UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Produção de biofilme e perfil de suscetibilidade a antifúngicos de isolados de *Candida* spp. em episódios de candidemia no Hospital das Clínicas da FMRP-USP

Bárbara Cardoso

Ribeirão preto

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Produção de biofilme e perfil de suscetibilidade a antifúngicos de isolados de *Candida* spp. em episódios de candidemia no Hospital das Clínicas da FMRP-USP

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Bárbara Cardoso

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Eliana da Silva Ferreira

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 14/06/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Cardoso, Bárbara

Produção de biofilme e perfil de suscetibilidade a antifúngicos de isolados de *Candida* spp. em episódios de candidemia no Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Ribeirão Preto, 2017.

97 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Versão corrigida.

Orientadora: Ferreira, Márcia Eliana da Silva

1. *Candida* spp. 2. Biofilme. 3. Suscetibilidade aos antifúngicos. 4. Candidemia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CARDOSO, B. Produção de biofilme e perfil de suscetibilidade a antifúngicos de isolados de *Candida* spp. em episódios de candidemia no Hospital das Clínicas da FMRP-USP. 2017. 97F. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Eliana da Silva Ferreira

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Osvaldo e Andréia, pelo apoio incondicional, incentivo, paciência e amor.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Márcia Eliana da Silva Ferreira, pela oportunidade, pela confiança e pelos ensinamentos.

À colega e companheira de laboratório Heliara Maria Spina Canela, pelo auxílio inestimável em todas as etapas desse projeto.

Aos colegas de laboratório Luciano Akira Takami e Thaysa Ciofi, pela ótima convivência, pela ajuda durante a realização do trabalho, e por compartilhar momentos de alegria.

Ao Prof. Dr. Roberto Martinez e à farmacêutica Lucia Helena Vitali, pela colaboração e cessão dos isolados clínicos.

Aos professores Kamilla Swiech Antonietto e Márcia Regina Von Zeska Kress, pela disponibilização de equipamentos e laboratório.

Ao aluno Mario Henrique Paziani, pela ajuda na realização dos testes de virulência e auxílio durante etapas do trabalho.

À FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro (2014/10628-0) e pela bolsa de mestrado concedida (2014/25348-2).

À CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de mestrado concedida no início do projeto.

Ao laboratório multiusuário de microscopia eletrônica da FMRP, pelo trabalho.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Aos meus irmãos, Rafael e Luis Fernando, e a todos os familiares, pela torcida e carinho.

Ao Rafael, pelo companheirismo e pela ajuda.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

“Nada é tão nosso quanto os nossos sonhos.”

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

CARDOSO, B. **Produção de biofilme e perfil de suscetibilidade a antifúngicos de isolados de *Candida* spp. em episódios de candidemia no Hospital das Clínicas da FMRP-USP.** 2017. 97F. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Candida spp. constitui o grupo mais importante de fungos patogênicos oportunistas, que está associado a elevadas taxas de mortalidade. As principais espécies causadoras de infecções sanguíneas são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Conhecer a distribuição das espécies e padrões de suscetibilidade aos antifúngicos é fundamental para o estabelecimento de medidas de controle da candidemia. A patogenidade dessas leveduras depende de alguns fatores de virulência como a capacidade de escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro e a capacidade de formação de biofilme. Biofilmes são comunidades microbianas organizadas aderidas a uma superfície sólida, biótica ou abiótica, e envolvidas por uma matriz polissacarídica extracelular. Eles podem apresentar resistência a antimicrobianos e ser fontes de infecções crônicas e persistentes, e a sua relação fungo-hospedeiro é pouco conhecida. O objetivo desse estudo foi avaliar o impacto da formação de biofilme sobre o perfil de suscetibilidade a antifúngicos, de espécies de *Candida* isoladas em episódios de candidemia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Foram isoladas 70 amostras de *Candida* spp. através de hemoculturas, e características dos pacientes foram avaliadas, através da análise dos prontuários médicos. A espécie mais prevalente foi *C. albicans*, seguida por *C. parapsilosis* (*sensu latu*), *C. glabrata* e *C. tropicalis* a menos frequente. A Concentração Inibitória Mínima dos antifúngicos anfotericina B (AMB), caspofungina (CAS), fluconazol (FLC) e voriconazol (VOR) foi determinada em células planctônicas dos 70 isolados de *Candida* spp., de acordo com as diretrizes do CLSI. Dentre os isolados, um de *C. albicans* foi resistente ao FLC e VOR; todos os isolados de *C. glabrata* e um isolado de *C. parapsilosis* foram suscetíveis dose dependente ao FLC, dois isolados de *C. glabrata* foram suscetíveis dose dependente à CAS e um isolado de *C. tropicalis* foi suscetível dose dependente ao VOR. A capacidade de formação de biofilme pelos isolados foi analisada, e de acordo com a atividade metabólica, todos os isolados de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* foram capazes de formar biofilme em placas de poliestireno, em 24 horas, e 50% dos isolados de *C. parapsilosis* não foram capazes de formar biofilme. Biofilmes de cada espécie foram visualizados por microscopia eletrônica de varredura, e demonstraram diferenças estruturais de acordo com cada espécie. A Concentração Erradicatória Mínima dos antifúngicos aos biofilmes de todos os isolados foi determinada. AMB e CAS mostraram atividade contra biofilmes de *Candida* spp., contudo, biofilmes de certos isolados requereram concentrações maiores que as necessárias para inibir o crescimento de células planctônicas; FLC e VOR, no geral, não possuem ação eficaz contra biofilmes de *Candida* spp.. Quando isolados de *C. albicans*, com diferentes perfis de formação de biofilme, foram avaliados quanto a sua virulência *in vivo* no hospedeiro invertebrado *Galleria mellonella*, foi observada uma tendência de maior virulência no grupo de isolados previamente classificados com alta formação de biofilme. Os resultados obtidos refletem a influência

da formação de biofilme na suscetibilidade dos isolados clínicos aos antifúngicos comumente utilizados na prática médica.

Palavras-chave: 1. *Candida* spp. 2. Biofilme. 3. Suscetibilidade aos antifúngicos. 4. Candidemia.

ABSTRACT

CARDOSO, B. **Biofilm production and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. isolates from candidemia episodes from the Hospital das Clínicas da FMRP-USP.** 2017. 97F. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Candida spp. is part of the most important group of opportunistic pathogenic fungi, which is associated with high mortality rates. The main species causing bloodstream infections are: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*. The knowledge about these species' distribution and their antifungal susceptibility profiles is essential to establish measures to control candidemia. The pathogenesis of these yeasts depends on some virulence factors, such as their ability to escape host defense and their capacity of forming biofilm. Biofilms are organized microbial communities adhered to a biotic or abiotic solid surface and surrounded by an extracellular matrix; they can be resistant to antimicrobial agents and the source of chronic and persistent infections, and its fungal-host relationship is still little known. The aim of this study was to evaluate the impact of biofilm formation on antifungal susceptibility profile of *Candida* species isolated from candidemia episodes at the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A total of 70 *Candida* spp. samples were isolated through blood culture, and the patients' characteristics were evaluated through the analysis of their medical records. The most isolated species was *C. albicans*, followed by *C. parapsilosis* (*sensu lato*), *C. glabrata*, and *C. tropicalis* the least frequent. The Minimal Inhibitory Concentration for the antifungal agents amphotericin B (AMB), caspofungin (CAS), fluconazole (FLC) and voriconazole (VOR) were determined in planktonic cells for the 70 *Candida* spp. isolates, following CLSI guidelines. Among the isolates, one *C. albicans* isolate was resistant to FLC and VOR; all the *C. glabrata* and one *C. parapsilosis* isolates were susceptible dose dependent to FLC; two *C. glabrata* isolates were susceptible dose dependent to CAS, and one *C. tropicalis* isolate was susceptible dose dependent to VOR. The isolates' ability to form biofilm was analyzed and according to the metabolic activity, all the *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis* isolates were able to form biofilm in polystyrene plates, in 24 hours, and 50% of the *C. parapsilosis* isolates were not able to form biofilm. Biofilms of each species were visualized through scanning electron microscopy and structural differences were seen according to each species. The Minimal Eradication Concentrations of the antifungal to the biofilms were determined. AMB and CAS showed activity against *Candida* spp. biofilms, however, some isolates needed concentrations much higher than the used to inhibit planktonic growth; FLC and VOR in general were not efficient against *Candida* spp. biofilms. When *C. albicans* isolates, which showed different biofilm formation profiles, were tested about their *in vivo* virulence using the invertebrate host *Galleria mellonella*, it was possible to observe a propensity of the high biofilm formers isolates to be more virulent. The results reflect the effect of biofilms on clinical isolates susceptibility to antifungal drugs commonly used during medical practice.

Keywords: 1. *Candida* spp. 2. Biofilm. 3. Antifungal susceptibility. 4. Candidemia.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
ATCC	“American Type Culture Collection”
CAS	Caspofungina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CEM	Concentração Erradicatória Mínima
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
CV	Cristal violeta
DO	Densidade Óptica
FLC	Fluconazol
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
MOPS	“3-(N-morpholino) propanesulfonic acid”
PBS	“Phosphate Buffered Saline”
UFC	Unidades formadoras de colônia
USP	Universidade de São Paulo
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VOR	Voriconazol
XTT	“(2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide”
YPD	“Yeast Peptone Dextrose”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas de formação de biofilme de <i>C. albicans</i>	9
Figura 2 - Distribuição das espécies de <i>Candida</i> isoladas de hemoculturas.	24
Figura 3 - Valores médios da CIM dos antifúngicos frente aos isolados de <i>Candida</i> spp.....	28
Figura 4 - Formação de biofilme por <i>Candida</i> spp., de acordo com a atividade metabólica, utilizando XTT (490nm).	29
Figura 5 - Formação de biofilme por <i>Candida</i> spp., de acordo com a biomassa, utilizando CV (570nm).....	30
Figura 6 - Valores médios de absorbância, que representam: (a) a atividade metabólica (490nm); (b) a biomassa (570nm); (c) atividade metabólica e biomassa, dos biofilmes dos 31 isolados de <i>C. albicans</i>	31
Figura 7 - Valores médios de absorbância, que representam: (a) a atividade metabólica (490nm); (b) a biomassa (570nm); (c) atividade metabólica e biomassa, dos biofilmes dos 13 isolados de <i>C. glabrata</i>	33
Figura 8 - Valores médios de absorbância, que representam: (a) a atividade metabólica (490nm); (b) a biomassa (570nm); (c) atividade metabólica e biomassa, dos biofilmes dos 14 isolados do complexo <i>C. parapsilosis</i>	34
Figura 9 - Valores médios de absorbância, que representam: (a) a atividade metabólica (490nm); (b) a biomassa (570nm); (c) atividade metabólica e biomassa, dos biofilmes dos 12 isolados de <i>C. tropicalis</i>	35
Figura 10 - Biofilmes maduros de isolados clínicos de <i>C. albicans</i>	36
Figura 11 – Biofilmes maduros de isolados clínicos de <i>C. glabrata</i>	37
Figura 12 - Biofilmes de maduros de isolados clínicos <i>C. parapsilosis sensu strito</i>	38
Figura 13 - Biofilmes maduros de isolados clínicos de <i>C. tropicalis</i>	39
Figura 14 - Valores das CEMs de AMB para biofilmes dos isolados de <i>C. albicans</i>	41
Figura 15 - Valores das CEMs de CAS para biofilmes dos isolados de <i>C. albicans</i>	41
Figura 16 - Valores das CEMs de FLC para biofilmes dos isolados de <i>C. albicans</i>	42
Figura 17 - Valores das CEMs de VOR para biofilmes dos isolados de <i>C. albicans</i>	43
Figura 18 - Valores das CEMs de AMB para biofilmes dos isolados de <i>C. glabrata</i>	44

Figura 19 - Valores das CEMs de CAS para biofilmes dos isolados de <i>C. glabrata</i>	44
Figura 20 - Valores das CEMs de FLC para biofilmes dos isolados de <i>C. glabrata</i>	45
Figura 21 - Valores de CEM de VOR para biofilmes dos isolados de <i>C. glabrata</i>	46
Figura 22 - Valores das CEMs de AMB para biofilmes de isolados do complexo <i>C. parapsilosis</i>	47
Figura 23 - Valores das CEMs de CAS para biofilmes dos isolados do complexo <i>C. parapsilosis</i>	47
Figura 24 - Valores das CEMs de FLC para biofilmes dos isolados do complexo <i>C. parapsilosis</i>	48
Figura 25 - Valores das CEMs de VOR para biofilmes dos isolados do complexo <i>C. parapsilosis</i>	49
Figura 26 - Valores das CEMs de AMB para biofilmes dos isolados de <i>C. tropicalis</i>	50
Figura 27 - Valores das CEMs de CAS para biofilmes dos isolados de <i>C. tropicalis</i>	50
Figura 28 - Valores das CEMs de FLC para biofilmes dos isolados de <i>C. tropicalis</i>	51
Figura 29 - Valores das CEMs de VOR para biofilmes dos isolados de <i>C. tropicalis</i>	52
Figura 30 - Diferenças macroscópicas entre os grupos controle e infectado.	53
Figura 31 - Curva de sobrevivência larval frente a isolados de <i>C. albicans</i>	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos pacientes acometidos por candidemia.	25
Tabela 2 - Valores dos intervalos das CIMs para células planctônicas.	27
Tabela 3 - Valores dos intervalos das CEMs para biofilmes produzidos pelos 63 isolados clínicos de <i>Candida</i> spp.	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Valores dos pontos de corte utilizados para classificação da suscetibilidade dos isolados de <i>Candida</i> spp. aos antifúngicos AMB, CAS, FLC e VOR	32
--	----

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE QUADROS	viii
1 Introdução	2
1.1 Infecções fúngicas	2
1.2 O gênero <i>Candida</i>	2
1.3 Epidemiologia	4
1.4 Biofilmes	8
1.5 Testes <i>in vivo</i>	10
2 Objetivos	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 Material e métodos	15
3.1 Isolamento e identificação das espécies de <i>Candida</i>	15
3.2 Análise dos prontuários médicos.....	15
3.3 Testes de suscetibilidade em células planctônicas	16
3.4 Testes de formação de biofilme	18
3.5 Visualização de biofilmes por microscopia eletrônica de varredura	19
3.6 Testes de suscetibilidade em biofilmes	20
3.7 Testes de virulência, <i>in vivo</i> , em modelo experimental alternativo	20
3.8 Análise estatística	21
3.9 Ética.....	21
4 Resultados	24
4.1 Isolamento e identificação.....	24
4.2 Análise dos prontuários médicos.....	25
4.3 Testes de suscetibilidade em células planctônicas	26

4.4	Testes de formação de biofilme	28
4.5	Visualização de biofilmes por microscopia eletrônica de varredura	35
4.6	Testes de suscetibilidade em biofilme	39
4.7	Testes de virulência, <i>in vivo</i> , em modelo experimental alternativo	52
5	Discussão	56
6	Conclusão	66
	Referências bibliográficas	68
	Apêndices	74
	Anexos	81

INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Infecções fúngicas

Os fungos vêm emergindo como os principais causadores de doenças em seres humanos. Eles atuam principalmente como micro-organismos oportunistas, causando doenças em indivíduos imunocomprometidos, hospitalizados e com doenças de base. As infecções fúngicas representam um problema crescente em saúde pública, já que os avanços na medicina prolongam a vida de pacientes com doenças graves, que são alvos dessas infecções (PIERCE et al., 2008; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

Entre os principais fungos causadores de micoses oportunistas estão dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*. As micoses oportunistas atingem indivíduos de ambos os sexos e de todas as faixas etárias. As infecções invasivas causadas por fungos oportunistas têm se tornado mais frequentes nas últimas décadas, e alguns fatores tornam os indivíduos mais suscetíveis a esse tipo de infecção, como pacientes submetidos a transplantes, pacientes submetidos a cirurgias de grande porte, portadores de doenças neoplásicas, indivíduos com AIDS, pacientes sob quimioterapia, crianças prematuras e idosos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; SILVA et al., 2012).

