2 a >64 µg/ml, observando-se a presença de 7/10 cepas resistentes (CIM > 64 µg/mL) para *C. tropicalis* e de 6/10 para *C. albicans*. Em relação ao itraconazol, os valores da CIM variaram de 2 a >16 µg/mL, onde todas as cepas apresentaram resistência a esse antifúngico (CIM ≥ 1 µg/mL).

A CIM para as 20 cepas frente à anfotericina B foi determinada a fim de se confirmar a ocorrência de resistência entre as cepas estudadas. Constatou-se que, das 20 cepas em estudo, 5 (1 *C. albicans* e 4 *C. tropicalis*) apresentaram resistência a anfotericina B, com CIM > 1 µg/mL. Vale destacar que a taxa de resistência entre as cepas de *C. tropicalis* foi 4 vezes maior que as de *C. albicans*. Adicionalmente, observou-se que as cepas de origem humana apresentaram valores de CIM mais elevados, quando comparadas às de origem animal, destacando que todas as 4 cepas de *C. tropicalis* são de origens humana e apresentaram CIM igual a 4 µg/mL.

A concentração inibitória mínima para os antibacterianos frente às 20 cepas de *Candida* spp. variou de 0,5 a 2 mg/mL para vancomicina, piperacilina-tazobactam e cefepime, e de 0,5 a 1 mg/mL para o meropenem, conforme expresso na Tabela 3.



Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) de drogas antifúngicas e tirosol frente a cepas de *Candida* spp.

Micoteca	Espécies	Origem	CIM							FICI		
			ITC	FLC	AMB	TIR	ITC/TIR	FLC/TIR	AMB/TIR	ITC/TIR	FLC/TIR	AMB/TIR
			µg/mL			mM	µg/mL / mM					
01-02-184	Humana	<i>C. tropicalis</i>	2	8	2	5	0,25/0,625	1/1,25	0,125/0,3125	0.25	0.375	0.125
02-01-016	Humana	<i>C. tropicalis</i>	>16	>64	0,5	5	0,5/0,3125	16/1,25	0,25/0,625	0.093	0.5	0.625
03-02-048	Humana	<i>C. tropicalis</i>	>16	>64	0,5	2,5	2/0,3125	8/0,31250	0,125/0,3125	0.5	0.25	0.375
01-01-031	Calopsitas	<i>C. tropicalis</i>	>16	>64	1	5	0,0625/0,156	0,125/0,039	0,5/1,25	0.07	0.097	0.75
02-01-012	Humana	<i>C. tropicalis</i>	>16	>64	4	5	0,125/0,3125	8/1,25	0,5/1,25	0.07	0.375	0.375
02-02-179	Humana	<i>C. tropicalis</i>	>16	>64	4	5	0,125/0,3125	4/0,625	0,5/1,25	0.07	0.187	0.375
02-02-199	Humana	<i>C. tropicalis</i>	>16	8	4	5	2/0,625	1/1,25	0,25/0,625	0.25	0.375	0.077
03-02-047	Cão	<i>C. tropicalis</i>	8	32	0,5	5	0,125/0,3125	2/0,625	0,125/0,3125	0.078	0.187	0.312
01-02-078	Cão	<i>C. tropicalis</i>	4	>64	0,5	2,5	1/0,625	4/0,625	0,25/0,625	0.5	0.187	0.75
01-03-075	Cão	<i>C. tropicalis</i>	>16	>64	1	5	0,5/0,3125	1/1,25	0,125/0,3125	0.07	0.375	0.187
05-05-005	Humana	<i>C. albicans</i>	>16	>64	0,5	2,5	2/0,3125	8/0,31250	0,0625/1,25	0.249	0.5	0.625
01-05-006	Humana	<i>C. albicans</i>	4	2	0,5	5	0,0625/0,156	0,125/0,039	0,125/0,3125	0.046	0.14	0.312
01-05-004	Humana	<i>C. albicans</i>	2	2	0,5	2,5	0,0625/0,156	0,125/0,039	0,5/1,25	0.094	1.0	1.25
02-01-070	Humana	<i>C. albicans</i>	4	4	0,5	5	0,0625/0,156	1/1,25	0,25/0,625	1.0	0.5	0.625
01-03-069	Cão	<i>C. albicans</i>	2	>64	2	2,5	0,0625/0,156	0,0156/0,625	1/2,5	2.0	0.027	1.5
01-03-037	Calopsitas	<i>C. albicans</i>	>16	>64	0,5	5	2/0,625	1/1,25	0,125/0,3125	0.5	0.375	0.312
01-01-027	Calopsitas	<i>C. albicans</i>	>16	>64	0,25	2,5	0,0625/0,156	0,125/0,039	0,125/1,25	0.101	0.0175	1.0
03-02-033	Cão	<i>C. albicans</i>	>16	32	0,125	5	2/0,625	16/2,5	0,125/0,3125	0.5	1.0	1.062
01-03-068	Cão	<i>C. albicans</i>	>16	>64	0,5	2,5	2/0,0312	2/0,625	0,125/0,3125	0.5	0.281	0.375
01-02-081	Cão	<i>C. albicans</i>	>16	>64	0,5	5	1/0,625	8/1,25	0,0625/1,25	0.187	0.375	0.375

ITC - Itraconazol; FLC - Fluconazol; AMB - Anfotericina B

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima para vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam, cefepime e anfotericina B contra *Candida* spp.

Cepas	Espécies	Concentração inibitória mínima				
		mg/mL				µg/mL
		Vancomicina	Meropenem	Piperacilina/tazobactam	Cefepime	Anfotericina B
<b>CEMM 01-02-184</b>	<i>C. tropicalis</i>	0.5	1	0.5	1	2
<b>CEMM 02-01-016</b>	<i>C. tropicalis</i>	1	1	1	2	0.5
<b>CEMM 03-02-048</b>	<i>C. tropicalis</i>	2	1	2	2	0.5
<b>CEMM 01-01-031</b>	<i>C. tropicalis</i>	0.5	1	0.5	2	1
<b>CEMM 02-01-012</b>	<i>C. tropicalis</i>	1	1	2	2	4
<b>CEMM 02-02-179</b>	<i>C. tropicalis</i>	1	0.5	1	0.5	4
<b>CEMM 02-02-199</b>	<i>C. tropicalis</i>	1	0.5	1	0.5	4
<b>CEMM 03-02-047</b>	<i>C. tropicalis</i>	0.5	1	2	2	0.5
<b>CEMM 01-02-078</b>	<i>C. tropicalis</i>	1	1	1	2	0.5
<b>CEMM 01-03-075</b>	<i>C. tropicalis</i>	1	0.5	0.5	0.5	1
<b>CEMM 05-05-005</b>	<i>C. albicans</i>	1	1	0.5	0.5	0.5
<b>CEMM 01-05-006</b>	<i>C. albicans</i>	1	0.5	1	1	0.5
<b>CEMM 01-05-004</b>	<i>C. albicans</i>	1	1	1	2	0.5
<b>CEMM 02-01-070</b>	<i>C. albicans</i>	1	1	1	2	0.5
<b>CEMM 01-03-069</b>	<i>C. albicans</i>	0.5	0.5	0.5	1	2
<b>CEMM 01-03-037</b>	<i>C. albicans</i>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
<b>CEMM 01-01-027</b>	<i>C. albicans</i>	0.5	0.5	1	0.5	0.25
<b>CEMM 03-02-033</b>	<i>C. albicans</i>	1	1	2	2	0.125
<b>CEMM 01-03-068</b>	<i>C. albicans</i>	1	0.5	1	1	0.5
<b>CEMM 01-02-081</b>	<i>C. albicans</i>	0.5	1	1	0.5	0.5

## 8.2 Combinação de drogas antifúngicas e tirosol

Após a determinação dos valores da CIM para tirosol e drogas antifúngicas isoladamente, foi realizada a associação entre esses compostos. Os resultados encontram-se expressos na Tabela 2. A associação de itraconazol e tirosol e de fluconazol e tirosol apresentou sinergismo 100% para todas as 20 cepas de *Candida* spp.

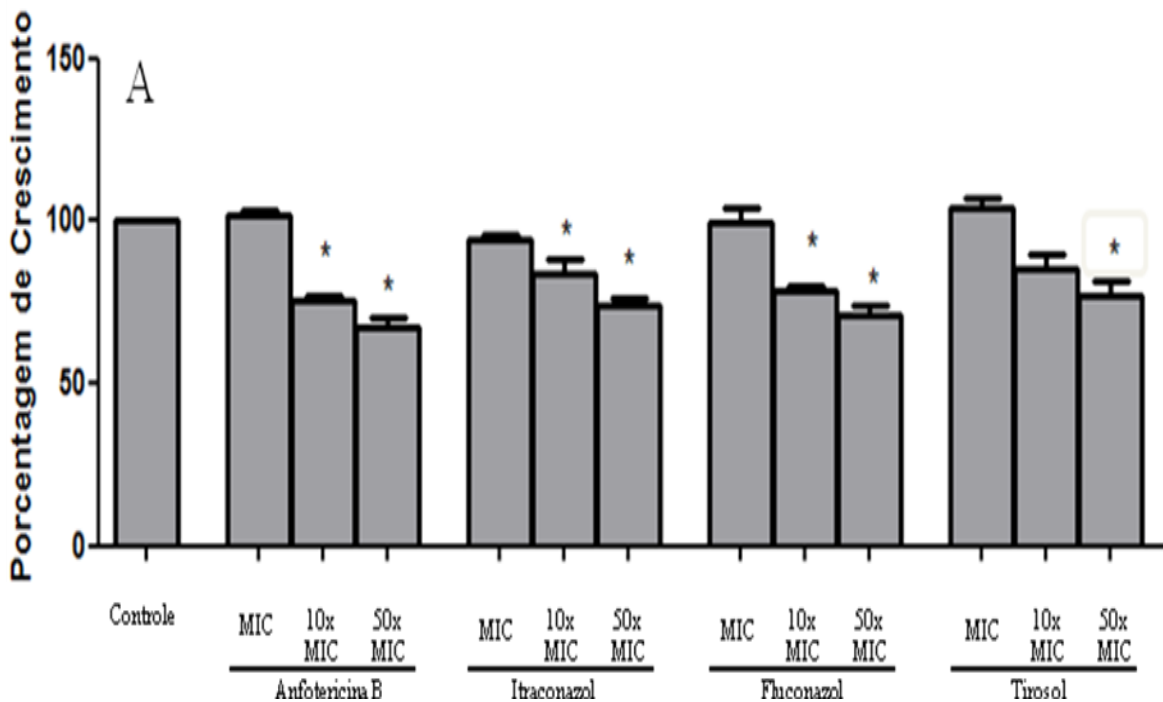
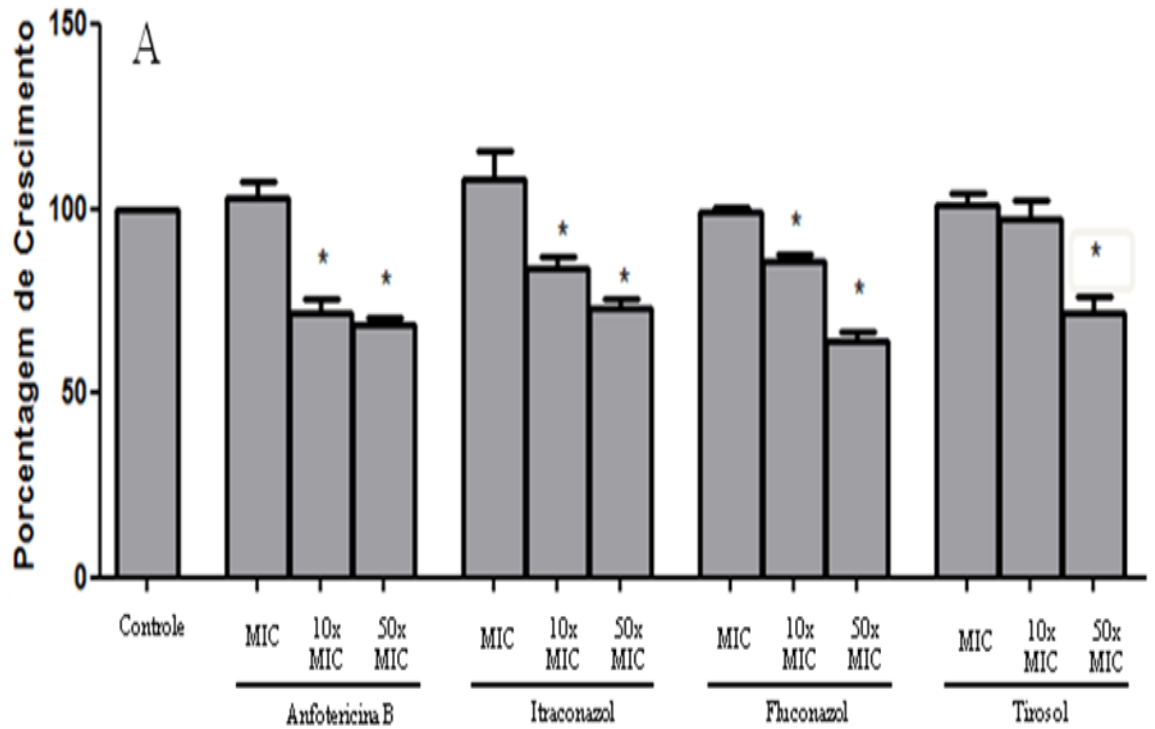
A associação anfotericina B e tirosol apresentou sinergismo em 70% (7/10) das cepas de *C. tropicalis*, evidenciado pelos valores de FICI  $\leq 0,5$ , e de 50% (5/10) das cepas de *C. albicans*.

### **8.3 Efeito do tirosol e drogas antifúngicas isoladas sobre o biofilme em formação e formado de *Candida* spp.**

O tirosol isolado apresentou efeito sobre a formação de biofilme de ambas as espécies de *Candida* na concentração 50xCIM ( $p < 0,0001$ ), quando comparado com o controle de crescimento. Para as cepas de *C. tropicalis* a redução no percentual de crescimento foi de 38% quando comparado ao grupo controle, e de 40% para *C. albicans*. Já as drogas antifúngicas apresentaram efeito significativo nas concentrações 10xCIM e 50xCIM para ambas espécies, conforme expresso na Figura 8.



Figura 8 – Efeito da anfotericina B, itraconazol e fluconazol e tirosol sobre o biofilme em formação de *C. tropicalis* (A). Efeito do da anfotericina B, itraconazol e fluconazol e tirosol sobre o biofilme em formação de *C. albicans* (B).

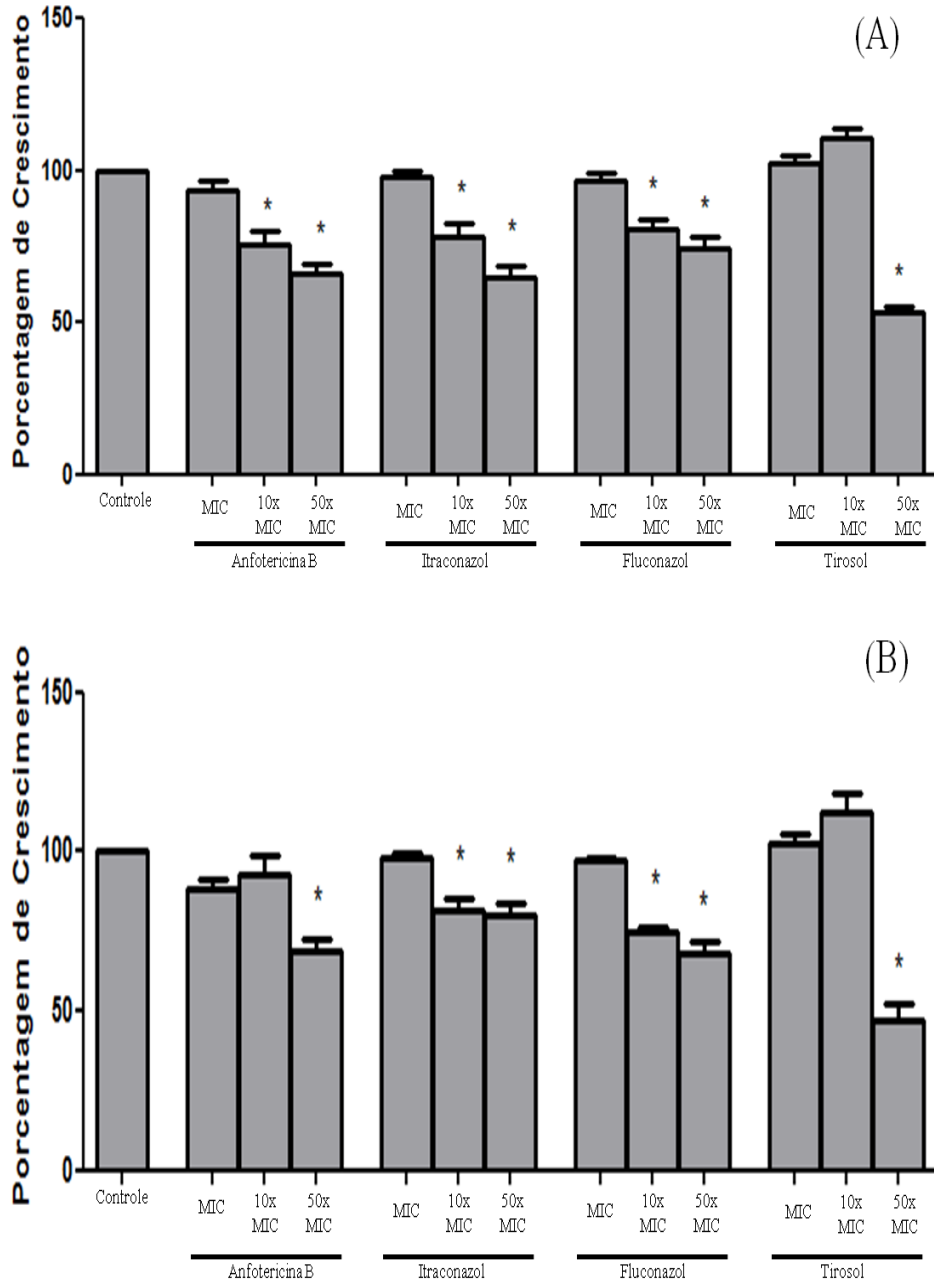


CIM – Concentração inibitória mínima; \* - Diferença significativa com relação ao controle ( $p < 0,0001$ ).

#### **8.4 Efeito do tirosol sobre o biofilme maduro de *Candida* spp.**

Em relação ao efeito do tirosol sobre o biofilme formado observou-se um aumento de aproximadamente 10% na produção do biofilme na concentração 10xCIM e uma redução da ordem de 50% na concentração 50xCIM, conforme ilustrado na Figura 9. Em relação ao efeito das drogas antifúngicas isoladas sobre o biofilme formado também foi observado uma diminuição sigficativa em relação ao controle nas concentrações 10xCIM e 50xCIM (FIGURA 9).

Figura 9 – Efeito do da anfotericina B, itraconazol e fluconazol e tirosol sobre o biofilme formado de *C. tropicalis* (A). Efeito do da anfotericina B, itraconazol e fluconazol e tirosol sobre o biofilme em formação de *C. albicans* (B).