As infecções fúngicas sistêmicas apresentam crescente prevalência e incidência e afetam milhões de pacientes anualmente, resultando em, aproximadamente, 1.350.000 mortes (SARDI et al., 2013; PERLIN; SHOR; ZHAO, 2015).

1.2 O gênero *Candida*

Pertencentes à classe dos hemiascomicetos, todas as espécies de *Candida* são leveduras de formato oval, que produzem brotamentos, com características semelhantes aos ascomicetos e basidiomicetos, sendo que algumas espécies produzem pseudo-hifas e hifas. *Candida* spp. pode ser encontrada colonizando o homem e outros animais de sangue quente, principalmente no trato gastrointestinal, e em outros locais como pele, unhas, vagina e uretra. As fontes de infecções causadas por *Candida* spp. podem ser endógenas, provenientes da microbiota do hospedeiro,

ou exógenas, provenientes de profissionais de saúde, paciente para paciente, ou materiais contaminados (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010; NEPPELENBROEK et al., 2013).

O gênero *Candida* compreende espécies que estão entre os mais importantes fungos oportunistas, sendo uma das principais causas de infecções sanguíneas nosocomiais, chegando a ser a quarta maior causa de infecções sanguíneas. Em ambiente hospitalar, as infecções causadas por *Candida* spp. representam 80% das infecções fúngicas, as quais incluem infecções do trato urinário, infecções pós-cirúrgicas e as infecções no sistema circulatório (COLOMBO et al., 2013; EL-AZIZI; FARAG; KHardORI, 2015). *Candida* spp. possui alta capacidade de se adaptar à vários ambientes e invadir diferentes tecidos, resultando em sepse (RODRIGUES et al., 2016).

Diversas espécies de *Candida* já foram descritas, e mais de 17 já foram associadas a infecções em humanos. Diversas espécies desse gênero são leveduras comensais em organismos saudáveis, que podem causar infecções superficiais e sistêmicas quando em ambiente favorável. Essas leveduras deixam de ser comensais e se tornam patogênicas quando há comprometimento no sistema imunológico do hospedeiro, quando são feitos procedimentos médicos invasivos ou quando as barreiras anatômicas são comprometidas. Dentre as espécies capazes de provocar doenças em humanos, as mais frequentes causadoras de infecções sanguíneas são: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (COLOMBO et al., 2013; SARDI et al., 2013; PRESS; SHIELDS; CLANCY, 2014).

A patogenicidade de *Candida* spp. é atribuída a alguns fatores de virulência, tais como a capacidade de escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro, a produção de enzimas hidrolíticas que destroem os tecidos do hospedeiro, e a capacidade de aderência e formação de biofilmes, que podem se desenvolver nos tecidos do hospedeiro ou nos dispositivos médicos (SARDI et al., 2013).

As terapias medicamentosas utilizadas para o tratamento de infecções sistêmicas causadas por *Candida* spp. consistem em antifúngicos de três classes: poliênicos, triazóis e equinocandinas. Os poliênicos, representados pela anfotericina B, agem no componente esteroide da membrana celular, levando à ruptura da célula

fúngica. A anfotericina B apresenta atividade fungicida e é ativa contra diversas espécies de *Candida*. Os triazóis, representados pelo fluconazol e pelo voriconazol, possuem amplo espectro de ação e agem inibindo a produção de ergosterol na membrana celular. O voriconazol tem espectro de ação mais amplo que o fluconazol e é ativo contra espécies de *Candida* como *C. glabrata*, que possui menor suscetibilidade ao fluconazol. As equinocandinas são uma nova classe de antifúngicos de uso parenteral, as quais interferem na produção de β -glucana, polissacarídeo essencial das paredes celulares. São representadas pela caspofungina, que possui baixa toxicidade e tem mostrado sucesso terapêutico (COLOMBO et al., 2013).

1.3 Epidemiologia

Nas últimas duas décadas, diversos fatores têm alterado a epidemiologia das infecções fúngicas sistêmicas. O aumento na incidência e prevalência de leveduras do gênero *Candida* como patógeno nosocomial está associada a determinados procedimentos médicos como quimioterapia, uso de antibióticos de amplo espectro, tratamentos com imunossupressores, uso de implantes médicos e tratamentos hospitalares intensivos e prolongados, os quais tornam os pacientes alvos de infecções oportunistas. O aumento na incidência de *Candida* spp. causando infecções sanguíneas tem sido relatado em diversas partes do mundo, tais como Estados Unidos (EUA), Europa e Ásia (SARDI et al., 2013; EL-AZIZI; FARAG; KHARDORI, 2015).

A candidemia é definida como infecção da corrente sanguínea causada por *Candida* spp. e é a forma de candidíase invasiva mais comum, sendo, na maioria das vezes, oriunda de ambiente hospitalar (GIRI; KINDO, 2012; DE ALMEIDA et al., 2014; QUINDÓS, 2014). Em hospitais públicos terciários no Brasil, a cada 1000 admissões, ocorrem de 1,38 a 2,5 casos de candidemia. Essas taxas são semelhantes às de países vizinhos ao Brasil e geralmente maiores que as de países norte-americanos e europeus (COLOMBO et al., 2013; NUCCI et al., 2013).

As infecções nosocomiais constituem um problema de saúde pública, sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade, além de levar ao aumento do tempo de hospitalização dos pacientes e dos custos dos tratamentos. Um dos principais tipos de

infecções nosocomiais é a infecção sanguínea associada a cateter, e espécies do gênero *Candida* estão entre os principais micro-organismos relacionados a esse tipo de infecção (BETTIO, 2010; AKBARI; KJELLERUP, 2015).

A frequência com que as espécies de *Candida* são isoladas de infecções sanguíneas varia de acordo com alguns fatores como região, ambiente, idade dos pacientes e diferenças nas práticas de controle de infecções (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010). Sendo assim, o conhecimento da epidemiologia local da candidemia é fundamental para direcionar as escolhas terapêuticas e o controle de infecções hospitalares. *C. albicans* é a espécie predominante no mundo todo; contudo, estudos mostram que nas últimas décadas, a frequência de isolamento de outras espécies de *Candida* aumentou consideravelmente (BARCHIESI et al., 2015). O aumento do uso de fluconazol contribuiu para diminuir a predominância de *C. albicans* em episódios de candidemia, possibilitando a emergência das espécies não-*albicans* que apresentam suscetibilidade reduzida a esse antifúngico, tais como *C. glabrata* e *C. krusei* (GIRI; KINDO, 2012).

C. albicans é a levedura mais frequentemente isolada de infecções humanas superficiais e invasivas, de diferentes locais do corpo, em todo o mundo (COLOMBO et al., 2013; SIMITSOPOULOU et al., 2013). Essa espécie se adapta ao ambiente por meio de fatores de virulência, que incluem: a produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas e proteínas de reconhecimento chamadas adesinas; além disso, sua morfogênese permite a conversão de leveduras para hifas, o que facilita a invasão de tecidos e termotolerância (COLOMBO et al., 2013; AKBARI; KJELLERUP, 2015). A espécie *C. albicans* apresenta suscetibilidade inata aos antifúngicos sistêmicos utilizados no tratamento da candidemia; porém, alguns isolados clínicos apresentam suscetibilidade reduzida e casos de resistência adquirida aos azóis e às equinocandinas já foram relatados (COLOMBO et al., 2013; MATTEI et al., 2013). Essa espécie apresenta elevada capacidade de formação de biofilmes, o que propicia sua adesão aos tecidos do hospedeiro e a implantes médicos, facilitando a invasão do sistema circulatório por este patógeno. Alguns autores sugerem que a maioria das infecções causadas por *C. albicans* esteja associada a biofilmes (SILVA et al., 2012; SARDI et al., 2014; EL-AZIZI; FARAG; KHARDORI, 2015). Ainda, seu polimorfismo é

importante para a patogenicidade do fungo e parece ter papel crítico no desenvolvimento de biofilmes altamente estruturados (HE et al., 2007).

C. glabrata tem se destacado como importante patógeno oportunista em todo o mundo, sendo a segunda levedura mais comumente isolada da microbiota normal. Essa espécie teve sua importância como patógeno reconhecida nas últimas décadas (GIRI; KINDO, 2012; CHAHOUD; KANAFANI; KANJ, 2013). *C. glabrata* representa umas das causas mais comuns de candidemia em centros médicos nos EUA e na Europa, sendo que nos EUA essa espécie é mais comum que em outros locais. Estudos mostraram que fungemias causadas por *C. glabrata* são mais frequentes em adultos de idade mais avançada e pouco comum em neonatos e pacientes pediátricos; porém, também foram relacionadas a pacientes com tumores sólidos, pacientes transplantados e com cirurgia abdominal recente. Altas taxas de mortalidade, casos de resistência aos antifúngicos e falhas na terapêutica têm sido atribuídas a essa espécie (MALANI et al., 2005; DEORUKHKAR; SAINI, 2014; QUINDÓS, 2014). O uso de azóis na profilaxia de infecções fúngicas pode aumentar a frequência de infecções por *C. glabrata*, já que essa espécie possui suscetibilidade reduzida aos antifúngicos dessa classe (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010). Além disso, foram relatados casos de falha terapêutica utilizando-se equinocandinas para tratamento de candidemia causada por *C. glabrata*, e dados de um estudo utilizando modelo animal sugerem que essa classe de antifúngicos possua efeito fungistático para essa espécie (NUCCI et al., 2013). *C. glabrata* é incapaz de formar pseudo-hifas, existindo como blastoconídios tanto no estado comensal como no patogênico (DEORUKHKAR; SAINI, 2014). Um dos fatores que contribui para a virulência dessa espécie é a sua versatilidade em se adaptar a diferentes ambientes e formar biofilme (RODRIGUES et al., 2016).

C. parapsilosis é uma espécie comumente isolada das mãos de profissionais de saúde e relacionada às infecções adquiridas de fontes exógenas. Essa espécie é responsável por 15-30% dos casos de candidemia no Brasil, sendo que essa taxa varia entre hospitais públicos e privados. Foi relatada como predominante entre as espécies não-*albicans* em candidemias na Austrália, América Latina e em países da África, Ásia e Europa. Estudos mostram que *C. parapsilosis* é capaz de formar biofilmes e sua incidência pode estar relacionada à presença de Cateter Venoso Central (CVC) e

nutrição parenteral (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010; COLOMBO et al., 2013; QUINDÓS, 2014). Além dos fatores de risco para candidemia em geral, a nutrição parenteral fornece um ambiente rico em glicose e lipídios, o que favorece a formação de biofilme por essa espécie. A candidemia representa uma complicação séria em pacientes neonatos e pediátricos, sendo *C. parapsilosis* a principal responsável por candidemia entre esses grupos de pacientes (LEVI et al., 1998; RENK et al., 2015). A espécie *C. parapsilosis* (*sensu latu*) foi reclassificada em um complexo de três espécies indistinguíveis fenotipicamente: *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Desse complexo, as espécies *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* são isoladas com baixa frequência, enquanto a espécie *C. parapsilosis sensu stricto* é a mais prevalente (ZICCARDI et al., 2015).

C. tropicalis tem emergido como importante causador de candidemias de origem hospitalar. Acomete pacientes com a microbiota bacteriana suprimida, neutropenia e doenças hematológicas, sendo comum em pacientes leucêmicos. Entretanto, no Brasil, *C. tropicalis* foi relacionada a casos de candidemia em pacientes que não apresentaram neutropenia (COLOMBO et al., 2013). Essa espécie é a segunda maior causadora de candidíase invasiva em países da Ásia, da América Latina e na Índia (GIRI; KINDO, 2012; QUINDÓS, 2014). Ferreira e colaboradores (2013) relataram capacidade de formação de biofilme por isolados clínicos de *C. tropicalis*.

As particularidades terapêuticas apresentadas pelas espécies de *Candida* e a epidemiologia mostram a importância de se identificar essas leveduras em nível de espécie, quando associadas às infecções sistêmicas, a fim de direcionar as escolhas terapêuticas e controle de infecções hospitalares. Falhas no tratamento, devido ao longo tempo para diagnóstico ou devido a diagnósticos inespecíficos, podem resultar em doenças graves e até em morte (COLOMBO et al., 2013; PERLIN; SHOR; ZHAO, 2015).

A correlação entre a suscetibilidade aos antifúngicos *in vitro* e a evolução clínica das candidemias ainda é incerta. Assim, o conhecimento sobre o perfil de suscetibilidade dos isolados é crucial para que essa correlação seja determinada e esses testes possam ser utilizados na prática clínica, trazendo benefícios para os pacientes e auxiliando na escolha do tratamento (COLOMBO et al., 2013).