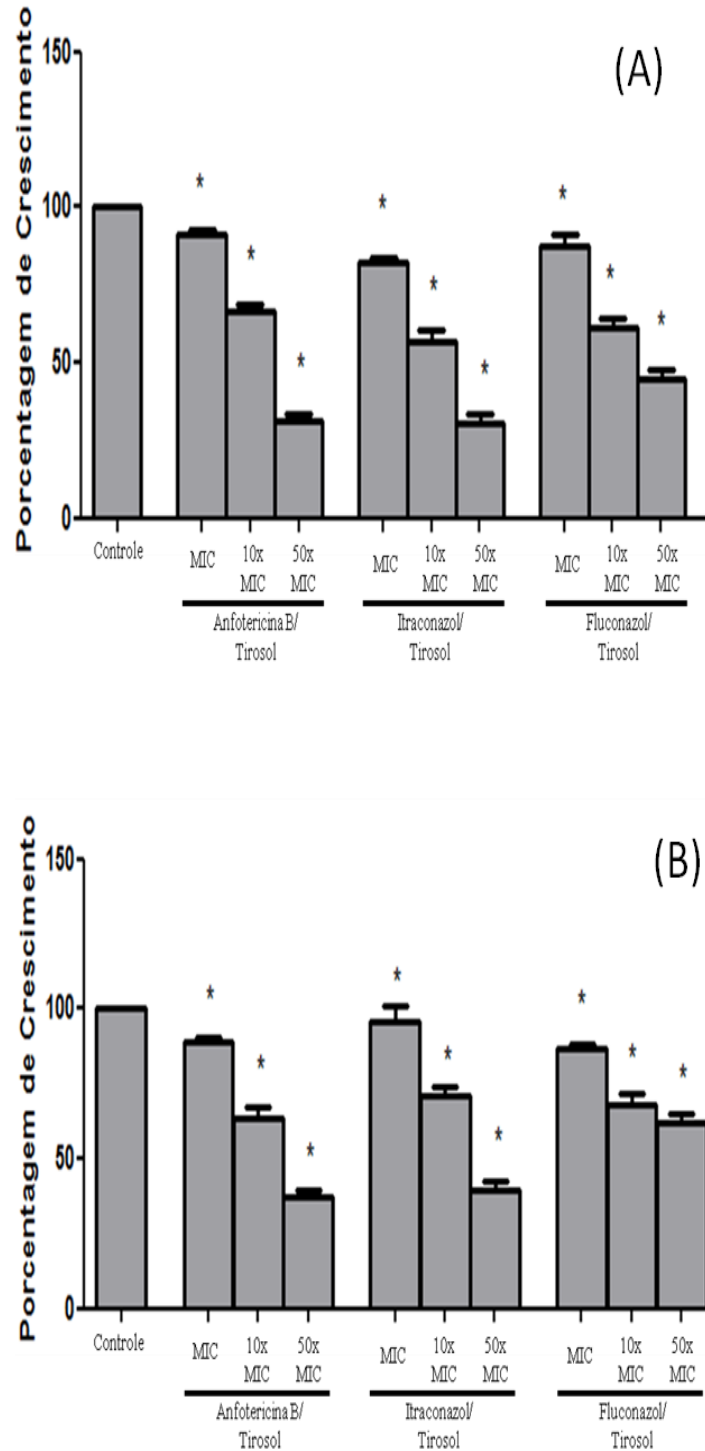


CIM – Concentração inibitória mínima; \* - Diferença significativa com relação ao controle ( $p < 0,0001$ ).

### **8.5 Efeito da combinação de tirosol e drogas antifúngicas sobre a formação de biofilme de *Candida* spp.**

As combinações de tirosol e drogas antifúngicas (anfotericina B, fluconazol e itraconazol) foram testadas nas concentrações CIM, CIMx10 e CIMx50. Para a combinação anfotericina B e tirosol houve uma queda em média da produção de biofilme de 12%, 37% e 63% para a espécie *C. tropicalis*, respectivamente, e de 9%, 34% e 69% para *C. albicans*, respectivamente. Em relação à combinação de fluconazol e tirosol observou-se uma queda média de 14%, 32% e 48% para *C. tropicalis*, respectivamente e de 135,39% e 56% para *C. albicans* e por fim na combinação de itraconazol e tirosol foi observado uma queda média de 5%, 29% e 61%, para *C. tropicalis* 18%, 43% e 70% para *C. albicans*. Vale resalta que toda as queda apresentadas foram estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) já a partir do CIM, conforme gráficos expressos na Figura 10.

Figura 10 – Efeito da combinação de tirosol e drogas antifúngicas sobre o biofilme em formação de *Candida tropicalis* (A), *Candida albicans* (B).



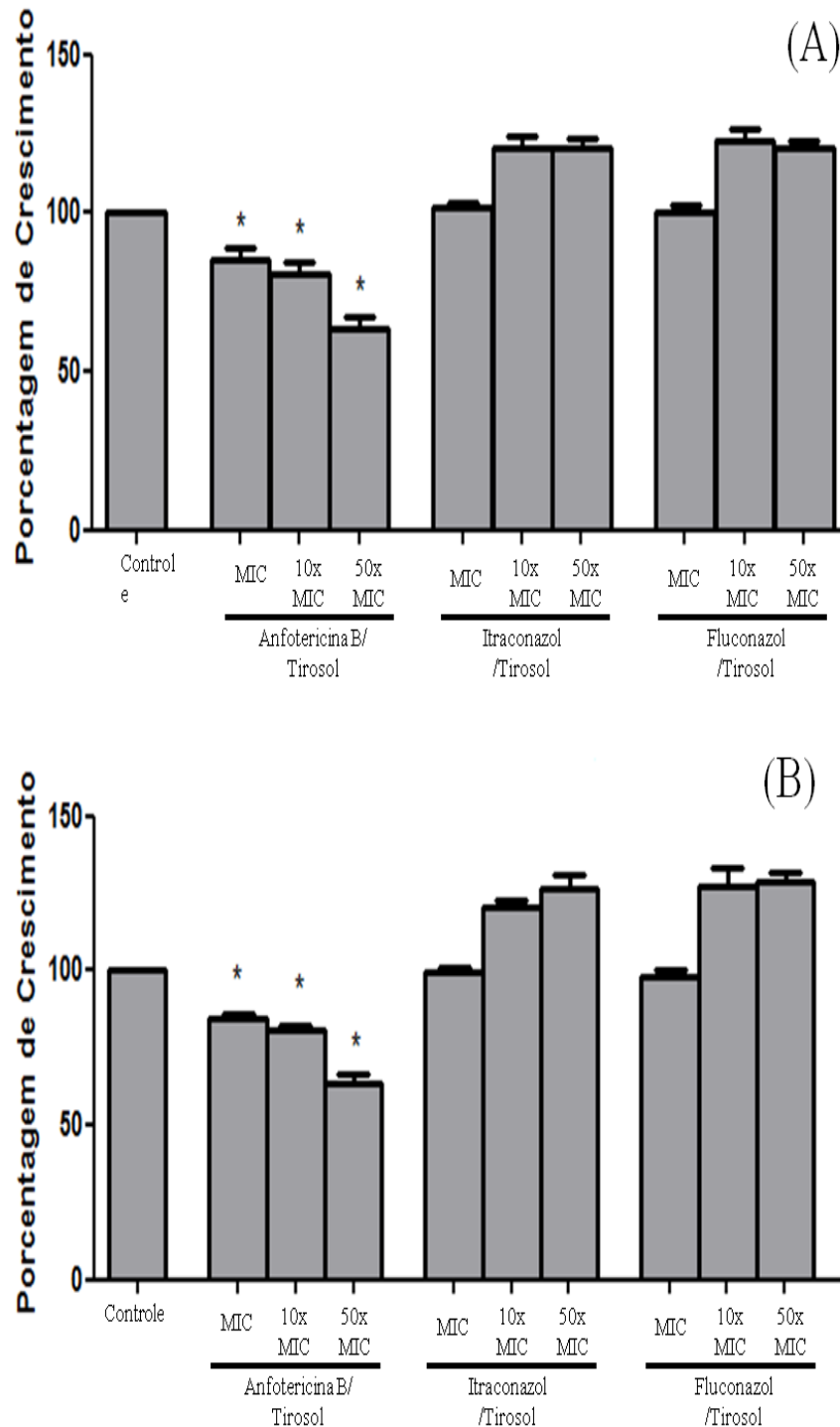
MIC – Concentração inibitória mínima; \* - Diferença significativa com relação ao controle ( $p < 0,0001$ ).

### **8.6 Efeito da combinação de tirosol e drogas antifúngicas sobre o biofilme formado de *Candida* spp.**

Para o biofilme maduro o efeito da combinação tirosol e drogas antifúngicas foi totalmente o inverso daquilo observado para o biofilme em formação, pois observou um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,0001$ ) na produção de biofilme quando o tirosol foi combinado com derivados azólicos a partir da concentração 10xCIM. Na combinação de fluconazol e tirosol esse aumento foi em média de 21% para *C. tropicalis* e de 27% para *C. albicans*, e de 20% para *C. tropicalis* e de 23% para *C. albicans*, na combinação de itraconazol e tirosol.

Na combinação de anfotericina B e tirosol observou-se uma queda estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) na produção de biofilme já a partir do CIM, conforme gráficos expressos na Figura 11.

Figura 11 – Efeito da combinação de tirosol e drogas antifúngicas sobre o biofilme formado de *Candida tropicalis* (A), *Candida albicans* (B).



MIC – Concentração inibitória mínima; \* - Diferença significativa com relação ao controle ( $p < 0,0001$ ).

### **8.7 Efeito dos antibióticos vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam e cefepime sobre o biofilme em formação de *Candida* spp.**

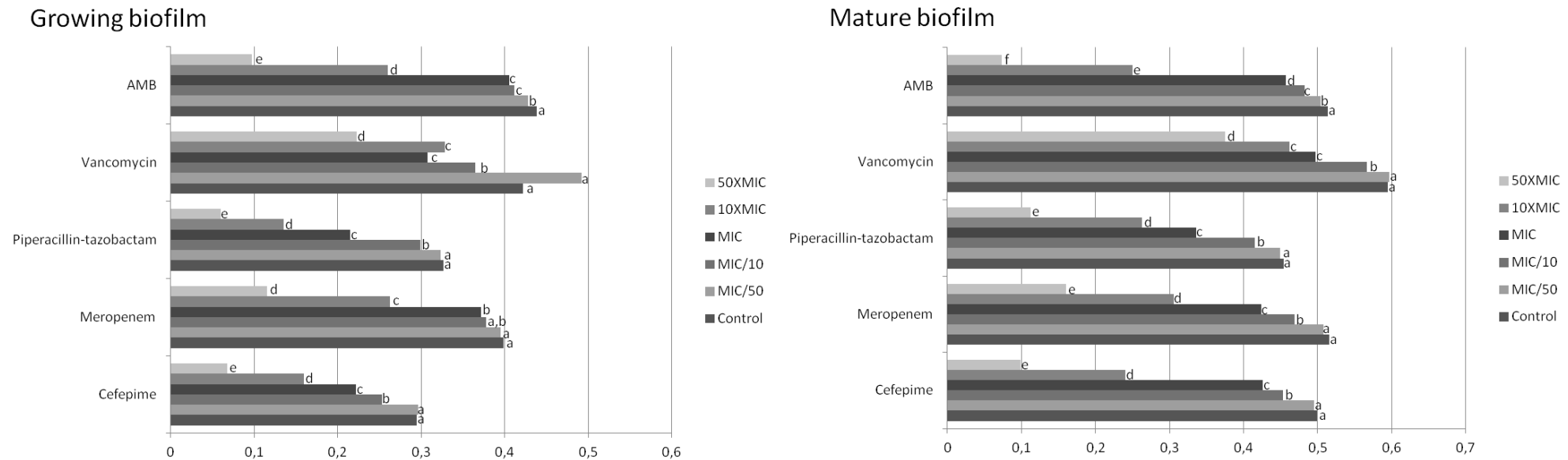
Os antibacterianos vancomicina, piperacilina/tazobactam e cefepime apresentaram efeito estatisticamente significativo sobre o biofilme em formação de *Candida* spp. nas concentrações CIM/10 ( $P < 0,001$ ), CIM ( $P < 0,0001$ ), 10xCIM ( $P < 0,0001$ ) e 50xCIM ( $P < 0,0001$ ), enquanto meropenem só causou reduções significativas a partir de CIM ( $P < 0,0001$ ). AMB inibiu significativamente a atividade celular em crescimento do biofilme em todas as concentrações testadas ( $P < 0,0001$ ), conforme expresso na figura 12.

### **8.8 Efeito dos antibióticos vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam e cefepime sobre o biofilme formado de *Candida* spp.**

Em relação ao efeito dos antibióticos vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam e cefepime sobre o biofilme formado de *Candida* spp., apresentaram reduções estatisticamente significativa na atividade celular nas concentrações CIM/10 ( $P < 0,0001$ ), CIM ( $P < 0,0001$ ), 10xCIM ( $P < 0,0001$ ) e 50xCIM ( $P < 0,0001$ ). Anfotericina B diminuiu significativamente o biofilme formado de *Candida* spp ( $P < 0,0001$ ), conforme na figura 12.



Figura 12: Efeito de diferentes concentrações de cefepime, meropenem, piperacilina-tazobactam e vancomicina sobre biofilme em formação e maduros de *Candida* spp., Analisados por meio de análise de redução do XTT.



MIC: concentração inibitória mínima, para *Candida* spp. Na forma planctônica.

Letras indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle e crescimento em diferentes concentrações antibacterianas ( $P < 0.05$ ).

As concentrações antimicrobianas testadas são apresentadas na seguinte ordem decrescente: 50XMIC, 10XMIC, MIC, MIC/10, MIC/50 e controle.

## 9. DISCUSÃO

Neste estudo investigou-se o efeito da molécula de *quorum sensing* tirosol e das drogas antibacterianas vancomicina, meropenem, cefepime e piperacilina-tazobactam frente *C. albicans* e *C. tropicalis* resistentes a derivados azólicos nas formas planctônica e de biofilme. Inicialmente as cepas foram reavaliadas para certificação da pureza das mesmas e da manutenção do perfil de sensibilidade pré-estocagem. A identificação das cepas de *Candida* spp. foi confirmada pelos caracteres morfofisiológicos. Para as cepas de *C. albicans* foi realizado teste molecular para diferenciá-las da espécie críptica *C. dubliniensis*. Com a reavaliação da sensibilidade antifúngica foi confirmado o fenômeno de resistência a derivados azólicos nestas cepas após a retirada do estoque a -20 °C (MEDRANO, 2004; BRITO, 2005; CASTELO-BRANCO, 2009).

Verificou-se que a molécula de *quorum sensing* tirosol isoladamente inibe o crescimento de *Candida* spp. na forma planctônica. Esta inibição ocorreu nas concentrações de 2,5 a 5,0 mM de tirosol exógeno, valores bem acima do observado em solução no sobrenadante de culturas de células planctônicas. A concentração de tirosol em solução tende ao aumento à medida que a densidade populacional também aumenta, ou seja, com o tempo de cultivo fúngico. Mesmo assim, de acordo com Alem et al. (2006), estes valores apresentam-se, em média, em torno de 11 µM de tirosol endógeno no sobrenadante numa cultura de 48 h, tempo este o determinado para a leitura do teste de sensibilidade antifúngica. Apesar desta concentração ser relativamente alta, quando comparado com o fisiológico em cultivo, a inibição do crescimento de *Candida* spp. pode demonstrar uma toxicidade desta molécula. Visto que mesmo, em espécies com produção significativamente diferentes desta molécula como *C. albicans* e *C. tropicalis* (TUMBARELLO et al., 2007), um padrão semelhante de sensibilidade ao tirosol exógeno foi observado em ambas as espécies.

Vale resaltar que o uso do tirosol potencializou a ação de anfotericina B e derivados azólicos frente *Candida* spp., diminuindo a quantidade necessária de anfotericina B capaz de inibir estas cepas, sendo observado sinergismo em 70% (14/20) das cepas. Quando em associação com derivados azólicos, esta redução foi ainda mais marcante, estando presente em 90% das cepas (18/20). A reversão do fenótipo de resistente para sensível à itraconazol foi observada em 55% (11/20) das cepas, já em conjunto com fluconazol houve reversão do fenótipo em 64,7% (11/17) das cepas. A inibição do crescimento de espécies de *Candida* spp. pelo uso da molécula de *quorum sensing* farnesol já foi demonstrada em estudos prévios, inclusive reduzindo as concentrações inibitórias mínimas de anfotericina B, derivados

azólicos e caspofungina nestas cepas (CORDEIRO et al., 2012) e, embora moléculas como tirosol e farnesol sejam moléculas de auto-regulação em *Candida* spp., elas apresentam diferentes efeitos biológicos e, provavelmente, diferentes receptores na célula fúngica, com atividades opostas quanto à produção de tubo germinativo e filamentação (ALEM et al., 2006).

Quando em altas concentrações, o tirosol inibe a formação de biofilme e reduz também o biofilme formado de *Candida* spp. Foi observado que isoladamente o tirosol exógeno adicionado no tempo zero de formação de biofilme e também quando o biofilme já apresentava-se formado altas concentrações (50xCIM) reduziu significativamente a viabilidade do biofilme. Estudos mostram que moléculas de *quorum sensing* de fungos têm impacto dramático sobre biofilmes de *Candida* spp. (ALEM et al., 2006; ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012) e que duas das principais moléculas de *quorum sensing* possuem atividades antagônicas quanto à morfologia celular (ALEM et al., 2006).

Sabe-se que o farnesol exógeno em estágio muito precoce evita a transição levedura-hifa na formação de biofilme inibe a associação entre células (LINDSAY et al., 2012). De fato, quando biofilmes de *C. albicans* são tratados com 300  $\mu$ M de farnesol, observa-se bloqueio da transição levedura-hifa, necessária à manutenção do biofilme com predomínio de blastoconídios e pseudo-hifas no biofilme (LINDSAY et al., 2012; RAMAGE et al., 2012). Todavia, em elevadas concentrações, o farnesol é capaz de causar morte celular nesta espécie de levedura (SHIRTLIFF et al., 2009), além de outros micro-organismos como *S. cerevisiae* e *Aspergillus nidulans* (ENJALBERT; WHITEWAY, 2005; SEMIGHINI et al., 2006), inclusive demonstrando ação inibitória frente bactérias (BRILHANTE et al., 2012).

O farnesol é uma das mais importantes moléculas de *quorum sensing* em biofilmes, responsável pela regulação da morfologia celular de *Candida* spp., principalmente na dinâmica de dispersão celular para novos ambientes ou sítios de infecção (ALEM et al., 2006). Apesar do tirosol modular a transição de blastoconídios para pseudo-hifas e hifas, principalmente nos estágios iniciais de formação de biofilme, este efeito só está presente quando em baixas concentrações de farnesol, visto que concentrações mais elevadas de farnesol (1 mM) inibem o efeito do tirosol na célula fúngica (ALEM et al., 2006). Assim, acreditamos que, quando o biofilme de *Candida* spp. foi exposto a concentrações elevadas de tirosol exógeno, o composto pode ter, de algum modo, afetado a produção de farnesol, aumentando a concentração desta molécula, impedindo, assim, a formação do biofilme.

Além disso, o presente estudo demonstrou que, quando combinado com antifúngicos, todas as concentrações de tirosol testadas (CIM, 10xCIM e 50xCIM) inibiram a formação do

biofilme. Possivelmente, o efeito modulador do tirosol na transição de blastoconídios para pseudo-hifas e hifas não ocorra de modo satisfatório com alteração de potencial de membrana, quando tratado com anfotericina B, ou quando o metabolismo do ergosterol está alterado, quando tratado com derivados azólicos. Para o biofilme formado, a combinação entre tirosol exógeno e anfotericina B também foi capaz de inibir a viabilidade do biofilme, possivelmente devido a uma adição de efeitos deletérios sobre o crescimento do biofilme. Embora Alem et al. (2006) não tenham detectado qualquer efeito inibitório de tirosol na concentração de 1 mM contra biofilme maduro de *Candida* spp., os resultados aqui apresentados mostram que tirosol, nesta concentração, é capaz de atuar de forma sinérgica com anfotericina B, reduzindo a viabilidade do biofilme cerca de 16 %.

Já a associação de itraconazol ou fluconazol com tirosol estimulou o crescimento do biofilme em altas concentrações (10xCIM e 50xCIM). Nos últimos anos, estudos têm demonstrado a importância das moléculas de *quorum sensing* na regulação de vários processos fisiológicos em *Candida* spp., principalmente das moléculas farnesol e tirosol em *C. albicans* (CORDEIRO et al., 2012; DERENGOWSKI et al., 2009). Em *C. albicans*, a produção de farnesol ocorre fisiologicamente na via de síntese de esteróis pela desfosforilação enzimática de farnesil difosfato. Possivelmente, devido à alteração de esteróis no citosol das células tratadas com derivados azólicos, a produção de farnesol endógeno pode ter sido alterado, não ocorrendo a transição morfológica de hifa ou pseudo-hifa para blastoconídio, aumentando, assim, o número de células retidas no biofilme. Outra hipótese é levantada sugere que o estresse causado pelo uso dos fármacos tenha causado um aumento no metabolismo fúngico e, como a leitura de viabilidade celular foi realizado pelo metabolismo de XTT nestas leveduras, pode ter ocorrido aumento da metabolização do XTT.