1.4 Biofilmes

Biofilmes são comunidades microbianas organizadas, estruturadas e complexas, onde as células microbianas estão aderidas a uma superfície sólida, viva ou inerte, e envolvidas por uma matriz polissacarídica extracelular. O fenômeno de adesão a superfícies inertes ocorre devido a propriedades físico-químicas da superfície celular das leveduras. A capacidade de adesão das leveduras está relacionada a fatores inespecíficos, como interações eletrostáticas entre células microbianas e as superfícies, e a fatores específicos, como adesinas da parede celular e ligantes específicos. Em biofilmes, os micro-organismos apresentam características fenotípicas diferentes de suas células planctônicas (BETTIO, 2010; MONTEIRO et al., 2014; SARDI et al., 2014). A formação de biofilme confere uma série de vantagens aos micro-organismos como resistência aos agentes antimicrobianos, proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro, virulência acentuada, cooperação metabólica, troca de material genético e comunicação (AKBARI; KJELLERUP, 2015; MELLO et al., 2016).

Biofilmes maduros de *Candida* spp. consistem em uma estrutura tridimensional complexa de leveduras e pseudo-hifas, dependendo da espécie, que permanecem unidas e envoltas por uma matriz extracelular. Essa matriz é composta por carboidratos, proteínas, glicose, fósforo, entre outros. A estrutura do biofilme contribui para a tolerância dos micro-organismos aos agentes antimicrobianos, já que a matriz extracelular pode agir como uma barreira, impedindo a penetração dessas substâncias. Uma vez estabelecido, o biofilme pode tolerar agentes antimicrobianos em concentrações de 10-1000 vezes maiores que as necessárias para eliminar micro-organismos planctônicos, além de serem resistentes aos fagócitos (SILVA et al., 2009; SIMITSOPOULOU et al., 2013; BUENO, 2014; AKBARI; KJELLERUP, 2015). Além da matriz extracelular, algumas características do biofilme explicam a sua aumentada resistência aos antimicrobianos como baixa taxa de crescimento em resposta ao estresse ambiental, expressão de bombas de fluxo, *quorum-sensing* e alteração nos níveis de esterol em algumas fases do biofilme (FAUVART, 2011; GHANNOUM et al., 2015).

A formação de biofilmes por *Candida* spp. é dividida em três fases: a fase inicial (0-6 horas), fase intermediária (7-12 horas) e fase madura (13-48 horas) (GHANNOUM

et al., 2015). As etapas envolvidas na formação e crescimento do biofilme são mostradas na figura 1.

Figura 1 - Etapas de formação de biofilme de *C. albicans*

(1) Contato inicial e adesão das leveduras à superfície. (2) Formação de microcolônias na camada basal. (3) Formação de camadas superiores, com a presença de hifas e produção de matriz extracelular. (4) Biofilmes maduros com muitas microcolônias, leveduras e hifas envoltas por matriz extracelular. (5) Produção e dispersão de novos esporos.

Fonte: Gu, Xu e Sun (2015).

Acredita-se que a adesão seja a primeira interação dos micro-organismos com as células e tecidos do hospedeiro e, posteriormente, ocorre o processo de infecção, que inclui colonização, invasão, disseminação e persistência (MELLO et al., 2016).

Por serem reservatórios de células microbianas, os biofilmes podem dispersar células, tornando-se fontes de infecções crônicas e persistentes, e também podem promover a reinfecção de locais colonizados. Além da dispersão de agregados de células microbianas na corrente sanguínea, os biofilmes podem ser fontes de endotoxinas e de substâncias pirogênicas, o que agrava a situação dos pacientes (FAUVART, 2011; AKBARI; KJELLERUP, 2015).

Estima-se que aproximadamente 65% das infecções humanas estejam associadas à formação de biofilmes, e que mais de 500.000 mortes por ano sejam causadas por infecções associadas a esses. Biofilmes fúngicos podem se formar em catéteres e próteses, resultando em infecções nosocomiais. Sua erradicação requer a

administração de doses muito altas de antifúngicos, que podem ser tóxicas, ou ainda pode ser necessária a remoção do dispositivo colonizado, o que pode levar a sérias complicações médicas (SARDI et al., 2014; MELLO et al., 2016).

Poucos métodos são conhecidos para a determinação da suscetibilidade de biofilmes aos antifúngicos e a relação dos resultados com sucesso terapêutico ainda é incerta. A validade e reprodutibilidade dos métodos de análise quantitativa de biofilmes são questionadas por autores, e nenhum método ainda foi aceito como referência universal (MAIOLO et al., 2014). Os métodos comumente utilizados para determinação de suscetibilidade aos antifúngicos, como os padronizados pelo “Clinical and Laboratory Standard Institute” (CLSI), são baseados em células planctônicas e, por isso, não são eficazes para determinar o efeito de antifúngicos sobre biofilmes. O método colorimétrico baseado na redução do sal XTT pelas células metabolicamente ativas tem sido utilizado para determinar o efeito dos antifúngicos sobre células em biofilme, já que possibilita quantificar apenas as células viáveis (PIERCE et al., 2008; MELO et al., 2011; MAIOLO et al., 2014).

1.5 Testes *in vivo*

O gênero *Candida* reúne importantes espécies, causadoras de infecções superficiais e sistêmicas. Apesar do conhecimento sobre o aumento da resistência aos antimicrobianos em biofilmes, pouco se sabe sobre como a formação de biofilme impacta na relação fungo-hospedeiro e como ela influencia o desfecho das infecções sanguíneas. Nas últimas décadas, tem sido observada uma crescente preocupação sobre modelos experimentais para testes com patógenos humanos, onde são buscados novos modelos eticamente mais aceitáveis que os modelos em mamíferos. Modelos experimentais em hospedeiros invertebrados, com resposta imune inata bem desenvolvida, têm sido utilizados para elucidar diversos aspectos de patogenicidade e resposta imunológica a fungos patogênicos. Esses modelos são simples e de baixo custo (CHAMILOS et al., 2007; BORCHI et al., 2014). As larvas do inseto *Galleria mellonella* não requerem instalações especiais para sua manutenção, e seu tamanho relativamente grande faz com que o manejo e a injeção sejam simples. Além disso, as

larvas de *G. mellonella* podem ser mantidas a temperaturas semelhantes à dos mamíferos, característica importante para estudos com *Candida* spp.. O sistema imunológico das larvas possui semelhanças com o sistema imune inato de mamíferos, onde os hemócitos do inseto são os fagócitos, semelhantes aos neutrófilos de humanos. Assim, com a interpretação correta, as diferenças e similaridades na patogênese e defesa do hospedeiro, em diferentes modelos experimentais, podem contribuir com a identificação de mecanismos nas infecções humanas (JACOBSEN, 2014).

OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto da formação de biofilme sobre o perfil de suscetibilidade a antifúngicos de isolados de *Candida*, e avaliar parâmetros epidemiológicos de episódios de candidemia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). As espécies analisadas foram *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, principais responsáveis pelas infecções fúngicas invasivas em humanos.

2.2 Objetivos específicos

- Pesquisar dados clínicos nos prontuários dos pacientes para uma abordagem epidemiológica;
- Caracterizar os isolados quanto à capacidade de formação de biofilme por meio de duas metodologias: método colorimétrico de redução do XTT [2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)] e método colorimétrico de coloração com cristal violeta (CV);
- Comparar a suscetibilidade dos isolados, em células planctônicas e em biofilmes, aos agentes antifúngicos utilizados no tratamento de candidemia: anfotericina B (AMB), caspofungina (CAS), fluconazol (FLC) e voriconazol (VOR);
- Visualizar, por microscopia eletrônica de varredura, a estrutura de biofilmes de cada espécie;
- Avaliar a virulência, *in vivo*, de isolados clínicos selecionados de *C. albicans*, que apresentaram diferenças no perfil de formação de biofilme, utilizando o modelo experimental em larvas de *Galleria mellonella*.

MATERIAL E MÉTODOS

3 Material e métodos

3.1 Isolamento e identificação das espécies de *Candida*

As amostras foram obtidas a partir de hemoculturas de pacientes internados no HCFMRP-USP. Essas foram realizadas mediante requisição médica durante a assistência ao paciente. Os isolados pertencentes às espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* foram utilizados no estudo. Foram isoladas 70 amostras de *Candida* spp. (Apêndice A), cada uma isolada de um paciente, no período de Junho/2014 a Novembro/2015. Além dos isolados provenientes de pacientes, linhagens padrão da “American Type Culture Collection” (ATCC) foram utilizadas como controle: *C. albicans* (ATCC 14053), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. metapsilosis* INCQS 40329 (ATCC 96143) e *C. orthopsilosis* (ATCC 96141). As amostras de *Candida* spp. foram mantidas por meio de repiques sucessivos em meio Ágar Sabouraud Dextrose (Anexo A), sob resfriamento (4°C), e na forma de crioestoque em Caldo Sabouraud Dextrose com glicerol (20%), mantidos a -80°C.

As amostras foram isoladas usando o sistema Bactec™ 9240 (Becton & Dickinson) e identificadas no Laboratório de Micologia do Hospital das Clínicas por meio de testes clássicos e do sistema automatizado VITEK® 2 Compact (bioMérieux). A confirmação das espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foi realizada em nosso laboratório, em um estudo anterior, utilizando-se técnicas moleculares. Para esta técnica, foram utilizados “primers” específicos para cada espécie, de acordo com Martínez e colaboradores (2010). As espécies *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, que não são diferenciadas fenotipicamente, foram identificadas segundo a metodologia descrita por Feng e colaboradores (2014), que é baseada em PCR seguida de digestão enzimática pela enzima *StyI*. Os “primers” utilizados para a confirmação da identificação dos isolados estão descritos no Anexo B.

3.2 Análise dos prontuários médicos

Visando fazer uma abordagem epidemiológica da candidemia, alguns dados como sexo, idade e diagnóstico foram extraídos dos prontuários dos pacientes. Também foi verificada a presença dos fatores de risco como tratamento com antibióticos, nutrição parenteral, presença de cateter venoso central, ocorrência de cirurgia, neutropenia, uso de sonda vesical de demora ou sondagem vesical intermitente. Foi verificado o desfecho após 14 dias (sobrevivência ou óbito). Com esses dados, foram feitas avaliações como prevalência das espécies, frequência dos fatores de risco e taxa de mortalidade. A pesquisa de dados dos prontuários foi realizada com a colaboração do Professor Doutor Roberto Martinez, médico responsável pelo Laboratório de Investigação em Micologia Médica do Departamento Clínica Médica da FMRP-USP.

3.3 Testes de suscetibilidade em células planctônicas

Os testes de suscetibilidade foram realizados com alguns dos antifúngicos utilizados no tratamento de candidemia: AMB, CAS, FLC e VOR.

Foi utilizada a metodologia de microdiluição em caldo para leveduras, de acordo com as diretrizes do documento M27-A3, suplemento S4 do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI); quando os valores de ponto de corte não estavam disponíveis no referido documento, foram utilizados valores epidemiológicos: disponíveis no documento M59 do CLSI para AMB, e descritos por Pfaller e colaboradores (2011) para VOR. A linhagem *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como controle de qualidade em todos os experimentos. Resumidamente, os isolados foram cultivados a 35°C, durante 24h, em Ágar Sabouraud Dextrose e, a partir desses cultivos, foram confeccionadas suspensões em solução salina 0,85%, com turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland. Duas diluições subsequentes a estas suspensões foram realizadas: 1:100 e 1:20, em meio líquido RPMI tamponado com MOPS [3-(N-morpholino) propanesulfonic acid] 0,165M, pH=7,0 (Anexo A). Das suspensões celulares, 100µL foram transferidos para placas de poliestireno de 96 poços contendo os antifúngicos diluídos em meio RPMI, em diversas concentrações. As placas foram incubadas a 35°C, durante 24h, e lidas visualmente. A Concentração

Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento para CAS, FLC e VOR e a menor concentração capaz de inibir qualquer crescimento visível para AMB. Os testes foram realizados em duplicata. Os valores utilizados para classificação dos isolados em suscetível, suscetível dose dependente, e resistente foram determinados de acordo com o CLSI e estão dispostos no quadro 1. Os valores de VOR para *C. glabrata* foram sugeridos por Pfaller e colaboradores (2011).

Quadro 1 – Valores dos pontos de corte utilizados para classificação da suscetibilidade dos isolados de *Candida* spp. aos antifúngicos AMB, CAS, FLC e VOR.

Espécie	Antifúngico	CIM (µg/mL)		
		Suscetível	Suscetível dose dependente	Resistente
<i>C. albicans</i>	AMB	≤ 2	-	> 2
	CAS	≤ 0,25	0,5	≥ 1
	FLC	≤ 2	4	≥ 8
	VOR	≤ 0,12	0,25 - 0,5	≥ 1
<i>C. glabrata</i>	AMB	≤ 2	-	> 2
	CAS	≤ 0,12	0,25	≥ 0,5
	FLC	---	≤32	≥ 64
	VOR	≤ 1	2	≥ 4
<i>C. parapsilosis</i>	AMB	≤ 2	-	> 2
	CAS	≤ 2	4	≥ 8
	FLC	≤ 2	4	≥ 8
	VOR	≤ 0,12	0,25 - 0,5	≥ 1
<i>C. tropicalis</i>	AMB	≤ 2	-	> 2
	CAS	≤ 0,25	0,5	≥ 1
	FLC	≤ 2	4	≥ 8
	VOR	≤ 0,12	0,25 - 0,5	≥ 1

Fonte : CLSI, 2012; CLSI, 2016 ; PFALLER et al., 2011.

3.4 Testes de formação de biofilme

A capacidade de formação de biofilme dos 70 isolados foi analisada de acordo com a atividade metabólica e a biomassa total dos biofilmes. Para isso, os testes foram realizados de acordo com Pierce e colaboradores (2010). Os biofilmes foram formados em placas de poliestireno de 96 poços, de fundo chato. Para isso, os isolados foram cultivados em meio “Yeast Peptone Dextrose” (YPD - Anexo A) a 30°C, por 16h, sob agitação. As culturas foram centrifugadas, lavadas com “Phosphate Buffered Saline” (PBS – Anexo C), ressuspensas em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS, e utilizadas para confeccionar suspensões celulares de 1×10^6 células/mL em meio RPMI (utilizando-se DO₆₀₀ padronizada no laboratório, para cada espécie, por meio de semeadura em placa e contagem de unidades formadoras de colônia). Das suspensões celulares, 100µL foram transferidos para cada poço das placas de 96 poços e essas placas foram incubadas por 24h, a 37°C. Após esse período, o sobrenadante dos poços foi aspirado, para remover células não aderidas, e as placas foram lavadas com PBS esterilizado, por três vezes. Para quantificação dos biofilmes, foram utilizados dois métodos colorimétricos: o método de estimativa da biomassa total por coloração com cristal violeta, o qual permite a quantificação de células microbianas vivas e mortas; e o método da determinação da atividade metabólica, o qual considera apenas células metabolicamente ativas através da redução do sal tetrazólio XTT (“2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide”) pelas desidrogenases mitocondriais (TREVIÑHO-RANGEL et al., 2015). A estimativa da biomassa total foi realizada de acordo com Silva e colaboradores (2009). Resumidamente, os biofilmes foram fixados com metanol por 15 minutos e corados com solução de cristal violeta 1% (Sigma-Aldrich, EUA) por 5 minutos; os poços foram lavados duas vezes para remoção do excesso de corante. O corante foi então dissolvido em ácido acético (33%), o sobrenadante transferido para nova placa e lido em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 570nm. A determinação da atividade metabólica do biofilme foi feita de acordo com Pierce e colaboradores (2010). 100µL de solução de XTT a 0,5g/L e menadiona 1µM (Anexo C) foi adicionada às placas contendo os biofilmes e as placas foram incubadas por 2h, a 37°C, no escuro. Após incubação, o sobrenadante foi transferido para nova placa e lido em espectrofotômetro, a 490nm. Todas as placas

possuíam sempre uma coluna sem inóculo, utilizada como controle negativo e branco. Os testes foram realizados em quatro replicatas.

A classificação entre alta formação de biofilme e baixa formação de biofilme foi feita utilizando-se a densidade óptica (DO), de acordo com Pannanusorn, Fernandez e Romling (2013), a qual utiliza os valores de absorbância da atividade metabólica:

$DO_{490} \geq 0,1$ – alta formação de biofilme

$0,025 \leq DO_{490} < 0,1$ – baixa formação de biofilme

$DO_{490} < 0,025$ – ausência de biofilme

3.5 Visualização de biofilmes por microscopia eletrônica de varredura

Biofilmes de diferentes espécies foram analisados por microscopia eletrônica de varredura. Imagens de duas amostras de cada espécie foram analisadas, uma com alta capacidade formadora de biofilme e outra com baixa capacidade formadora de biofilme, e para *C. parapsilosis* uma baixa formadora e uma não formadora de biofilme. As imagens foram feitas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os biofilmes foram formados de acordo com Pierce e colaboradores (2010), sobre discos de poliestireno estéreis Thermanox® de 13mm, colocados em placas de poliestireno de 24 poços. Depois de lavados com PBS, para remoção de células não aderentes, as amostras foram preparadas de acordo com Melo e colaboradores (2011). Resumidamente: os discos contendo os biofilmes foram fixados com formaldeído (4%) e glutaraldeído (2%), tamponado com cacodilato de sódio (0,1M), pH=7,2 por 24h, a 4°C. A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio (1%) em tampão cacodilato, por 1h. Em seguida, as amostras foram tratadas com ácido tânico (1%), por 45min. Seguindo a pós-fixação, os discos foram novamente tratados com tetróxido de ósmio (1%) em tampão cacodilato, por 1h. As amostras foram desidratadas com uma série de lavagens com etanol, secas em ponto crítico em CO₂, metalizadas com ouro e analisadas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6610 LV, com voltagem de aceleração de 15 a 25kV. Fotomicrografias foram capturadas com magnificação de 200 a 5000 vezes.

3.6 Testes de suscetibilidade em biofilmes

Os testes foram realizados com os mesmos antifúngicos usados para as células planctônicas: AMB, CAS, FLC e VOR, de acordo com Pierce e colaboradores (2010). Para isso, os isolados com capacidade de formação de biofilme foram cultivados em meio YPD a 30°C, por 16h, sob agitação. As culturas foram centrifugadas, lavadas com PBS e ressuspensas em meio RPMI. A partir dessas, foram confeccionadas suspensões celulares de 1×10^6 células/mL em meio RPMI. 100µL dessas suspensões foram transferidos para cada poço das placas de 96 poços e estas foram incubadas por 24h, a 37°C. Após esse período, o sobrenadante dos poços foi aspirado, a fim de remover células não aderidas, e as placas lavadas três vezes com PBS esterilizado. Posteriormente, os antifúngicos foram diluídos em meio RPMI em diferentes concentrações, adicionados aos poços contendo os biofilmes, e as placas incubadas a 37°C, por 24h. A suscetibilidade dos biofilmes aos antifúngicos foi determinada utilizando-se a metodologia de redução do XTT (PIERCE et al., 2010). Assim, foi determinada a Concentração Erradicatória Mínima (CEM) dos antifúngicos AMB, CAS, FLC e VOR para os biofilmes maduros (24h). A CEM foi definida como a concentração mínima da droga capaz de reduzir a atividade metabólica do biofilme em 50% (CEM₅₀) e em 80% (CEM₈₀), considerando-se o controle de crescimento, sem a presença dos antifúngicos, como 100%. Os testes foram realizados em duplicata.

3.7 Testes de virulência, *in vivo*, em modelo experimental alternativo

Para avaliar o perfil de virulência de isolados de *C. albicans* que apresentaram alta e baixa formação biofilme, utilizou-se o modelo experimental segundo Fuchs e colaboradores (2010), utilizando-se larvas da espécie *Galleria mellonella*. Neste estudo as larvas foram mantidas a 28°C no escuro, em recipiente de vidro (30cm altura x 20cm largura) com capacidade de 2L. As larvas foram mantidas com acesso à ração (Anexo A) até alcançarem o sexto ínstar, cujo peso está entre 200mg a 250mg. Foram avaliados quatro isolados de *C. albicans* classificados como baixo formador de biofilme e quatro isolados classificados como alto formador de biofilme. Os isolados foram

crecidos em meio YPD, a 30°C, overnight, a 180rpm. As células fúngicas foram centrifugadas por 5min a 1660xg, 4°C, lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS. Foram confeccionadas suspensões de 2×10^8 células/mL, confirmadas por semeadura em placa e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). As larvas de *G. mellonella* foram injetadas com 5µL dessa suspensão de células fúngicas (1×10^6 células/larva). Para a infecção artificial em larvas de *G. mellonella*, foi utilizada micro seringa de Hamilton para cromatografia gasosa modelo 7000.5KH, com volume de 10µL. Para cada larva, a infecção foi feita por meio de inóculo no centro da ventosa da última pró-pata direita. O mesmo foi feito para o grupo controle, inoculado com 5µL de PBS 1X, para monitorar o efeito do trauma. Entre as infecções, uma bateria de lavagem na pipeta de Hamilton foi realizada: três vezes com hipoclorito de sódio, etanol 70% e água autoclavada. Após a infecção, as larvas foram mantidas em placas de Petri de vidro, um grupo por placa, e colocadas em estufa a 37°C, privadas de alimentação e iluminação direta, durante 10 dias. Durante todo o período experimental, a cada 12h as larvas foram retiradas da pré-pupa a fim de retardar sua metamorfose. Os dados foram anotados diariamente. Foram realizadas duas réplicas biológicas, com 10 larvas por grupo experimental.

3.8 Análise estatística

Para analisar a diferença na formação de biofilme entre as espécies, foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. Valores de *P* iguais ou menores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Para análise dos testes de virulência, foi utilizado o teste de Log-rank (Mantel-Cox) para avaliar a significância das curvas de sobrevivência. Valores de *P* iguais ou menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Os resultados foram analisados utilizando o software Graphpad Prism 5.

3.9 Ética

Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (número CAAE 261 23913.9.0000.5403).

RESULTADOS

4 Resultados

4.1 Isolamento e identificação

Foram isoladas 70 amostras das espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, provenientes de 70 episódios de candidemia de pacientes internados no HCFMRP-USP, no período de Junho/2014 a Outubro/2015. A distribuição das espécies está disposta na figura 2. Três isolados previamente identificados como *C. parapsilosis*, através de testes fenotípicos, foram confirmados como *C. orthopsilosis* utilizando-se a técnica molecular. Assim, essa espécie foi incluída no trabalho.

Figura 2 - Distribuição das espécies de *Candida* isoladas de hemoculturas.

Fonte: o autor.

A espécie prevalente foi *C. albicans*, responsável por 44,3% dos episódios de candidemia, seguida por *C. parapsilosis* (*sensu latu*), responsável por 20%, sendo a espécie *C. parapsilosis sensu stricto* responsável por 15,7% e *C. orthopsilosis* por 4,3%; a espécie *C. glabrata* foi responsável por 18,6% dos casos, e *C. tropicalis* encontrada em 17,1% dos episódios.

4.2 Análise dos prontuários médicos

As características demográficas: faixa etária e sexo, e as características clínicas: fatores de risco e mortalidade de acordo com a espécie, dos pacientes acometidos por candidemia, estão listadas na tabela 1.

Tabela 1 - Características dos pacientes acometidos por candidemia.

Característica	(%) n
Idade	
Até 1 ano (Neonatos)	(12,9%) 9
De 1 a 15 anos (Crianças)	(7,1%) 5
De 16 a 59 anos (Adultos)	(45,7%) 32
Mais de 60 anos (Idosos)	(34,3%) 24
Sexo	
Feminino	(44,3%) 31
Masculino	(55,7%) 39
Fatores de risco ^{*1}	
Uso de antibióticos	(85,7%) 60
Acesso venoso central	(55,7%) 39
Cirurgia	(54,3%) 38
Neutropenia	(12,9%) 9
Nutrição parenteral	(44,3%) 31
Uso de sonda vesical ^{*2}	(68,6%) 48
Taxa de mortalidade ^{*3}	
Total	(50%) 35
<i>C. albicans</i>	(45,1%) 14/31
<i>C. glabrata</i>	(76,9%) 10/13
<i>C. parapsilosis (sensu latu)</i>	(35,7%) 5/14
<i>C. tropicalis</i>	(50%) 6/12

^{*1} Os fatores de risco estiveram presentes em parte ou no total do período de 30 dias prévios à candidemia.

^{*2} Sonda vesical de demora ou sondagem vesical intermitente.

^{*3} Casos em que o desfecho, após 14 dias, foi óbito (n óbitos/ n total). Fonte: o autor.

Os fatores de risco associados à candidemia, mais frequentemente observados nos pacientes acometidos, foram: uso de antibióticos, em 85,7% dos pacientes; uso de sonda vesical, em 68,6%; acesso venoso central, em 55,7%; cirurgia em 54,3%; uso de nutrição parenteral, em 44,3%, e neutropenia, em 12,9% dos pacientes. Um total de 88,6% (n=62) dos pacientes apresentava dois ou mais fatores de risco.

A taxa de mortalidade foi de 50% (desfecho após 14 dias). Quanto à taxa de mortalidade de cada espécie, os episódios de candidemia causados por *C. glabrata* apresentaram a maior taxa de mortalidade, aonde 76,9% dos pacientes vieram a óbito em até 14 dias após o diagnóstico de candidemia. Entre os casos causados por *C. tropicalis*, 50% vieram a óbito, seguidos por *C. albicans*, com taxa de mortalidade de 45,1% e *C. parapsilosis* (*sensu latu*) que apresentaram taxa de mortalidade de 35,7%.

4.3 Testes de suscetibilidade em células planctônicas

Os valores médios da CIMs para os antifúngicos AMB, CAS, FLC e VOR, para os 70 isolados de *Candida* spp. em células planctônicas, estão dispostos na tabela 2 e na figura 3.

Dos 70 isolados de *Candida* spp., um isolado de *C. albicans* apresentou resistência ao FLC e VOR; todos os isolados de *C. glabrata* e um isolado de *C. parapsilosis* foram considerados suscetíveis dose dependente ao FLC. Dois isolados de *C. glabrata* foram suscetíveis dose dependente à CAS, e um isolado de *C. tropicalis* foi suscetível dose dependente ao VOR. Os valores das CIMs de cada antifúngico, para os 70 isolados de *Candida* spp., estão dispostos nos apêndices B e C.

Tabela 2 - Valores dos intervalos das CIMs para células planctônicas.

Espécie	Antifúngico	CIM (µg/mL)	
		Intervalo	Média* ± DP
<i>C. albicans</i> n=31	AMB	0,5 – 1	0,79 ± 0,24
	CAS	0,0625 – 0,25	0,13 ± 0,07
	FLC	0,125 – 512	0,18 ± 91,9
	VOR	0,0313 – 128	0,04 ± 22,9
<i>C. glabrata</i> n=13	AMB	1	1,0 ± 0
	CAS	0,015 – 0,25	0,095 ± 0,07
	FLC	2 – 4	2,61 ± 1,0
	VOR	0,0313 – 0,125	0,07 ± 0,03
<i>C. parapsilosis</i> n=14	AMB	0,25 – 1	0,64 ± 0,3
	CAS	0,125 – 1	0,45 ± 0,28
	FLC	0,25 – 4	0,52 ± 1,03
	VOR	0,0313 – 0,0625	0,03 ± 0,01
<i>C. tropicalis</i> n=12	AMB	0,25 – 1	0,66 ± 0,32
	CAS	0,0625 – 0,125	0,08 ± 0,03
	FLC	0,125 – 2	0,31 ± 0,54
	VOR	0,0313 – 0,25	0,04 ± 0,06

*Média geométrica. DP: desvio padrão. Fonte: o autor.

Figura 3 - Valores médios da CIM dos antifúngicos frente aos isolados de *Candida* spp..

CIM média dos antifúngicos: (a) AMB; (b) CAS; (c) FLC; (d) VOR, frente às espécies testadas. Fonte: o autor.

4.4 Testes de formação de biofilme

Os valores médios da atividade metabólica de biofilmes de todos os isolados estão representados na figura 4.

Figura 4 - Formação de biofilme por *Candida* spp., de acordo com a atividade metabólica, utilizando XTT (490nm).

Os valores representam as médias de quatro replicatas (e erro padrão). Fonte: o autor.

Em relação à atividade metabólica dos biofilmes, representada pela média aritmética de quatro replicatas técnicas e mostrada em valores de absorbância (A_{490nm}), a escala de formação de biofilme, de maior para menor, foi: *C. albicans* > *C. glabrata* > *C. tropicalis* > *C. parapsilosis* (Figura 4). A diferença na formação de biofilme foi significativa entre os isolados de *C. parapsilosis* e os isolados das demais espécies ($P < 0,05$). Entre isolados de *C. albicans* e *C. glabrata*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, a diferença nos valores de absorbância não foi significativa, assim como entre isolados de *C. glabrata* e *C. tropicalis* ($P > 0,05$).