A capacidade de *Candida* spp. para formar biofilmes em superfícies abióticas ou bióticas é um importante fator de virulência para o estabelecimento e recorrência de candidíase. Estas espécies podem colonizar dispositivos médicos de longa permanência e desenvolver estruturas de biofilme aderentes a partir do qual novas células podem ser dispersas e causar fungemia aguda e/ou infecção disseminada. Além disso, a formação de biofilmes em dispositivos intravasculares leva a dificuldades no tratamento de infecções na corrente sanguínea. Já é de conhecimento amplo que a utilização de antibióticos com ação sistêmica predispõe o predomínio de *Candida* spp. na microbiota e, como consequência, leva a um aumento na ocorrência de candidíase. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos dos antibióticos na formação e manutenção de biofilmes maduros de *Candida* spp. em

dispositivos médicos, que estão continuamente expostos a drogas antibacterianas quando os pacientes estão em tratamento.

Neste trabalho, verificou-se que drogas antibacterianas comumente usadas no tratamento de infecções ocorridas no ambiente nosocomial inibiram o crescimento planctônico de *C. albicans* e *C. tropicalis* resistentes a derivados azólicos. As drogas cefepime, meropenem, piperacilina-tazobactam e vancomicina inibiram o crescimento de *Candida* spp. na forma planctônicas, com CIMs que variaram de 0,5 a 2 mg/mL. Apesar de todas as drogas antibacterianas testadas serem capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *Candida* spp., os valores de CIM aqui encontrados ultrapassam as concentrações terapêuticas *in vivo* desejáveis no sangue para todas as drogas testadas (BURESS et al., 2002; NICOLAU, 2008; LAMOTH et al., 2010). Por este motivo, esses compostos não podem ser usados para tratar eficazmente infecções por *Candida*.

Por outro lado, os resultados deste estudo demonstram que, em baixas concentrações (CIM/10), os antibacterianos testados reduziram significativamente a atividade metabólica do biofilme em formação e maduro de *Candida* spp. Esta redução metabólica foi acompanhada por redução da massa do biofilme fúngico, utilizando a metodologia por leitura da biomassa fúngica utilizando cristal violeta. Entretanto, estes dados não foram mostrados, visto que os ensaios metabólicos são mais reprodutíveis e confiáveis na avaliação da viabilidade de biofilme de fungos (PEETERS et al., 2008). A redução de viabilidade e da massa celular do biofilme utilizando concentrações de drogas abaixo da CIM observada para a forma planctônica torna-se um achado relevante. Estes resultados podem ter um grande impacto na clínica, uma vez que as drogas cefepime, meropenem, piperacilina-tazobactam e vancomicina são comumente usadas em pacientes com infecções hospitalares (TORRES et al., 2010) e também são usados em terapia antibiótica-lock (MERMEL et al., 2013; FERNÁNDEZ-HIDALGO et al., 2014).

Estes resultados mostram-se promissores, principalmente em casos em que a terapia antibiótica-lock é empregada utilizando os antibióticos testados neste estudo, quando a permanência do cateter se faz necessária, embora a remoção do dispositivo seja o tratamento de escolha para quadro de bacteremia persistente ou grave relacionada com a utilização do dispositivo médico (MERMEL et al., 2009). A terapia antibiótica-lock é uma técnica que envolve a instilação prolongada de uma solução que contém concentrações extremamente elevadas de agente antimicrobiano ou anti-séptico, 100 a 1000 vezes mais elevada do que os utilizados sistemicamente, dentro de um cateter intravascular, como uma tentativa de controlar infecções da circulação sanguínea (KU et al., 2010; FERNÁNDEZ-HIDALGO et

al., 2014; WALRAVEN et al., 2013). É importante ressaltar que o uso de antibióticos sistêmicos de largo espectro é um importante fator de risco para o desenvolvimento de candidemia, principalmente devido à translocação gastrointestinal de micro-organismos e não como uma consequência direta da formação de biofilme de *Candida* dentro de cateteres (KOH, 2013). Estes biofilmes desempenham um papel importante na manutenção de infecções por *Candida* na corrente sanguínea (CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012).

Portanto, considerando as baixas concentrações (50 e 200 µg/mL) necessárias para diminuir significativamente a viabilidade das células de *Candida* em biofilme, acreditamos que o uso da cefepime, meropenem, piperacilina-tazobactam e vancomicina no bloqueio antimicrobiano pode não só ajudar ao paciente no tratamento de infecção bacteriana associada a cateteres permanentes, mas também controlar a formação de biofilmes de *Candida* dentro destes dispositivos médicos durante a terapia anti-bacteriana. São necessários mais estudos para estabelecer os efeitos dessa terapia sobre biofilmes de *Candida* no paciente durante o tratamento.

Dessa forma, o presente estudo mostra que tirosol exógeno sozinho ou combinado com antifúngicos inibe o crescimento de cepas de *Candida* spp., tanto na forma planctônica como na formação de biofilme *in vitro*, e que biofilmes maduros também são inibidos por tirosol isolado ou combinado com a anfotericina B. Todavia a combinação de tirosol e derivados azólicos aumentou a atividade do biofilme por um mecanismo dose dependente. Constatou-se ainda que os antibacterianos cefepime, meropenem, piperacilina-tazobactam e vancomicina de forma isolada inibem o crescimento de *Candida* spp. na forma planctônica, e que, em concentrações abaixo da CIM para a forma planctônica, esses compostos inibem o biofilme maduro e em formação de *Candida*.

## 10. CONCLUSÃO

1. O tirosol exibiu atividade antifúngica, *in vitro*, contra as cepas de *Candida* spp.
2. O efeito inibitório *in vitro* do tirosol frente a *Candida* spp. foi potencializado pela combinação com os derivados azólicos e anfotericina B.
3. O composto tirosol apresentou efeito sobre o biofilme em formação e formado de *Candida* spp.
4. Os antibacterianos vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam e cefepime apresentaram efeito, *in vitro*, frente a cepas de *Candida* spp.
5. Os antibacterianos vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam e cefepime apresentaram efeito estatisticamente significativo sobre o biofilme em formação de *Candida* spp..
6. Os antibacterianos vancomicina, meropenem, piperacilina/tazobactam e cefepime apresentaram efeito estatisticamente significativo sobre o biofilme formado de *Candida* spp..

## REFERÊNCIAS

- ALBY, K.; BENNETT, R. J. Sexual reproduction in the *Candida* clade: cryptic cycles, diverse mechanisms, and alternative functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 19, p. 3275-3285, 2010.
- ALEM, M. A.; OTEEF, M. D.; FLOWERS, T. H.; DOUGLAS, L. J. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 10, p. 1770-1779, 2006.
- ALFONSO, C. A.; LOPEZ, M. B.; ARECHAVALA, A. C.; PERRONE, M. C. D.; GUELFAND, L. E.; BIANCHI, M. Identificación presuntiva de *Candida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance *Candida* Agar. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n.2, p.90-93,2010
- ANTONY, G.; SARALAYA V.; GOPALKRISHNA, K. B.; SHALINI, M. S.; SHIVANANDA P. G. Effect of phenotypic switching on expression of virulence factors by *Candida albicans* causing candidiasis in diabetic patients. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 3, p.202-205, 2009.
- ATIQUÉ, T. S. C. Pesquisa das espécies e sensibilidade antifúngica de *Candida* spp. em indivíduos soropositivos para o HIV. 2006. 175f. Dissertação (Ciências da Saúde)-Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Jose do Rio Preto, 2006.
- ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi: a review. **Medical Mycology**.v. 50, n. 4, p. 337-345, 2012.
- AVRELLA, D.; GOULART, L. S. Isolamento de *Candida* spp. da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. **RBAC**, v. 40, n. 3, p. 205 -207, 2008.
- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. C. Candidíase. **DST - Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. v. 22, p. 22-38, 2010.
- BLANCO, M. T.; SACRISTÁN, B.; LEOPOLDO, L.; BLANCO, J.; PÉREZ-GIRALDO, C.; GÓMEZ-GARCÍA, A. C. Cell surface hydrophobicity as an indicator of other virulence factors in *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 4, p. 195, 2010.
- BORGHI, E.; ANDREONI, S.; CIRASOLA, D.; RICUCCI, V.; SCIOTA, R.; MORACE, G. Antifungal resistance does not necessarily affect *Candida glabrata* fitness. **Journal of Chemotherapy**, v. 26, n. 1, p. 32-36, 2014.
- BONFIETTI, L. X.; SZESZS, M. W.; CHANG, M. R.; MARTINS, M. A.; PUKINSKAS, S. R.; NUNES, M.O.; PEREIRA, G. H.; PANIAGO, A. M.; PURISCO, S. U.; MELHEM, M. S. Ten-year study of species distribution and antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates at a Brazilian tertiary hospital. **Mycopathologia**, v.174, p.389-96.
- BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; JÚNIOR, F. A. S.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Phenotypic



characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 1, p. 147-153, 2007.

BRILHANTE, R. S. N.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; DUARTE, G. P. S.; SOARES, G. P. D.; PAIVA, M. A. N.; TEIXEIRA, C. E. C.; ZEFERINO, J. P. O.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Yeast microbiota of raptors: a possible tool for environmental monitoring. **Environ. Microbiol.** v. 4, n. 2, p. 189-193, 2012.

BUSCHELMAN, B.; JONES, R. N.; PFALLER, M. A.; KOONTZ, F. P.; DOERN, G. V. Colony morphology of *Candida* spp. as a guide to species identification. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 35, p.1, p. 89-91, 1999.

BURESS, D. S.; WALDREP, T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of piperacillin/tazobactam when administered by continuous infusion and intermittent dosing. **Clinical Therapy**, v. 24, n.7, p. 1090-1104, 2002.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, C.; COCCIOLI, C.; CAMARDA, A.; OTRANTO, D. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human diseases. **Medical Mycology**, v. 46, p. 1-6, 2008.

CASTELO-BRANCO, D. S. C. M. Resistência a azólicos em *Candida* spp. de origem veterinária: um fenômeno mediado por bombas de efluxo. 2011. 96f. Tese – Univesirdade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

CATALDO, M. A.; TACCONELLI, E.; GRILLI, E.; PEA, F.; PETROSILLO, N. Continuous versus intermittent infusion of vancomycin for the treatment of Gram-positive infections: systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 17-24, 2012.

CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; McCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A.; Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology** 183(18):5385-5394, 2001.

CHATZIMOSCHOU, A.; KATRAGKOU, S.; SIMITSOPOULOU, M.; ANTACHOPOULOS, C.; GEORGIADOU, E.; WALSH, T. J.; ROILIDES, E. Activities of Triazole-Echinocandin Combinations against *Candida* Species in Biofilms and as Planktonic Cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 1968–1974,2011.

CHAPMAN, S. W.; SULLIVAN, D. C.; CLEARY, J. D. In search of the holy grail of antifungal therapy. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 119, p. 197, 2008.

CHEN, H.; FINK, G. R. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. **Genes & Development**, v. 20, n. 9, p. 1150-1161, 2006.

CHEN, H.; FUJITA, M.; FENG, Q.; CLARDY, J.; FINK, G. R. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 14, p. 5048-5052, 2004.

CHONG, P. P.; HADI, S. R. A.; LEE, Y. L.; PHAN, C. L.; TAN, B. C.; NG, K. P.; SEOW, H. F. Genotyping and drug resistance profile of *Candida* spp. in recurrent and one-off vaginitis, and high association of non-*albicans* species with non-pregnant status. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 4, p. 449-456, 2007.

Clinical Laboratory National Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2008.

COLOMBO, A. L.; JANINI, M.; SALOMÃO, R.; MEDEIROS, E. A. S.; WEY, S. B.; PIGNATARI, A. C. C. Surveillance programs for detection and characterization of emergent pathogens and antimicrobial resistance: results from the Division of Infectious Diseases, UNIFESP. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, p. 571-587, 2009.

COLOMBO, A. L.; CORTES, J. A.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M.; MATUTE, T. A.; TELLES, F. Q.; SANTOLAYA, M. E.; TIRABOSCHI, I. N.; ECHEVARRÍA, J.; SIFUENTES, J.; THOMPSON-MOYA, L.; NUCCI, M. Recommendations for the diagnosis of candidemia in Latin America. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 31, n.3, p.1-7, 2013.

CONDE-ROSA, A.; AMADOR, R.; PEREZ-TORRES, D.; COLÓN, E.; SÁNCHEZ-RIVERA, C.; NIEVES-PLAZA, M.; GONZÁLEZ-RAMOS, M.; BERTRÁN-PASARELL, J. Candidemia distribution, associated risk factors, and attributed mortality at a university-based medical center. **Puerto Rico Health Sciences Journal**. v. 29, n. 1, p. 26, 2010.

CORNISTEIN, W.; MORA, A.; ORELLANA, N.; CAPPARELLI, F. J.; DEL CASTILLO, M. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no *albicans*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 21, n.2, p. 132-135, 2012

COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; KOMESU, M. C.; CANDIDO, R. C. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. **Mycopathologia**, v. 167, n. 2, p.73-79, 2009.

COSTA, C. R.; JESUÍNO, R. S. A.; DE AQUINO LEMOS, J.; FERNANDES, O. D. F. L. E.; SOUZA, L. K. H.; PASSOS, X. S.; SILVA, M. D. R. R. Effects of antifungal agents in sap activity of *Candida albicans* isolates. **Mycopathologia**, v. 169, n. 2, p. 91-98, 2010.

CUÉLLAR-CRUZ, M.; LÓPEZ-ROMERO, E.; VILLAGÓMEZ-CASTRO, J. C.; RUIZ-BACA, E. *Candida* species: new insights into biofilm formation. **Future Microbiol**, v. 7, v. 6, p. 755-771, 2012.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUEIRAS, M. J. *Atlas of Clinical Fungi*. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmiscultures, 2<sup>a</sup> ed. Baarn, 2002.

CORDEIRO, R. A.; TEIXEIRA, C. E. C.; BRILHANTE, R. S. N.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; PAIVA, M. A. N.; LEITE, J. J. G.; LIMA, D. T.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M.F.G. Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol. **Medical Mycology**.v. 51, n. 1, p.53-59, 2013.

DESTIN, K. G.; JENNIFER, R. L.; SONIA, S.; LAFORCE-NESBITT; JOSEPH, M. B. Oxidative burst and phagocytosis of neonatal neutrophils confronting *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. **Early Human Development**, v. 85, n. 8, p. 531-535, 2010.

DERENGOWSKI, L.S., DE-SOUZA-SILVA, C., BRAZ, S.V., MELLO-DE-SOUSA, T.M., BÁO, S.N., KYAW, C.M., AND SILVA-PEREIRA, I. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.** v.29, n.2, p.8-13, 2009.

DHAMMIKA N. H. M. L. P.; HORNBY, J. M.; KRISHNAN, N.; PARKHURST, A.; DUHAMEL, G. E.; NICKERSON, K. W. Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a DPP3 knockout mutant of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 4, p. 1609-1618, 2007.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 160-201, 2010.

EDDOUZI, J.; PARKER, J. E.; VALE-SILVA, L. A.; COSTE, A.; ISCHER, F.; KELLY, S.; SANGIARD, D. Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from Tunisian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p.3182-3193, 2013.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 11, p. 685-702, 2003.

ERASO, E.; MORAGUES, M. D.; VILLAR-VIDAL, M.; SAHAND, I. H.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, N.; PONTÓN, J.; QUINDÓS, G. Evaluation of the new chromogenic medium *Candida* ID 2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3340-3345, 2006.

ESPINEL-INGROFF, A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 1, p. 15-22, 2009.

ESPINEL-INGROFF, A.; JOHNSON, E.; HOCKEY, H.; TROKE, P. Activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B in vitro against 590 moulds from 323 patients in the voriconazole Phase III clinical studies. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 3, p. 616-620, 2007.

ESTIVILL, D.; ARIAS, A.; TORRES-LANA, A.; CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; ARÉVALO, M. P. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, p. 238-242, 2011.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **PLoS Pathogens**, v. 8, n.4, p.100 -135, 2012.

FAROOGI, J.; JABEEN, K.; SAEED, N.; ZAFAR, A.; BRANDT, M. E.; HASAN, R. Species identification of invasive yeasts including *Candida* in Pakistan: limitations of phenotypic methods. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 62, n.10, p.995-998, 2012.

FERRARI, S.; ISCHER, F.; CALABRESE, D.; POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M.; FADDA, G.; ROHDE, B.; BAUSER, C.; BADER, O.; SANGLARD, D. Gain of function mutations in CgPDR1 of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 1, p. 268, 2009.

FERNÁNDEZ-HIDALGO, N.; ALMIRANTE, B. Antibiotic-lock therapy: a clinical viewpoint. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.12, n.1, p. 117-129, 2014.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

FLEVARI, A.; THEODORAKOPOULOU, M.; VELEGRAKI, A.; ARMAGANIDIS, A.; DIMOPOULOS, G. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. **Clinical Interventions in Aging**, v.8, p.1199, 2013.

GARCÍA-SÁNCHEZ, S.; AUBERT, S; IRAQUI, I.; JANBON, G.; GHIGO, J. M.; D'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. **Eukaryotic Cell**. v. 2, p. 536-45, 2004.

GAFTER-GVILI, A.; VIDAL, L.; GOLDBERG, E.; LEIBOVICI, L.; PAUL, M. Treatment of invasive candidal infections: systematic review and meta-analysis. **In Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 9, p. 1011-1021, 2008.

GERONIKAKI, A.; FESATIDOU, M.; KARTSEV, V.; MACAEV, F. Synthesis and biological evaluation of potent antifungal agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n.2, p.312-321, 2013.

GIBBONS, J. G.; BEAUVAIS, A.; BEAU, R.; MCGARY, K. L.; LATGÉ, J. P.; ROKAS, A. Global transcriptome changes underlying colony growth in the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**. v. 11, p. 68-78. 2012.

GRANDESSO, S.; SAPINO, B.; MAZZUCCATO, S.; SOLINAS, M.; BEDIN, M.; D'ANGELO, M.; GION, M. Study on in vitro susceptibility of *Candida* spp. isolated from blood culture. **Le Infezioni in Medicina: Rivista Periodica di Eziologia, Epidemiologia, Diagnostica, Clinica e Terapia Delle Patologie Infettive**, v. 20, n. 1, p. 25, 2012.

GUARRO, J. Comments on recent human infections caused by ascomycetes. **Medical Mycology**, v. 36, n. 5, p. 349-349, 1998.

GUIMARÃES, T.; NUCCI, M.; MENDONÇA, J.; MARTINEZ, R.; BRITO, L. R.; SILVA, N.; MORETTI, M. L.; SALOMÃO, R.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and predictors of a poor outcome in elderly patients with candidemia. **International Journal of Infectious Diseases**, v.16, n. 6, p. 442-447, 2012.

HA, J. F.; ITALIANO, C. M.; HEATH, C. H.; SHIH, S.; REA, S.; WOOD, F. M. Candidemia and invasive candidiasis: a review of the literature for the burns surgeon. **Burns**, v. 37, n.2, p. 181-195, 2011.

HAYASHI, Y.; ROBERTS, J. A.; PATERSON, D. L.; LIPMAN, J. Pharmacokinetic evaluation of piperacillin-tazobactam. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 6, n. 8, p. 1017-1031, 2010.

HILL, J. A.; AMMAR, R.; TORTI, D.; NISLOW, C.; COWEN, L. E. Genetic and genomic architecture of the evolution of resistance to antifungal drug combinations. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 4, p.124-129, 2013.

HORNBY J. M.; JENSEN, E. C.; PAGLIACCETTI, N. E.; WOLTER, C. M.; NICKERSON, K. W.; ATKIN, A. L. Farnesol restores wild-type colony morphology to 96% of *Candida albicans* colony morphology variants recovered following treatment with mutagens. **Genome**, v. 49, n. 4, p. 346-353, 2006.

HORNBY, J. M.; JENSEN, E. C.; LISEC, A. D.; TASTO, J. J.; BRANDON, J.; RICHARD, S.; PATRICK, D.; NICKERSON, K. W. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2982-2992, 2001.

HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K.; RINALDI, M. G. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.48, n. 3, p. 153-160, 2006.

JOHNSON, E. M. Issues in antifungal susceptibility testing. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 1, p. 13-18, 2008.

KAHNE, D.; LEIMKUEHLER, C.; LU, W.; WALSH, C. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 425-448, 2005.