Os valores médios da biomassa de biofilmes de todos os isolados estão representados na figura 5.

Figura 5 - Formação de biofilme por *Candida* spp., de acordo com a biomassa, utilizando CV (570nm).

Os valores representam as médias de quatro replicatas (e erro padrão). Fonte: o autor.

De acordo com a biomassa total, representada pela média aritmética de quatro replicatas técnicas e mostrada em valores de absorbância (A_{570nm}), a escala de maior formação de biofilme para menor foi: *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. glabrata* > *C. parapsilosis*. A diferença na formação de biofilme, segundo a biomassa, entre os isolados de *C. albicans* e *C. glabrata*, entre os isolados de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, bem como entre os isolados de *C. glabrata* e *C. tropicalis*; e *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Entre isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis*, a diferença nos valores de absorbância não foi estatisticamente significativa, assim também como entre os isolados de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* ($P > 0,05$).

Os valores médios de absorbância a 490nm e a 570nm, que correspondem respectivamente à atividade metabólica e à biomassa total dos biofilmes dos isolados de cada espécie, estão dispostos nas figuras 6 a 9.

De acordo com a atividade metabólica, todos os isolados de *C. albicans* foram capazes de formar biofilme, com valores de absorbância de 0,0593 a 0,5793, média de $0,2253 \pm 0,1302$. Do total, 26 isolados (83,9%) apresentaram alta formação de biofilme e cinco isolados (16,1%) apresentaram baixa formação de biofilme (Figuras 6a e c). Os

valores de absorvância correspondentes à biomassa dos biofilmes de *C. albicans* foram de 0,1560 a 2,532, com média de $1,479 \pm 0,6497$ (Figuras 6b e c).

Figura 6 - Valores médios de absorvância, que representam: (a) a atividade metabólica (490nm); (b) a biomassa (570nm); (c) atividade metabólica e biomassa, dos biofilmes dos 31 isolados de *C. albicans*.

Fonte: o autor.

De acordo com a atividade metabólica, todos os isolados de *C. glabrata* foram capazes de formar biofilme, com valores de absorvância de 0,0559 a 0,5159, média $0,2104 \pm 0,1184$. Do total, 11 isolados (84,6%) apresentaram alta formação de biofilme e 02 isolados (15,4%) apresentaram baixa formação de biofilme (Figuras 7a e c). Os valores de absorvância correspondentes à biomassa dos biofilmes de *C. glabrata* foram de 0,0780 a 0,8766, com média de $0,2841 \pm 0,2185$ (Figuras 7b e c).

Do total, 07 isolados do complexo *C. parapsilosis* (50%) não foram capazes de formar biofilme em 24 horas, de acordo com a atividade metabólica, e 07 isolados (50%) apresentaram baixa formação de biofilme, com valores de absorvância de 0,0021 a 0,0619, média $0,02032 \pm 0,01679$. Dos isolados de *C. orthopsilosis*, dois apresentaram baixa formação de biofilme (12 e 13) (Figuras 8a e c). Os valores de absorvância correspondentes à biomassa dos biofilmes de *C. parapsilosis* foram de 0,0220 a 0,7925, com média de $0,2748 \pm 0,2427$ (Figuras 8b e c).

Todos os isolados de *C. tropicalis* foram capazes de formar biofilme. Do total, 10 isolados (83,3%) apresentaram alta formação de biofilme, e 02 isolados (16,7%) apresentaram baixa formação de biofilme (Figuras 9a e c). Os valores de absorvância correspondentes à biomassa dos biofilmes de *C. tropicalis* foram de 0,6893 a 2,828, com média de $1,460 \pm 0,5379$ (Figuras 9b e c).

Figura 7 - Valores médios de absorbância, que representam: (a) a atividade metabólica (490nm); (b) a biomassa (570nm); (c) atividade metabólica e biomassa, dos biofilmes dos 13 isolados de *C. glabrata*.

Fonte: o autor.

Figura 8 - Valores médios de absorbância, que representam: (a) a atividade metabólica (490nm); (b) a biomassa (570nm); (c) atividade metabólica e biomassa, dos biofilmes dos 14 isolados do complexo *C. parapsilosis*.

Do complexo *C. parapsilosis*, 11 isolados de *C. parapsilosis sensu stricto* e três isolados de *C. orthopsilosis* (isolados nº7, 12 e 13). Fonte: o autor.

Figura 9 - Valores médios de absorbância, que representam: (a) a atividade metabólica (490nm); (b) a biomassa (570nm); (c) atividade metabólica e biomassa, dos biofilmes dos 12 isolados de *C. tropicalis*.

Fonte: o autor.

4.5 Visualização de biofilmes por microscopia eletrônica de varredura

As micrografias obtidas utilizando-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura encontram-se nas figuras 10 a 13. Foram analisados dois isolados de cada

espécie, classificados como alto e baixo formador de biofilme de acordo com a quantificação da atividade metabólica; para *C. parapsilosis*, foram analisados um baixo formador e um não formador de biofilme, já que nenhum isolado dessa espécie foi classificado como alto formador de biofilme.

Figura 10 - Biofilmes maduros de isolados clínicos de *C. albicans*.

Microscopia eletrônica de varredura de biofilmes (24h) formados sobre discos de poliestireno, de isolados de *C. albicans*: (a) classificado como alto formador de biofilme e (b) classificado como baixo formador de biofilme. Fonte: o autor.

Nas micrografias do isolado de *C. albicans* classificado como alto formador de biofilme, foi observada a presença de hifas e blastoconídios, formando uma complexa estrutura tridimensional (Figura 10a), enquanto no isolado classificado como baixo formador de biofilme, foi observado apenas blastoconídios e pseudo-hifas (Figura 10b).

Figura 11 – Biofilmes maduros de isolados clínicos de *C. glabrata*.

Microscopia eletrônica de varredura de biofilmes (24h) formados sobre discos de poliestireno, de isolados de *C. glabrata*: (a) classificado como alto formador de biofilme e (b) classificado como baixo formador de biofilme. Fonte: o autor.

Nas micrografias do isolado de *C. glabrata* classificado como alto formador de biofilme, foi observada a presença de blastoconídios agregados, cobrindo a maior parte da superfície (Figura 11a), enquanto no isolado classificado como baixo formador de biofilme, a superfície não estava totalmente coberta, mas ainda assim alguns agregados celulares com estrutura tridimensional foram observados (Figura 11b).

Figura 12 - Biofilmes de maduros de isolados clínicos *C. parapsilosis sensu stricto*.

Microscopia eletrônica de varredura de biofilmes (24h) formados sobre discos de poliestireno, de isolados de *C. parapsilosis*: (a) classificado como baixo formador de biofilme e (b) classificado como não formador de biofilme. Fonte: o autor.

Nas micrografias do isolado de *C. parapsilosis* classificado como baixo formador de biofilme, foi observado blastoconídios e poucas pseudo-hifas, com alguns agregados celulares (Figura 12a), enquanto no isolado classificado como não formador de biofilme, as células fúngicas estavam espalhadas e em menor quantidade (Figura 12b).

Figura 13 - Biofilmes maduros de isolados clínicos de *C. tropicalis*.

Microscopia eletrônica de varredura de biofilmes (24h) formados sobre discos de poliestireno, de isolados de *C. tropicalis*: (a) classificado como alto formador de biofilme e (b) classificado como baixo formador de biofilme. Fonte: o autor.

Nas micrografias do isolado de *C. tropicalis* classificado como alto formador de biofilme, foram observados emaranhados de hifas e blastoconídios (Figura 13a), enquanto no isolado classificado como baixo formador de biofilme, foi observada pequena quantidade de hifas, sendo a maioria da superfície coberta por blastoconídios e pseudo-hifas (Figura 13b).

4.6 Testes de suscetibilidade em biofilme

Os valores dos intervalos da CEM₅₀ e CEM₈₀, para todos os isolados frente aos antifúngicos testados estão dispostos na tabela 3. Os valores das CEM₅₀ e CEM₈₀ de

cada antifúngico, para cada um dos 63 isolados de *Candida* spp., estão dispostos nos apêndices B e C.

Tabela 3 - Valores dos intervalos das CEMs para biofilmes produzidos pelos 63 isolados clínicos de *Candida* spp.

Espécie	Antifúngico	CEM ($\mu\text{g/mL}$)	
		CEM ₅₀	CEM ₈₀
<i>C. albicans</i> n=31	AMB	0,063 – 8	4 – 16
	CAS	0,063 – 256	0,25 - >512
	FLC	64 - >2048	1024 - >2048
	VOR	32 - >512	128 - >512
<i>C. glabrata</i> n=13	AMB	0,25 – 4	2 – 16
	CAS	0,125 – 0,25	0,125 – 0,25
	FLC	2 - >2048	4 - >2048
	VOR	0,125 – 128	0,125 - >512
<i>C. parapsilosis</i> n=7	AMB	0,5 – 128	4 – 128
	CAS	0,25 – 8	0,5 – 128
	FLC	32 - >2018	64 - >2048
	VOR	0,5 - >512	1 - >512
<i>C. tropicalis</i> n=12	AMB	2 – 32	8 – 128
	CAS	0,125 – 64	0,25 – 128
	FLC	1024 - >2048	2048 - >2048
	VOR	256 - >512	512 - >512

Fonte: o autor.

Os valores de CEM₅₀ e CEM₈₀ para os 31 isolados de *C. albicans* estão dispostos nas figuras 14 a 17. As concentrações testadas de cada antifúngico foram: AMB: 0,0313 a 64 $\mu\text{g/mL}$; CAS: 0,0313 a 256 $\mu\text{g/mL}$; FLC: 0,25 a 2048 $\mu\text{g/mL}$; VOR: 0,0625 a 512 $\mu\text{g/mL}$.

Em biofilmes de *C. albicans*, as CEM₅₀ de AMB foram de 0,0625 a 8 $\mu\text{g/mL}$, e as CEM₈₀ foram de 4 a 64 $\mu\text{g/mL}$, sendo que 64 $\mu\text{g/mL}$ de AMB não foram suficientes para reduzir em 80% o biofilme de um isolado (3,2%) (Figura 14).

Figura 14 - Valores das CEMs de AMB para biofilmes dos isolados de *C. albicans*.

CEM₅₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 50% do biofilme; CEM₈₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 80% do biofilme, em relação ao controle de crescimento, sem antifúngicos. Fonte: o autor.

Em biofilmes de *C. albicans*, as CEM₅₀ de CAS foram de 0,0625 a 256µg/mL, e as CEM₈₀ foram de 0,25 a 256µg/mL, sendo que a maior concentração testada (256µg/mL) não foi suficiente para reduzir em 80% o biofilme de sete (22,6%) isolados (Figura 15).

Figura 15 - Valores das CEMs de CAS para biofilmes dos isolados de *C. albicans*.

CEM₅₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 50% do biofilme; CEM₈₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 80% do biofilme, em relação ao controle de crescimento, sem antifúngicos. Fonte: o autor.

As CEM₅₀ de FLC para os biofilmes de *C. albicans* foram de 64 a 2048µg/mL, e as CEM₈₀ foram de 1024 a 2048µg/mL, sendo que 2048µg/mL de FLC não foram suficientes para reduzir em 50% do biofilme de 12 (38,7%) isolados, assim como não foram capazes de reduzir em 80% do biofilme de 28 (90%) isolados (Figura 16).

Figura 16 - Valores das CEMs de FLC para biofilmes dos isolados de *C. albicans*.

CEM₅₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 50% do biofilme; CEM₈₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 80% do biofilme, em relação ao controle de crescimento, sem antifúngicos. Fonte: o autor.

As CEM₅₀ de VOR para os biofilmes de *C. albicans* foram de 32 a 512µg/mL, e as CEM₈₀ foram de 128 a 512µg/mL, sendo que a maior concentração testada de VOR não foi suficiente para reduzir em 50% do biofilme de 11 (35,5%) isolados, e também não foi capaz de reduzir em 80% do biofilme de 25 (80%) isolados (Figura 17)

Figura 17 - Valores das CEMs de VOR para biofilmes dos isolados de *C. albicans*.

CEM₅₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 50% do biofilme; CEM₈₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 80% do biofilme, em relação ao controle de crescimento, sem antifúngicos. Fonte: o autor.

Os valores de CEM₅₀ e CEM₈₀ para os isolados de *C. glabrata* estão dispostos nas figuras 18 a 21. As concentrações testadas de cada antifúngico foram: AMB: 0,0313 a 16µg/mL; CAS: 0,0313 a 16µg/mL; FLC: 0,25 a 2048µg/mL; VOR: 0,0625 a 512µg/mL.

As CEM₅₀ de AMB para os biofilmes de *C. glabrata* foram de 0,25 a 4µg/mL, e as CEM₈₀ foram de 2 a 16µg/mL (Figura 18).

Figura 18 - Valores das CEMs de AMB para biofilmes dos isolados de *C. glabrata*.

CEM₅₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 50% do biofilme; CEM₈₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 80% do biofilme, em relação ao controle de crescimento, sem antifúngicos. Fonte: o autor.

As CEM₅₀ e CEM₈₀ de CAS para os biofilmes de *C. glabrata* foram de 0,125 a 0,25µg/mL (Figura 19).

Figura 19 - Valores das CEMs de CAS para biofilmes dos isolados de *C. glabrata*.

CEM₅₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 50% do biofilme; CEM₈₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 80% do biofilme, em relação ao controle de crescimento, sem antifúngicos. Fonte: o autor.

As CEM₅₀ de FLC para os biofilmes de *C. glabrata* foram de 2 a 2048µg/mL, e as CEM₈₀ foram de 4 a 2048µg/mL, sendo que 2048µg/mL de FLC não foram suficientes

para reduzir em 50% o biofilme de dois (15,4%) isolados, assim como não foram capazes de reduzir em 80% o biofilme de cinco (38,5%) dos isolados (Figura 20).

Figura 20 - Valores das CEMs de FLC para biofilmes dos isolados de *C. glabrata*.

CEM₅₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 50% do biofilme; CEM₈₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 80% do biofilme, em relação ao controle de crescimento, sem antifúngicos. Fonte: o autor.

As CEM₅₀ de VOR para os biofilmes de *C. glabrata* foram de 0,125 a 256µg/mL, e as CEM₈₀ foram de 0,125 a 512µg/mL, sendo que a maior concentração testada (512µg/mL) de VOR não foi suficiente para reduzir em 80% o biofilme de três (23%) isolados (Figura 21).

Figura 21 - Valores de CEM de VOR para biofilmes dos isolados de *C. glabrata*.