KALKANCI, A.; BERK, E.; AYKAN, B.; CAGLAR, K.; HIZEL, K.; ARMAN, D.; KUSTIMUR, S. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from hospitalized patients. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 17, p. 16-20, 2007.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 120-128, 2008.

KEEÇELI, S. A.; WILLKE, A.; TAMER, G. A.; BORAL, O. B.; SONMEZ, N.; ÇAGATAY, P. Interaction between caspofungin or voriconazole and cefoperazone-sulbactam or piperacillin-tazobactam by *in vitro* and *in vivo* methods. **APMIS**, 2013.

KESSLER, R. E. Cefepime microbiologic profile and update. **The Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 20, n. 3, p. 331-336, 2001.

KLEIN, B. S.; TEBBETS, B. Dimorphism and virulence in fungi. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 314-319, 2007.

KONG, K. F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. **APMIS**, v. 118, n. 1, p. 1-36, 2011.

KOTHAVADE, R. J.; KURA, M. M.; VALAND, A. G.; PANTHAKI, M. H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 873-880, 2010.

KOH, A. Y. Murine Models of *Candida* Gastrointestinal Colonization and Dissemination. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 11, p. 1416–1422, 2013.

KU, T. S. N.; PALANISAMY, S. K. A.; LEE, S. A. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to azithromycin, tigecycline and vancomycin and the interaction between tigecycline and antifungals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. 441-446, 2010.

KUMARI, V.; BANERJEE, T.; KUMAR, P.; PANDEY, S.; TILAK, R. Emergence of *Candida non-albicans* among candidal vulvovaginitis cases and study of their potential virulence factors, from a tertiary care center, North India. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 56, n. 2, p.144, 2013.

KUGLER, S.; TRICIA, S. S.; LINDA, G. E.; WILLIAM, E. G. Phenotypic variation and intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 8794-8, Aug 1 2000.

LAMOTH, F.; BUCLIN, T.; PASCUAL, A.; VORA, S.; BOLAY, S.; DECOSTERD, L. A. High cefepime plasma concentrations and neurological toxicity in febrile neutropenic patients with mild impairment of renal function. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4360–4367, 2010.

LINDSAY, A. K.; DEVEAU, A.; PIISPANEN, A. E.; HOGAN, D. A. Farnesol and cyclic AMP signaling effects on the hypha-to-yeast transition in *Candida albicans*. **Eukaryot. Cell**, v. 11, n. 10, p.1219-1225.

LINDE, J.; WILSON, D.; HUBE, B.; GUTHKE, R. Regulatory network modelling of iron acquisition by a fungal pathogen in contact with epithelial cells. **BMC Systems Biology**, v. 4, n. 1, p. 148, 2010.

LIU, Z.; LI, M.; LU, X.; SHE, X.; HU, S.; CHEN, W.; LIU, W. Higher concentration of CO<sub>2</sub> and 37 °C stabilize the less virulent opaque cell of *Candida albicans*. **Chinese Medical Journal**, v. 23, n. 17, p. 2446, 2010.

LOFFLER, C. A.; MACDOUGALL, C. Update on prevalence and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 5, n. 6, p. 961-981, 2007.

MARAKI, S.; BARBOUNAKIS, E.; CHATZINIKOLAOU, I.; ANATOLIOTAKIS, N.; PLATAKI, M.; TSELENTIS, Y.; SAMONIS, G. Effects of cefepime, cefixime and ceftibuten on murine gut colonization by *Candida albicans*. **Chemotherapy**, v. 44, p. 405-408, 1998.

- MARCOS-ARIAS, C.; ERASO, E.; MADARIAGA, L.; QUINDÓS, G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. **Complementary and Alternative Medicine**. v. 11, p.119, 2011.
- MATTA, D. A.; MELO, A. S.; GUIMARÃES, T.; FRADE, J. P.; LOTT, T. J.; COLOMBO, A. L. Multilocus sequence typing of sequential *Candida albicans* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. **Medical Mycology**, v. 48, n. 5, p. 757-762, 2010.
- MATTOES, H. M.; KUTI, J. L.; DRUSANO, G. L.; NICOLAU, D. P. Optimizing antimicrobial pharmacodynamics: dosage strategies for meropenem. **Clinical Therapeutics**, v. 26, n. 8, p. 1187-1198, 2004.
- MCCORMACK, P. L.; PERRY, C. M. Caspofungin. **Drugs**, v. 65, n.14, p. 2049-2068, 2005.
- MEDRANO, D. J. A.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; RABENHORST, S. H. B.; SIDRIM, J. J. C. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 1, p. 17-20, 2006.
- MERMEL, L. A.; ALLON, M.; BOUZA, E.; CRAVEN, D. E.; FLYNN, P.; O'GRADY, N. P.; Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infect Diseases**, v. 49, p. 1-45, 2009.
- MICELI, M. H.; BERNARDO, S. M.; LEE, S. A. In vitro analyses of the combination of high-dose doxycycline and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 4, p. 326-332, 2009.
- MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **Lancet Infect. Dis.** v.11, n. 2, p. 142-151, 2012.
- MOLEPO, J.; MUSENGE, E. Clade-related phenotypic switching among fluconazole resistant *Candida albicans* isolates. **SADJ: Journal of the South African Dental**, v. 67, n. 7, p. 326-328, 2012.
- MOLERO, G.; DÍEZ-OREJAS, R.; NAVARRO-GARCÍA, F.; *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. **International Microbiology**. v. 1, p. 95-106, 1998.
- MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J. *Candida* biofilm resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 7, p. 301-309, 2004.
- NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **European Journal Clinical Microbiology Infect Disease**, v. 31, n.2, p. 1399-412, 2012.
- NEPPELENBROEK, K. H.; SEÓ, R. S.; URBAN, V. M.; SILVA, S.; DOVIGO, L. N.; JORGE, J. H.; CAMPANHA, N. H. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. **Oral diseases**, v.23, n. 12, p. 123-134, 2013.

NETT, J. E.; SANCHEZ, H.; CAIN, M. T.; ROSS, K. M.; ANDES, D. R. Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. **Eukaryotic Cell**, v. 10, p. 1660-1669, 2011.

NETT, J. E.; MARCHILLO, K.; ANDES, D. R. Modeling of fungal biofilms using a rat central vein catheter. **Methods in Molecular Biology**, v. 845, p. 547-556, 2012.

NICOLAU, D. P. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Meropenem. **Clinical Infect Diseases**, v. 47, n. 1, p. 32-40, 2008.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561-570, 2010.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; TIRABOSCHI, I. N.; CORTES, J.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M.; SANTOLAYA, M. E.; THOMPSON, L.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; ECHEVARRIA, J. I.; COLOMBO, A. A. L. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

ODDS, FRANK C. *Candida and candidosis: a review and bibliography*. Bailliere Tindall, 1988.

ODDS, FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 1, 2003.

OLIVEIRA, N. C. Identificação e caracterização de leveduras isoladas de cavidade oral de pacientes. 2006. 91 f. Dissertação (Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

OZCAN, S. K.; BUDAK, F.; WILLKE, A.; FILIZ, S.; COSTUR, P.; DALCIK, H. Efficacies of caspofungin and a combination of caspofungin and meropenem in the treatment of murine disseminated candidiasis. **APMIS**, v. 114, n. 12, p. 829-836, 2006.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. Vigilância global de In Vitro Atividade de Micafungina contra *Candida*: uma comparação com caspofungina pelos métodos CLSI-recomendados. **Journal of clinical Microbiology**, v. 44, n.10, 3533-3538,2006.

PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; LEE, J. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clinical Infectious Disease**, v. 37, p. 634-643, 2003.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, p. 157–165, 2008.

PEREA, S.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; WICKES, B. L.; KIRKPATRICK, W. R.; DIB, O. P.; BACHMANN, S. P.; KELLER, S. M.; MARTINEZ, M.; PATTERSON, T. F. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human



immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1695-1703, 2001.

PFALLER, M. A.; D. J. DIEKEMA. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, p. 1, p. S3-S13, 2012.

POSTERARO, B.; TUMBARELLO, M.; LA SORDA, M.; SPANU, T.; TRECARCHI, E. M.; DE BERNARDIS, F.; SCOPPETTUOLO, G.; SANGUINETTI, M.; FADDA, G. Azole resistance of *Candida glabrata* in a case of recurrent fungemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 3046-3047, 2006.

PRADO, M. R.; Isolamento de *Microsporum* spp. e *Candida tropicalis* em Cães: um destaque para teste de sensibilidade de *Malassezia pachydermatis* in vitro. 2007. 159f. Tese (Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

PULTZ, N. J.; STIEFEL, U.; GHANNOUM, M.; HELFAND, M. S.; DONSKEY, C. J. Effect of parenteral antibiotic administration on establishment of intestinal colonization by *Candida glabrata* in adult CIME. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 438-440, 2005.

RAMAGE, G.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Techniques for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Methods in Molecular Medicine**, v. 118, p. 71, 2006.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, J.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

REX, J. H.; COOPER, C. R.; MERZ, W. G.; GALGANI, J. N.; ANAISSIE, E. J. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 4, p. 906-909, 1995.

REX, J. H.; WALSH, T. J.; SOBEL, J. D.; FILLER, S. G.; PAPPAS, P. G.; DISMUKES, W. E.; EDWARDS, J. E. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 4, p. 662-678, 2000.

ROMEO, O.; CRISEO, G. Molecular epidemiology of *Candida albicans* and its closely related yeasts *Candida dubliniensis* and *Candida africana*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 212-214, 2009.

SAMONIS, G.; THOMAKOS, N.; LIAKAKOS, T.; MACHERAS, A.; MANDREKAS, D.; KANAVAKI, S.; BAFALOUKOS, D.; MARAKI, S. Effects of cefepime and meropenem on the gastrointestinal colonization of surgical patients by *Candida albicans*. **Chemotherapy**, v. 47, p. 350-353, 2001.

SAMONIS, G.; MARAKI, S.; LEVENTAKOS, K.; SPANAKI, A. M.; KATEIFIDES, 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, 2006a.

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

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

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 2, n. 2, p. 73-85, 2002.

SANGLARD, D.; COSTE, A.; FERRARI, S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 7, p. 1029-1050, 2009.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; GIANNINI, M. M. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

STEINBACH, W. J.; SINGH, N.; MILLER, J. L.; BENJAMIN JR., D. K.; SCHELL, W. A.; HEITMAN, J.; PERFECT, J. R. *In vitro* interactions between antifungals and immunosuppressants against *Aspergillus fumigatus* isolates from transplant and non transplant patients. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 48, 4922-4925, 2004.

SCOTT, L. J.; SIMPSON, D. Voriconazole. **Drugs**, v. 67, n. 2, p.269-298, 2007.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. cap. 25, p. 266-267, 2004.

SIDRIM, J.J.C.; MAIA, D.C.B.S.C.; BRILHANTE, R.S.N.; SOARES, G.D.P.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; ROCHA, M.F.G.. *Candida* species isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): In vitro antifungal susceptibility profile and phospholipase activity. **Veterinary Microbiology**, v. 145, p. 324-328, 2010.

SILVA, E. H. Candiduria em Hospital Público Infantil de São Paulo, Brasil: identificação de leveduras, fatores relacionados a virulência, biotipagem "killer" e sensibilidade aos antifúngicos. 2005. 112f. Dissertação (Microbiologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SILVA, C. M. S. Efeito do farnesol, uma molécula do Quorum Sensing de *Candida albicans*, em diferentes isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*. 2009. 97f. Dissertação (Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

SPRAGUE, GEORGE F.; WINANS STEPHEN C. Eukaryotes learn how to count: quorum sensing by yeast. **Genes & Development**, v. 20, n. 9, p. 1045-1049, 2006.

- SUN, F.; QU, F.; LING, Y.; MAO, P.; XIA, P.; CHEN, H.; ZHOU, D. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. **Future Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 877-886, 2013.
- TAFF, H. T.; MITCHELL, K. F.; EDWARD, J. A.; ANDES, D. R. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1325-1337, 2013.
- TAMURA, K.; URABE, A.; YOSHIDA, M.; KANAMARU, A.; KODERA, Y.; OKAMOTO, S.; MASAOKA, T. Efficacy and safety of micafungin, an echinocandin antifungal agent, on invasive fungal infections in patients with hematological disorders. **Leukemia & Lymphoma**, v. 50, n. 1, p. 92-100, 2009.
- TORRES, H. A.; HACHEM, R. Y.; CHEMALY, R. F.; KONTOYIANNIS, D. P.; RAAD, I. I. Posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p.775-785, 2005.
- TORRES-LANA A., ESTIVILL, D.; ARIAS, A.; CARRILO-MUÑOZ, A. J.; ARÉVALO, M. P.; Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. **Journal of Microbiological Methods**, v.81, p.238-242, 2011.
- TSUN SHENG, N.; KUA, B.; SURESH, K. A.; PALANISAMYA, B.; SAMUEL, A. L.; Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to azithromycin, tigecycline and vancomycin and the interaction between tigecycline and antifungals. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.36,p.441-446,2010.
- TUMBARELLO, M.; POSTERARO, B.; TRECARICHI, E. M. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. **Journal Clinical Microbiology**. v.45, p. 1843–1850, 2007.
- ULLMANN, A. J. Review of the safety, tolerability, and drug interactions of the new antifungal agents caspofungin and voriconazole. **Current Medical Research and Opinion**, v. 19, n. 4, p. 263-271, 2003.
- USER, J.; BARKER, K. S.; LIU, T. T.; BLAß-WARMUTH, J.; HOMAYOUNI, R.; ROGERS, P. D. The transcription factor Mrr1p controls expression of the *MDR1* efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 11, p. 164, 2007.
- WALRAVEN, C. J.; LEE, S. A. Antifungal Lock Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 1-8, 2013.
- WESTBLADE, L. F.; JENNEMANN, R.; BRANDA, J. A.; BYTHROW, M.; FERRARO, M. J.; GARNER, O. B.; BURNHAM, C. A. D. Multicenter study evaluating the Vitek MS System for identification of medically important yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 2267-2272, 2013.
- WESTWATER, C.; BALISH, E.; SCHOFIELD, D. A. *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. **Eukaryotic Cell**. v. 4, n. 10, p.1654-1661, 2005.

WILLE, M. P.; GUIMARÃES, T.; FURTADO, G. H. C.; COLOMBO, A. L. Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. **Memorial Instituto Oswaldo Cru**, v. 108, n. 3, p. 288-292, 2013.

YOUNGSAYE, W.; HARTLAND, C. L.; MORGAN, B. J.; TING, A.; NAG, P. P.; VINCENT, B.; MUNOZ, B. ML212: A small-molecule probe for investigating fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans*. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 9, n.1, p.1501-1507, 2013.

YU, L.H., WEI, X., MA, M., CHEN, X.J., AND XU, S.B. Possible inhibitory molecular mechanism of farnesol on the development of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilm. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 56, n.2, p. 770-775, 2012.

ZHANEL, G. G.; WIEBE, R.; DILAY, L.; THOMSON, K.; RUBINSTEIN, E.; HOBAN, D. J.; NOREDDIN, A. M.; KARLOWSKY, J. A. Comparative reviews of the carbapenems. **Drugs**, v. 67, n. 7. P. 1027-1052, 2007.

ZHANG, L.; YANG, H. F.; LIU, Y. Y.; XU, X. H.; YE, Y.; LI, J. B. Reduced susceptibility of *Candida albicans* clinical isolates to azoles and detection of mutations in the *ERG11* gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, in press, 2013.

ZHU, C. X.; GAO, P. H.; JIANG, Y. Y. Advances in the study of *Candida albicans* gene mutation on azole drug resistance. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 45, n. 7, p.821-829, 2010.

## **APÊNDICE**

**APÊNDICE A****ARTIGO RESUBMETIDO – 2ª VERSÃO****FEMS Yeast Research****Exogenous tyrosol inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* species and enhances their susceptibility to antifungals**

Rossana de A. Cordeiro<sup>1#</sup>, Carlos E. C. Teixeira<sup>1</sup>, Raimunda S.N. Brilhante<sup>1</sup>, Débora S. C. M. Castelo-Branco<sup>1</sup>, Lucas P. Alencar<sup>1,2</sup>, Jonathas S. de Oliveira<sup>1</sup>, André J. Monteiro<sup>3</sup>, Tereza J.P.G. Bandeira<sup>1</sup>, José J.C. Sidrim<sup>1</sup>, José Luciano Bezerra Moreira<sup>1</sup>, Marcos F.G. Rocha<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology and Legal Medicine, College of Medicine, Post Graduate Program in Medical Microbiology, Specialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Post Graduate Program in Veterinary Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Statistics and Applied Mathematics, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

**Running title: Exogenous tyrosol affects cells and *Candida* biofilms**

#Corresponding author: E-mail: rossanacordeiro@ufc.br; Phone: +55 85 33668594

**ABSTRACT**

Tyrosol is a quorum sensing molecule of *C. albicans* able to induce hyphal development in the early and intermediate stages of biofilm growth. In the present study we evaluated the effect of high concentrations of exogenous tyrosol on planktonic cells and biofilms of *C. albicans* (n=10) and *C. tropicalis* (n=10), and investigate whether tyrosol could be synergic to antifungals that target cellular ergosterol. Antifungal susceptibility and drug interaction against planktonic cells were investigated by the broth microdilution method. Tyrosol was able to inhibit planktonic cells, with MIC values ranging from 2.5 to 5.0 mM for both species. Synergism was observed between tyrosol/amphotericin B (11/20 strains), tyrosol/itraconazole (18/20 strains) and tyrosol/fluconazole (18/20 strains). Exogenous tyrosol alone or combined with antifungals at both 10xMIC and 50xMIC were able to reduce biofilm of both *Candida* species. Mature biofilms were susceptible to tyrosol alone at 50xMIC or combined with amphotericin at both 10xMIC and 50xMIC. On the other hand, tyrosol plus azoles at both 10xMIC and 50xMIC enhanced biofilm growth.

**APÊDICE B****ARTIGO RESUBMETIDO - 2ª VERSÃO****International Journal of Antimicrobial Agents - Short Communication****Beta-lactam antibiotics and vancomycin inhibit the growth of planktonic and biofilm*****Candida* species: An additional benefit of antibiotic-lock therapy?**

José J.C. Sidrim<sup>1</sup>, Carlos E. C. Teixeira<sup>1</sup>, Rossana de A. Cordeiro<sup>1</sup>, Raimunda S.N. Brilhante<sup>1\*</sup>, Débora S. C. M. Castelo-Branco<sup>1</sup>, Silviane P. Bandeira<sup>1</sup>, Lucas P. Alencar<sup>1</sup>, Jonathas S. Oliveira<sup>1</sup>, André J. Monteiro<sup>3</sup>, José L. B. Moreira<sup>4</sup>, Tereza J.P.G. Bandeira<sup>1</sup>, ,  
Marcos F.G. Rocha<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology and Legal Medicine, College of Medicine, Post Graduate Program in Medical Microbiology, Specialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Post Graduate Program in Veterinary Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Statistics and Applied Mathematics, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Pathology and Legal Medicine, College of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

\*Address for Correspondence: Raimunda Samia N. Brilhante. Rua Barão de Canindé, 210; Montese. CEP: 60.425-540. Fortaleza, CE, Brazil. Fax: 55 (85) 3295-1736 E. mail: [brilhante@ufc.br](mailto:brilhante@ufc.br)



## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of cefepime, meropenem, piperacillin-tazobactam and vancomycin on strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in planktonic and biofilm forms. Twenty azole derivative resistant strains of *Candida albicans* (10) and *C. tropicalis* (10) were tested. The susceptibility of planktonic *Candida* spp. to the antibacterial agents was investigated by broth microdilution. To evaluate the viability of growing and mature biofilms after exposure to these drugs, the reduction assay of XTT – 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (Sigma, Germany) – was performed. The MICs ranged from 0.5 to 2 mg/mL for cefepime, piperacillin-tazobactam and vancomycin and from 0.5 to 1 mg/mL for meropenem and the drugs also caused statistically significant reductions in biofilm cellular activity, both in growing and matures ones. Since all of the tested drugs are commonly used in patients with hospital-acquired infections and in those with catheter-related infections, under antibiotic-lock therapy, it may be possible to obtain an additional benefit with antibiotic-lock therapy with these drugs, namely the control of *Candida* biofilm formation.

Keywords: *Candida* sp, biofilms, catheter infection, antibiotic-lock therapy