CEM₅₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 50% do biofilme; CEM₈₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 80% do biofilme, em relação ao controle de crescimento, sem antifúngicos. Fonte: o autor.

Os valores de CEM₅₀ e CEM₈₀ para os isolados de *C. parapsilosis* estão dispostos nas figuras 22 a 25. As concentrações testadas de cada antifúngico foram: AMB: 0,0313 a 256µg/mL; CAS: 0,0313 a 256µg/mL; FLC: 0,25 a 2048µg/mL; VOR: 0,0625 a 512µg/mL.

As CEM₅₀ de AMB para os biofilmes dos isolados do complexo *C. parapsilosis* foram de 0,5 a 128µg/mL, e as CEM₈₀ foram de 4 a 128µg/mL (Figura 22).

Figura 22 - Valores das CEMs de AMB para biofilmes de isolados do complexo *C. parapsilosis*.

CEM₅₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 50% do biofilme; CEM₈₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 80% do biofilme, em relação ao controle de crescimento, sem antifúngicos. Fonte: o autor.

As CEM₅₀ de CAS para os biofilmes dos isolados do complexo *C. parapsilosis* foram de 0,25 a 8µg/mL, e as CEM₈₀ foram de 0,5 a 128µg/mL (Figura 23).

Figura 23 - Valores das CEMs de CAS para biofilmes dos isolados do complexo *C. parapsilosis*.

CEM₅₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 50% do biofilme; CEM₈₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 80% do biofilme, em relação ao controle de crescimento, sem antifúngicos. Fonte: o autor.

As CEM₅₀ de FLC para os biofilmes dos isolados do complexo *C. parapsilosis* foram de 32 a 2048 µg/mL, e as CEM₈₀ foram de 64 a 2048 µg/mL (Figura 24).

Figura 24 - Valores das CEMs de FLC para biofilmes dos isolados do complexo *C. parapsilosis*.

CEM₅₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 50% do biofilme; CEM₈₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 80% do biofilme, em relação ao controle de crescimento, sem antifúngicos. Fonte: o autor.

As CEM₅₀ de VOR para os biofilmes dos isolados do complexo *C. parapsilosis* foram de 0,5 a 512 µg/mL, e as CEM₈₀ foram de 1 a 512 µg/mL, sendo que a maior concentração testada (512 µg/mL) de VOR não foi suficiente para reduzir em 50% e em 80% o biofilme de um (14%) isolado (Figura 25).

Figura 25 - Valores das CEMs de VOR para biofilmes dos isolados do complexo *C. parapsilosis*.

CEM₅₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 50% do biofilme; CEM₈₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 80% do biofilme, em relação ao controle de crescimento, sem antifúngicos. Fonte: o autor.

Os valores de CEM₅₀ e CEM₈₀ para os isolados de *C. tropicalis* estão dispostos nas figuras 26 a 29. As concentrações testadas de cada antifúngico foram: AMB: 0,0313 a 256µg/mL; CAS: 0,0313 a 256µg/mL; FLC: 0,25 a 2048µg/mL; VOR: 0,0625 a 512µg/mL.

As CEM₅₀ de AMB para os biofilmes dos isolados de *C. tropicalis* foram de 2 a 32µg/mL, e as CEM₈₀ foram de 8 a 128µg/mL (Figura 26).

Figura 26 - Valores das CEMs de AMB para biofilmes dos isolados de *C. tropicalis*.

CEM₅₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 50% do biofilme; CEM₈₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 80% do biofilme, em relação ao controle de crescimento, sem antifúngicos. Fonte: o autor.

As CEM₅₀ de CAS para os biofilmes dos isolados de *C. tropicalis* foram de 0,125 a 128µg/mL, e as CEM₈₀ foram de 0,25 a 128µg/mL (Figura 27).

Figura 27 - Valores das CEMs de CAS para biofilmes dos isolados de *C. tropicalis*.

CEM₅₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 50% do biofilme; CEM₈₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 80% do biofilme, em relação ao controle de crescimento, sem antifúngicos. Fonte: o autor.

As CEM₅₀ de FLC para isolados de *C. tropicalis* foram de 1024 a 2048µg/mL, e a CEM₈₀ foi de 2048µg/mL, sendo que a maior concentração testada não foi capaz de

reduzir 50% do biofilme de sete (58,3%) isolados, bem como não foi capaz de reduzir 80% do biofilme de 11 (91,7%) isolados (Figura 28).

Figura 28 - Valores das CEMs de FLC para biofilmes dos isolados de *C. tropicalis*.

CEM₅₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 50% do biofilme; CEM₈₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 80% do biofilme, em relação ao controle de crescimento, sem antifúngicos. Fonte: o autor.

As CEM₅₀ de VOR para os biofilmes de *C. tropicalis* foram de 256 a 512µg/mL, e a CEM₈₀ foi de 512µg/mL, sendo que a maior concentração testada não foi suficiente para reduzir em 50% o biofilme de nove (75%) isolados, assim como não foi capaz de reduzir em 80% o biofilme de 10 (83,3%) isolados (Figura 29).

Figura 29 - Valores das CEMs de VOR para biofilmes dos isolados de *C. tropicalis*.

CEM₅₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 50% do biofilme; CEM₈₀ é a concentração mínima necessária para reduzir 80% do biofilme, em relação ao controle de crescimento, sem antifúngicos. Fonte: o autor

4.7 Testes de virulência, *in vivo*, em modelo experimental alternativo

A fim de avaliar o perfil de virulência, *in vivo*, de isolados de *C. albicans* com diferentes perfis de formação de biofilme *in vitro*, quatro isolados previamente classificados com alta formação e quatro isolados classificados como baixa formação de biofilme foram utilizados para infectar artificialmente larvas de *G. mellonella*. A infecção ocorreu no sexto ínstar, e foram utilizadas 10 larvas para cada grupo experimental. Utilizou-se como controle negativo do experimento um grupo de larvas inoculadas com PBS, as quais se mantiveram vivas, capazes de completar todo o ciclo natural de metamorfoses e sem alterações morfológicas, tais como melanização e necrose. O controle positivo foi um grupo inoculado com suspensão de *C. albicans* ATCC 14053, classificado como alto formador de biofilme.

Após 12 horas da infecção artificial, as larvas que receberam carga fúngica apresentaram redução da mobilidade e maior melanização, enquanto no grupo controle as larvas não apresentaram alterações quanto à mobilidade e melanização (Figura 30). Além disso, foi possível observar que os isolados de *C. albicans* com perfil de alta formação de biofilme apresentaram maior virulência, quando comparados aos isolados

com perfil de baixa formação de biofilme, de acordo com a curva de sobrevivência e diferenças estatísticas ($P < 0,05$).

As curvas de sobrevivência e morte das larvas infectadas por *C. albicans* estão representadas na figura 31.

Figura 30 - Diferenças macroscópicas entre os grupos controle e infectado.

Grupos: (a) controle PBS; e (b) grupo infectado por isolado de *C. albicans*, classificado como alto formador de biofilme. Fonte: o autor.

No grupo de isolados com perfil de alta formação de biofilme, os quatro isolados testados (1, 19, 29 e 58) apresentaram diferença significativa em relação a três dos quatro isolados do grupo com perfil de baixa formação de biofilme (27, 33 e 40), frente às taxas de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* (Figura 31).

Figura 31 - Curva de sobrevivência larval frente a isolados de *C. albicans*

Larvas de *G. mellonella* infectadas com isolados de *C. albicans*: (a) com perfil de alta formação de biofilme; e (b) com perfil de baixa formação de biofilme. Fonte: o autor.

DISCUSSÃO

5 Discussão

A identificação de fatores de risco associados à mortalidade, bem como o conhecimento da suscetibilidade aos antifúngicos dos isolados de um determinado local, podem apontar medidas terapêuticas e preventivas eficazes. Dos 70 episódios de candidemia, ocorridos entre Junho de 2014 a Outubro de 2015 em pacientes do HCFMRP-USP, a espécie mais isolada foi *C. albicans*, seguida por *C. glabrata*, *C. parapsilosis* (*sensu latu*) (sendo três isolados de *C. orthopsilosis*, espécie pertencente ao complexo *C. parapsilosis*) e *C. tropicalis*, a menos frequente. *C. albicans* é a espécie mais frequentemente isolada em todo o mundo, como mostram estudos realizados por Barchiesi e colaboradores (2015) na Itália, por Li e colaboradores (2015) na China, e por Nucci e colaboradores (2013) na América Latina. No presente estudo, a espécie não-*albicans* mais frequentemente isolada foi *C. glabrata*, diferente do que é relatado por outros autores. Um estudo realizado por Nucci e colaboradores (2013) mostrou que *C. parapsilosis* é a segunda espécie mais frequentemente isolada de episódios de candidemia no Brasil, seguida por *C. tropicalis*. Li e colaboradores (2015) reportaram *C. tropicalis* como a segunda espécie mais frequente em candidemia na China, seguida por *C. parapsilosis*. Entretanto, a maior proporção de casos de candidemia causados por *C. glabrata*, em países da América Latina, foi observada no Brasil. Alguns fatores que podem contribuir com as diferenças na distribuição das espécies de *Candida* são os padrões de terapia empírica e profilaxia local, além das variações nos grupos de pacientes de cada hospital (NUCCI et al., 2013). A prevalência das espécies do complexo *C. parapsilosis* está de acordo com outros estudos realizados no Brasil, onde *C. parapsilosis sensu stricto* é a mais prevalente, seguida por uma incidência relativamente alta da espécie *C. orthopsilosis*, que representou 21% dos isolados do complexo nesse estudo, e apesar do baixo número de isolados (n=3) não permitir muitas inferências, a proporção está de acordo com o relatado por outros autores. Em geral, a baixa frequência de isolamento da espécie *C. metapsilosis* pode estar relacionada à baixa virulência dessa espécie (ZICCARDI et al., 2015), o que pode explicar o fato de não haver nenhum isolado dessa espécie no presente estudo.

No presente estudo, 55,7% dos pacientes acometidos por candidemia foram do sexo masculino, o que corrobora com estudos anteriores (NUCCI et al., 2013; BARCHIESI et al., 2015; LI et al., 2015).

Entre os fatores de risco investigados, o mais frequente foi o uso de antibióticos prévio ao episódio de candidemia, que esteve em 85,7% dos pacientes, seguido pelo uso de sonda vesical, que foi observado em 68,6% dos pacientes. Acesso venoso central ocorreu em 55,7% dos pacientes, cirurgia ocorreu em 54,3% dos pacientes, e nutrição parenteral em 44,3%. O fator de risco menos frequente foi neutropenia, presente em 12,9% dos pacientes. Os resultados estão de acordo com os de Nucci e colaboradores (2013), que observaram que antibioticoterapia esteve presente em 94,5% dos pacientes acometidos por candidemia, o fator de risco mais frequente no estudo. Segundo os autores, acesso venoso central esteve em 71,9% dos pacientes, cirurgia em 43,8%, nutrição parenteral em 28,6% e neutropenia foi observado em 8,5% dos pacientes. Li e colaboradores (2015) observaram que 78,8% dos pacientes internados em UTI que tiveram candidemia fizeram uso de cateter ureteral.

No presente estudo, a maior taxa de pacientes que tiveram desfecho negativo (óbito) foi observada em pacientes acometidos por *C. glabrata*, seguidos por *C. tropicalis*, *C. albicans* e a menor mortalidade em pacientes acometidos por *C. parapsilosis* (*sensu lato*), resultados que diferem dos observados por outros autores. Barchiesi e colaboradores (2015) observaram que a maior taxa de pacientes com desfecho negativo (óbito), em um hospital terciário na Itália, veio de pacientes infectados com *C. albicans*, enquanto taxas mais baixas foram observadas em pacientes infectados por *C. tropicalis* e espécies menos comuns como *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. lusitaniae*. Essas diferenças podem ser atribuídas às características dos isolados, como suscetibilidade aos antifúngicos utilizados na terapêutica e fatores de virulência, as quais podem influenciar no desfecho clínico dos pacientes acometidos por candidemia. Mesmo não tendo a capacidade de produzir hifas, *C. glabrata* possui diversos fatores de virulência que tornam essa espécie muito agressiva (RODRIGUES et al., 2016).

A suscetibilidade dos isolados clínicos de *Candida* spp., em crescimento planctônico, aos antifúngicos AMB, CAS, FLC e VOR foi avaliada utilizando a

metodologia de microdiluição em caldo e os valores de pontos de corte determinados pelo CLSI. Um isolado de *C. albicans* apresentou resistência ao FLC e VOR; todos os isolados de *C. glabrata* e um isolado de *C. parapsilosis* foram considerados suscetíveis dose dependente ao FLC. Ainda, dois isolados de *C. glabrata* foram suscetíveis dose dependente à CAS, e um isolado de *C. tropicalis* foi suscetível dose dependente ao VOR. A espécie *C. albicans* é naturalmente suscetível a todos os antifúngicos sistêmicos, porém casos de resistência adquirida aos azóis têm sido reportados em pacientes que tiveram exposição prolongada a esses antifúngicos (COLOMBO et al., 2013). *C. glabrata* e *C. parapsilosis* são as espécies mais prevalentes com suscetibilidade reduzida aos azóis e às equinocandinas, respectivamente (ARENDRUP, 2014). *C. glabrata* possui intrínseca suscetibilidade reduzida ao FLC, e o uso difundido desse antifúngico pode estar relacionado ao aumento da incidência dessa espécie. Resistência de *Candida* spp. às equinocandinas é pouco frequente, contudo, está ocorrendo um aumento no isolamento de *C. glabrata* resistente às equinocandinas, e alguns isolados exibem resistência cruzada aos azóis. Resistência aos antifúngicos pode ocorrer como resultado da seleção de linhagens intrinsecamente menos suscetíveis ou resultado de resistência adquirida durante terapias. Os mecanismos de resistência incluem a modificação de alvos, reduzida absorção das drogas e ativação de bombas de efluxo. A resistência adquirida é menos comum, já que os fungos não realizam troca de genes de resistência via plasmídeos (ARENDRUP, 2014; PERLIN; SHOR; ZHAO, 2015).

O crescimento em biofilme confere vantagens para os micro-organismos, as quais incluem resistência aos agentes antimicrobianos, virulência aumentada, proteção contra as defesas do hospedeiro, entre outras. Por isso, biofilme é o principal modo de crescimento de vários fungos que são micro-organismos oportunistas, como as leveduras do gênero *Candida* (MELLO et al., 2016). Acredita-se que a maioria das infecções causadas por *Candida* spp. envolva a formação de biofilme na superfície de tecidos e em implantes médicos (ROSATO et al., 2016). No presente estudo, foi avaliada a capacidade de formação de biofilme por isolados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata*, complexo *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, utilizando a quantificação da atividade metabólica (XTT) e da biomassa (CV). Em relação à biomassa total, isolados de *C.*

albicans e *C. tropicalis* apresentaram os maiores valores de biomassa, sem diferença significativa entre si, enquanto isolados do complexo *C. parapsilosis* apresentaram as menores quantidades. Quando a atividade metabólica foi avaliada, isolados de *C. albicans* e *C. glabrata* apresentaram os maiores valores de atividade metabólica, e isolados de *C. parapsilosis* apresentaram os menores, sendo essa espécie a única que apresentou isolados classificados como não formador de biofilme. Contudo, a quantificação pelo CV sugere que haja biomassa fúngica aderida nesses isolados de *C. parapsilosis*, mesmo com baixa atividade metabólica. Outros autores também reportaram a espécie *C. parapsilosis* como a mais frequente não formadora de biofilme entre outras espécies não-*albicans* (PANNANUSORN; FERNANDEZ; ROMLING, 2013). Além disso, a literatura mostra que a formação de biofilme por *C. parapsilosis* é fortemente dependente da linhagem (KAWAI; YAMAGISHI; MIKAMO, 2015). Ainda, existem estudos mostrando que resultados contraditórios são encontrados quando a capacidade de formação de biofilme por espécies do complexo *C. parapsilosis* é avaliada (ZICCARDI et al., 2015). Simitsopoulou e colaboradores (2013) também encontraram isolados de *C. parapsilosis* como os mais baixos formadores de biofilme, comparados a outras espécies de *Candida*. Esses autores sugeriram que a produção de biofilme é espécie-dependente. Imagens de microscopia eletrônica de varredura, do mesmo autor, mostraram que biofilmes de *C. tropicalis* apresentam alta quantidade de forma filamentosa, enquanto biofilmes de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* são compostos de leveduras e algumas pseudo-hifas. Silva e colaboradores (2009) descreveram que biofilmes de *C. glabrata* apresentam menor biomassa quando comparados com *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Contudo, deve-se considerar que a metodologia utilizada nesse estudo quantifica biofilmes de 24 horas, enquanto outros autores utilizam 48 ou até 72 horas de crescimento. As diferenças no tempo de crescimento, na concentração do inóculo, no material utilizado como superfície e ainda nos meios de cultura utilizados em diferentes trabalhos podem contribuir para os resultados diferentes.

No presente estudo, diferenças na quantificação de biofilme pelos dois métodos utilizados, o XTT e o CV, foram maiores entre as espécies *C. albicans* e *C. tropicalis*. Para os isolados do complexo *C. parapsilosis* e, principalmente, de *C. glabrata*, os

valores de XTT e CV foram mais próximos. Melo e colaboradores (2011) sugerem que as diferenças podem ser explicadas pela diferença no princípio de cada método utilizado, já que o XTT quantifica as células fúngicas metabolicamente ativas, enquanto o CV quantifica toda a massa fúngica aderida. A formação de hifas por *C. albicans* e *C. tropicalis* pode contribuir para as mais altas quantidades de biomassa total, quando comparadas às outras espécies, enquanto que os valores de XTT mostram variadas atividades metabólicas entre as espécies. Ainda, para *C. glabrata*, espécie que não apresenta polimorfismo, os valores baixos de CV eram esperados, mesmo com alta atividade metabólica. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura, realizadas por Silva e colaboradores (2009) para examinar a estrutura de biofilmes de *Candida* spp., mostraram que biofilmes de todas as linhagens de *C. glabrata*, utilizadas no estudo, foram constituídos apenas por células leveduriformes; enquanto biofilmes de *C. parapsilosis* foram compostos por leveduras e pseudo-hifas, e biofilmes de algumas linhagens de *C. tropicalis* apresentaram leveduras e hifas. Sabendo-se que a suscetibilidade aos antifúngicos e ao sistema imunológico pode variar de acordo com as diferenças na arquitetura dos biofilmes (PANNANUSORN; FERNANDEZ; ROMLING, 2013), no presente estudo, biofilmes de isolados clínicos selecionados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, classificados como alto e baixo formadores de biofilme, foram visualizados por microscopia eletrônica de varredura. As micrografias mostraram diferenças visuais compatíveis com essa classificação, que se baseia na atividade metabólica. Nos biofilmes dos isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* com alta formação de biofilme, foram observados emaranhados de hifas e blastoconídios, o que está em acordo com os valores de XTT e CV obtidos para os isolados dessas espécies. As micrografias dos biofilmes de *C. glabrata* mostraram apenas blastoconídios, o que está em acordo com os baixos valores de biomassa e altos valores de atividade metabólica para isolados dessa espécie. Em relação às micrografias de biofilmes de isolados do complexo *C. parapsilosis*, foi observada pouca cobertura da superfície de poliestireno por células fúngicas, o que está de acordo com os valores de biomassa e atividade metabólica, sendo que nenhum isolado desse complexo foi classificado como alto formador de biofilme, e a maioria dos isolados foi classificada como não formador de biofilme.

Quando em biofilme, os micro-organismos possuem características fenotípicas diferentes quando comparados ao crescimento planctônico, como proteção aos mecanismos de defesa do hospedeiro e aos antifúngicos. Por isso, a formação de biofilme possui papel importante no desenvolvimento de infecções (SARDI et al., 2014). Infecções relacionadas a biofilmes de *Candida* spp., quando não tratadas corretamente, podem levar a infecções fúngicas invasivas e infecções na corrente sanguínea, com alto risco de mortalidade (TAFF et al., 2013). Resistência em biofilmes é um fenômeno multifatorial relacionado à limitada penetração e difusão dos antifúngicos na estrutura multicelular, à presença de células “persistir” resistentes, e à expressão de bombas de efluxo (MELLO et al., 2016). Mesmo que muitos avanços no entendimento de biofilmes de *Candida* spp. tenham sido alcançados nos últimos anos, ainda existem grandes desafios, dos quais podem ser citados: obstáculos por parte regulatória que impedem ensaios clínicos para avaliação de novos agentes a serem utilizados em infecções relacionadas a biofilmes; a falta de um método de referência para determinação da suscetibilidade de biofilmes aos antimicrobianos; e a falta de estratégias definidas para o tratamento de pacientes com infecções associadas a biofilmes (GHANNOUM et al., 2015).

No presente estudo, a suscetibilidade de biofilmes dos isolados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata*, complexo *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* frente aos antifúngicos utilizados no tratamento de candidemia, foi analisada. Ao contrário do que foi observado em células planctônicas, quando em biofilme, a maioria dos isolados clínicos foi resistente aos antifúngicos testados, considerando-se os valores de pontos de corte determinados pelo CLSI para células planctônicas, já que não há, até então, valores estabelecidos para biofilmes fúngicos. Para isso, biofilmes maduros (24h) foram expostos aos antifúngicos AMB, CAS, FLC e VOR e as concentrações mínimas capazes de erradicar 50% e 80% dos biofilmes foram determinadas. Dos resultados encontrados, AMB mostrou atividade fungicida contra biofilmes de *Candida* spp., sendo os biofilmes de 96% dos isolados de *C. albicans*, e 100% dos isolados de *C. glabrata*, erradicados em 80% com concentrações de quatro a 16 vezes as CIM para células planctônicas. Por outro lado, para *C. tropicalis* e isolados do complexo *C. parapsilosis*, alguns isolados necessitaram de concentrações maiores que 100 vezes das utilizadas

para inibir o crescimento de células planctônicas. Melo e colaboradores (2011) reportaram que biofilmes de *C. parapsilosis* foram menos suscetíveis à AMB, entre outras espécies estudadas. Estudos mostram que biofilmes de *Candida* spp. podem ser até oito vezes mais resistentes à AMB do que suas células planctônicas. O problema que envolve o uso deste antifúngico para tratamento de biofilmes é sua estreita janela terapêutica, sendo assim, doses de AMB necessárias para erradicar biofilmes de *Candida* spp. podem não ser seguras para o paciente (TAFF et al., 2013; EL-AZIZI; FARAG; KHardori, 2015).

Em relação ao antifúngico CAS, concentrações relativamente baixas, foram suficientes para erradicar em 80% os biofilmes de todos os isolados de *C. glabrata* e de 83% dos isolados de *C. tropicalis*, sendo essas concentrações até 16 vezes as CIM para células planctônicas. Para os isolados de *C. albicans* e isolados do complexo *C. parapsilosis*, alguns isolados requereram concentrações maiores que 1000 e 100 vezes, respectivamente, para inibição dos biofilmes em relação às células planctônicas. Simitsopoulou e colaboradores (2013) também relataram que biofilmes de *C. parapsilosis* foram menos suscetíveis às equinocandinas. Ainda que estudos tenham mostrado alta atividade de CAS contra biofilmes de diversas espécies do gênero *Candida* (MAIOLO et al., 2014), no presente estudo, biofilmes de alguns dos isolados de *C. albicans* não foram reduzidos em 80% com a maior concentração testada. Alguns autores reportaram que biofilmes são de duas a 20 vezes mais resistentes à CAS do que as respectivas células planctônicas. As equinocandinas, representadas por CAS nesse estudo, possuem um conhecido efeito paradoxal onde *Candida* spp. se tornam resistentes a altas concentrações desse antifúngico *in vitro*. Tal efeito foi observado no presente estudo e pode ser uma das explicações para as altas concentrações de CAS necessárias para erradicar os biofilmes de alguns dos isolados clínicos. A relevância clínica desse efeito ainda não foi determinada (TAFF et al., 2013; MAIOLO et al., 2014).

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que, no geral, FLC e VOR não possuem ação eficaz contra biofilmes de *Candida* spp.. Em biofilmes de *C. albicans* e *C. tropicalis*, as maiores concentrações testadas não foram capazes de reduzir consideravelmente os biofilmes da maioria dos isolados, e em *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, foram necessárias concentrações de 2 a 256 vezes maiores de FLC, e de

4 a mais de 1000 vezes maiores de VOR, quando comparadas às CIMs para células planctônicas. Os resultados encontrados estão de acordo com os de outros estudos, que demonstraram que os antifúngicos FLC e VOR, da classe dos azóis, não são eficientes contra biofilmes de *Candida* spp. (MELO et al., 2011 ; TAFF et al., 2013 ; MAIOLO et al., 2014; EL-AZIZI; FARAG; KHardORI, 2015; ZICCARDI et al., 2015). A resistência de biofilmes de *Candida* spp. aos novos triazóis, como voriconazol, tem sido descrita. Esses antifúngicos possuem amplo espectro de ação, além de ação fungicida, e as falhas na terapia antifúngica podem levar a infecções crônicas (ROSATO et al., 2016).

Com o intuito de investigar a hipótese de que diferenças na formação de biofilme poderiam resultar em diferenças na patogenicidade de isolados clínicos de *C. albicans*, foram realizados testes de virulência *in vivo* no hospedeiro invertebrado *G. mellonella*. As larvas desse inseto têm sido utilizadas como modelo para estudar a patogenicidade de isolados clínicos de leveduras, mostrando resposta imune similar à de mamíferos (BORGHI et al., 2014; HIRAKAWA et al., 2015). No presente estudo, dois grupos foram avaliados: um grupo de isolados classificados como alta formação de biofilme, e um grupo de isolados classificados como baixa formação de biofilme, de acordo com a quantificação da atividade metabólica, utilizando XTT. Foi possível observar sinais macroscópicos de melanização, o que indicou a rápida progressão da invasão fúngica. A melanização é resultante de um processo de defesa dos insetos, que visa limitar o crescimento do patógeno (BORGHI et al., 2014). Os resultados mostraram que *C. albicans* é um fungo patogênico no modelo experimental *G. mellonella* e, nesse estudo, os isolados classificados como alto formador de biofilme foram mais virulentos ao inseto. Embora os resultados obtidos não sejam suficientes para uma conclusão clara, pois os dois grupos apresentaram isolados mais virulentos e menos virulentos, uma tendência de maior virulência no grupo de isolados classificados com alta formação de biofilme pôde ser observada. Em estudo com o mesmo modelo experimental, Borghi e colaboradores (2014) observaram que isolados de *C. albicans* formadores de biofilme resultaram em morte larval mais rapidamente que isolados não formadores de biofilme e, ainda, foram responsáveis por maior invasão tecidual do hospedeiro. Segundo os mesmo autores, esse tipo de modelo alternativo representa uma maneira relativamente

fácil e barata de estudar biofilmes de *C. albicans* e entender melhor esse importante fator de virulência.

Embora alguns dados estejam em concordância com estudos realizados em outros locais no Brasil ou no mundo, existem dados discrepantes quanto à prevalência das espécies e capacidade de formação de biofilme pelos isolados de *Candida* spp., o que demonstra que a distribuição das espécies de *Candida*, bem como o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos e características dos isolados clínicos varia de acordo com os locais e as práticas médicas. Além disso, a determinação da suscetibilidade de biofilmes de *Candida* spp., aos antifúngicos, é importante para avanços nas terapias de infecções associadas a biofilmes. Sendo assim, esse estudo poderá contribuir para o direcionamento de tratamentos, com resultados que refletem a influência da formação de biofilme na suscetibilidade dos isolados aos antifúngicos comumente utilizados na prática médica, e poderá apontar pontos críticos para o controle da candidemia no HCFMRP-USP.

CONCLUSÃO

6 Conclusão

Os resultados obtidos apontaram as seguintes conclusões:

- *C. albicans* é a espécie mais frequente causadora de candidemia no hospital estudado;
- A taxa de mortalidade nos pacientes acometidos por candidemia é elevada;
- Os isolados clínicos de *Candida* spp. são, em sua maioria, produtores de biofilme, um importante fator de virulência que pode ser a fonte de infecções crônicas ou recorrentes;
- Alguns isolados de *Candida* spp. apresentam baixa suscetibilidade aos antifúngicos CAS, FLC e VOR. Um isolado de *C. albicans* apresentou resistência aos antifúngicos FLC e VOR, o que destaca a importância do monitoramento de resistência aos antifúngicos utilizados no tratamento de candidemia.
- A formação de biofilme causa impacto na suscetibilidade aos antifúngicos, levando à resistência, principalmente aos azóis, o que demonstra a importância de pesquisas direcionadas à prevenção e controle dessas comunidades microbianas na clínica.
- A capacidade de alta formação de biofilme por isolados de *C. albicans* pode influenciar na virulência *in vivo* no modelo experimental *G. mellonella*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas¹

ARENDRUP, M. C. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* e *Candida*. **Clinical Microbiology and Infection**. v.20,s.6, p.42-48, 2014.

AKBARI, F.; KJELLERUP, B. V. Elimination of Bloodstream Infections Associated with *Candida albicans* Biofilm in Intravascular Catheters. **Pathogens**. v.4, p.457-469, 2015. doi:10.3390/pathogens4030457.

BARCHIESI, F. et al. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia in a tertiary referral center in Italy from 2010 to 2014. **Infection**, 2015. doi: 10.1007/s15010-015-0845-z.

BETTIO, G.S. Estudo da aderência e formação de biofilme de *Candida* spp. em cateter urinário confeccionado em látex siliconizado e silicone total. 2010. 129f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química da Universidade de São Carlos da Universidade de São Paulo, Universidade de São Carlos, São Carlos, 2010.

BORGHI, E. et al. Correlation between *Candida albicans* biofilm formation and invasion of the invertebrate host *Galleria mellonella*. **Future Microbiology**. v.9, n.2, p.163-173, 2014. ISSN 1746-0913.

BUENO, J. Anti-Biofilm Drug Susceptibility Testing Methods: Looking for New Strategies Against Resistance Mechanism. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**. v.3, n4, 2014.

CHAHOU, J.; KANAFANI, Z. A.; KANJ, S. S. Management of candidemia and invasive candidiasis in critically ill patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.42, p.29-35, 2013.

CHAMILOS, G., et al.. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. **Lancet Infectious Diseases**. v.7, p.42-55, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Approved Standard M27-A3. 3 ed. v.28, n.14, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Fourth Informational Supplement M27-S4. v.32, 2012.

¹ De acordo com a Associação de Normas Técnicas. NBR 6023

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing. 1st Edition.** CLSI Supplement M59. v.36, n.7, 2016.

COLOMBO, A.L. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.3, n.17, p.283-312, 2013.

DE ALMEIDA, B. M. et al. Positive tip culture with *Candida* and negative blood culture: to treat or not to treat? A systematic review with meta-analysis. **Scand J Infect Dis**, v. 46, n. 12, p. 854-61, Dec 2014. ISSN 1651-1980.

EL-AZIZI, M.; FARAG, N.; KHardORI, N. Antifungal activity of amphotericin B and voriconazole against the biofilms and biofilm-dispersed cells of *Candida albicans* employing a newly developed in vitro pharmacokinetic model. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v.14, n.21, 2015. DOI 10.1186/s12941-015-0083-3.

DEORUKHKAR, S.; SANTOS, S. Virulence Markers and Antifungal Susceptibility Profile of *Candida glabrata*: An Emergin Pathogen. **British Microbiology Research Journal**. v.4, p.39-49, 2014.

FAUVART, M. Role of persisters cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persisters therapies. **Journal of Medical Microbiology**. v.60, p.699-709, 2011.

FENG, X. et al. Identification and differentiation of *Candida parapsilosis* complex species by use of exon-primed intron-crossing PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1758-61, 2014.

FERREIRA, A.V. et al. *Candida albicans* and non-*C. albicans* *Candida* species: Comparison of biofilm production and metabolic activity in biofilms, and putative virulence properties of isolates from Hospital Environments and Infections. **Mycopathologia**, v.175, n.3-4, p.265-272, 2013.

FUCHS, B. B. et al. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. **Virulence**. v.1, n.6, p.475-482, 2010. DOI: 10.4161/viru.1.6.12985

GHANNOUM, M. et al. The role of echinocandins in *Candida* biofilm-related vascular catheter infections: in vitro and in vivo model systems. **Clinical Infectious Diseases**. v.61, S6, p.618-621, 2015.

GIRI, S; KINDO, A. J. A review of *Candida* species causing blood stream infection. **Indian Journal of Medical Microbiology** [serial online].v.30, n.3, p.270-278, 2012.

- GU, W.; XU, D.; SUN, S. *In vitro* models to study *Candida albicans* biofilms. **Journal of Pharmaceutics & Drug Development**. v.3, 2015. ISSN: 2348-9782
- HE, M.et al. *In vitro* activity of eugenol against *C. albicans* biofilms. **Mycopathologia**. v.163, p.137-143, 2007. doi 10.1007/s11046-007-0097-2
- HIRAKAWA, M. P. et al. Genetic and phenotypic intra-species variation in *Candida albicans*. **Genome Research**. v.25, p.413-425, 2015. ISSN 1088-9051/15
- JACOBSEN, I. D. *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. **Virulence**. v.5, n.2, p.237-239, 2014. DOI: 10.4161/viru.27434
- KAWAI, A.; YAMAGISHI, Y.; MIKAMO, H. In vitro efficacy of liposomal amphotericin B, micafingn and fluconazole against non-*albicans Candida* species biofilm. **Journal of Infection and Chemotherapy**. 2015. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2015.05.007>>. Acesso em 20 jul 2015.
- LEVI et al. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. **Clinical Infectious Disiases**. v.26, p.1086-1088, 1998.
- LI, C. et al. The Differences in the Epidemiology and Predictors of Death between Candidemia Acquired in Intensive Care Units and Other Hospital Settings. **Internal Medicine**. v.54, p.3009-3016, 2015. doi: 10.2169/internalmedicine.54.3744.
- MAIOLO, E. M. Activities of fluconazole, caspofungin, anidulafungin, and amphotericin B on planktonic and biofilm *Candida* species determined by microclorimetry. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.58, n.5, p.2709-2717, 2014.
- MALANI, A. et al. *Candida glabrata* fungemia: Experience in a Tertiary Care Center. **Clinical Infectious Disiases**. v.41, p.975-981, 2005.
- MATTEI, A. S. et al. Sensibilidad de aislamientos de *Candida albicans* de hemocultivos a 3 fármacos: estudio retrospectivo en Rio Grande do Sul, Brasil, 1999 a 2009. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1130140613000223>>. Acesso em: 7 ago. 2013.
- MARTÍNEZ, J. M. et al. Identification of pathogenic yeast species by polymerase chain reaction amplification of the RPS0 gene intron fragment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 6, p. 1917-27, Jun 2010. ISSN 1365-2672.
- MELLO, T. P. et al. Assessment of biofilm formation by *Scedosporium apiospermum*, *S. aurantiacum*, *S. minutisporum* and *Lomentospora prolificans*. **Biofouling**. v.32, n.7, p.737-749, 2016. doi: 10.1080/08927014.2016.1192610

MELO, A. S. et al. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. Isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. **Medical Mycology**. v.49, p.253-262, 2011.

MONTEIRO, D. R. et al. Adhesion of *Candida* biofilm cells to human epithelial cells and polystyrene after treatment with silver nanoparticles. **Colloids and Biosurfaces B: Biointerfaces**. v.114, p. 410-414, 2014.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M.A. Microbiologia médica. 6 ed. Traduzida, c.74. São Paulo: **Elsevier**, 2010.

NEPPELENBROEK, K.H. et al. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. **Oral Diseases**, 2013. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/odi.12123/full>>. Acesso em 5 nov. 2015.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **Plos One**, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0059373.

PANNANUSORN, S. ; FERNANDEZ, V.; RÖMLING, U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candia* species causing bloodstream infection. **Mycoses: Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases**. v.56, p.264-272, 2013.

PERLIN, D. S.; SHOR, E.; ZHAO, Y. Update on antifungal drug resistance. **Current Clinical Microbiology Rpt**. v.2, p. 84-95, 2015.

PFALLER M. A., et al. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Posaconazole and Voriconazole and *Candida* spp . as Determined by 24-Hour CLSI Broth Microdilution. **Journal of Clinical Microbiology**. v.48, n.3. p.630-637, 2011. doi:10.1128/JCM.02161-10.

PIERCE, C. G. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**. v.3, n.9, 1494-1500, 2008. doi: 10.1038/nprot.2008.141

PIERCE, C. G. et al. A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Journal of Visualized Experiments**. v.44, e.2287, 2010. Disponível em: < <http://www.jove.com/details.php?id=2287>>. Acesso em: 20 nov. 2014.

PRESS, E.G.; SHIELDS, R.K.; CLANCY, C. J. *Candida* Biofilm: Clinical Implications of Recent Advances in Research. **Current Fungal Infection Reports**. v.8, p.72-80, 2014.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidemia in invasive candidiasis. **Revista Iberoamericana de Micología**. v.31, n.1, p.42-48, 2014.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

RENK, H. et al. *Enterococcus faecium* Mediastinitis Complicated by Disseminated *Candida parapsilosis* Infection after Congenital Heart Surgery in a 4-Week-old Baby. **Case Reports in Infectious Diseases**. DOI: 10.1155/2015/543685, 2015.

RODRIGUES, C. F. et al. *Candida glabrata*'s recurrent infections : biofilm formation during Amphotericin B treatment. **Letters in Applied Microbiology**. v.63, p.77-81, 2016. ISSN 0266-8254.

ROSATO, A. et al. In vitro interactions between anidulafingina and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms of *Candida* spp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.24, p.1002-1005, 2016.

SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species : current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**. v.62, p.10-24, 2013.

SARDI, J. C. O. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micología**. v.31, n.1, p. 22-29, 2014.

SILVA, S. et al. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, n.47, p.681-689, 2009.

SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, n.36, p. 288-305, 2012.

SIMITSOPOULOU, M. et al. Species-Specific and Drug-Specific Differences in Susceptibility of *Candida* Biofilms to Echinocandins: Characterization of Less Common Bloodstream Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.57, n.6, p.2562-2570, 2013.

TAFF, H. T. et al. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future Microbiology**. v.8, n.10. p.1325-1337, 2013.

TRABULSI, L. R.; ALTEERTHUM, F. Microbiologia. 5 ed. São Paulo: **Atheneu**, 2008.

TREVIÑO-RANGEL, R. J. et al. Biofilm formation and genetic variability of BCR1 gene in the *Candida parapsilosis* complex. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2015.

ZICCARDI, M. et al. *Candida parapsilosis* (*sensu lato*) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. **International Journal of Medical Microbiology**. v.305, p.848-859, 2015.

Apêndices

Apêndice A - Lista dos isolados utilizados no estudo

Número do isolado	Espécie	Número por espécie	Ano de isolamento
1	<i>C. albicans</i>	1	2014
2	<i>C. albicans</i>	2	2014
3	<i>C. albicans</i>	3	2014
4	<i>C. albicans</i>	4	2014
5	<i>C. parapsilosis</i>	1	2014
6	<i>C. glabrata</i>	1	2014
7	<i>C. glabrata</i>	2	2014
8	<i>C. albicans</i>	5	2014
9	<i>C. parapsilosis</i>	2	2014
10	<i>C. albicans</i>	6	2014
11	<i>C. tropicalis</i>	1	2014
12	<i>C. albicans</i>	7	2014
13	<i>C. albicans</i>	8	2014
14	<i>C. tropicalis</i>	2	2014
15	<i>C. albicans</i>	9	2014
16	<i>C. glabrata</i>	3	2014
17	<i>C. tropicalis</i>	3	2014
18	<i>C. albicans</i>	10	2014
19	<i>C. albicans</i>	11	2014
20	<i>C. glabrata</i>	4	2014
21	<i>C. glabrata</i>	5	2014
22	<i>C. tropicalis</i>	4	2014
23	<i>C. albicans</i>	12	2014
24	<i>C. glabrata</i>	5	2014
25	<i>C. glabrata</i>	7	2014
26	<i>C. tropicalis</i>	5	2014
27	<i>C. albicans</i>	13	2014
28	<i>C. glabrata</i>	8	2014
29	<i>C. albicans</i>	14	2015
30	<i>C. parapsilosis</i>	3	2015
31	<i>C. parapsilosis</i>	4	2015
32	<i>C. albicans</i>	15	2015
33	<i>C. albicans</i>	16	2015
34	<i>C. tropicalis</i>	6	2015
35	<i>C. glabrata</i>	9	2015
36	<i>C. parapsilosis</i>	5	2015
37	<i>C. tropicalis</i>	7	2015
38	<i>C. albicans</i>	17	2015
39	<i>C. parapsilosis</i>	6	2015

40	<i>C. albicans</i>	18	2015
41	<i>C. albicans</i>	19	2015
42	<i>C. orthopsilosis</i>	1/7	2015
43	<i>C. albicans</i>	20	2015
44	<i>C. parapsilosis</i>	7/8	2015
45	<i>C. albicans</i>	21	2015
46	<i>C. glabrata</i>	10	2015
47	<i>C. parapsilosis</i>	8/9	2015
48	<i>C. glabrata</i>	11	2015
49	<i>C. parapsilosis</i>	9/10	2015
50	<i>C. glabrata</i>	12	2015
51	<i>C. albicans</i>	22	2015
52	<i>C. parapsilosis</i>	10/11	2015
53	<i>C. albicans</i>	23	2015
54	<i>C. albicans</i>	24	2015
55	<i>C. tropicalis</i>	8	2015
56	<i>C. albicans</i>	25	2015
57	<i>C. orthopsilosis</i>	2/12	2015
58	<i>C. albicans</i>	26	2015
59	<i>C. tropicalis</i>	9	2015
60	<i>C. albicans</i>	27	2015
61	<i>C. albicans</i>	28	2015
62	<i>C. tropicalis</i>	10	2015
63	<i>C. orthopsilosis</i>	3/13	2015
64	<i>C. tropicalis</i>	11	2015
65	<i>C. glabrata</i>	13	2015
66	<i>C. parapsilosis</i>	11/14	2015
67	<i>C. albicans</i>	29	2015
68	<i>C. albicans</i>	30	2015
69	<i>C. albicans</i>	31	2015
70	<i>C. tropicalis</i>	12	2015

Os isolados do complexo *C. parapsilosis* são numerados por espécie e como um complexo.
 Fonte: o autor.

Apêndice B – Valores de CIM e CEM dos antifúngicos AMB e CAS.

Isolado	Espécie	CIM AMB (µg/mL)	CEM ₅₀ AMB (µg/mL)	CEM ₈₀ AMB (µg/mL)	CIM CAS (µg/mL)	CEM ₅₀ CAS (µg/mL)	CEM ₈₀ CAS (µg/mL)
1	<i>C. albicans</i>	1	0,5	8	0,25	0,125	0,25
2	<i>C. albicans</i>	1	0,25	8	0,125	1	>256
3	<i>C. albicans</i>	1	0,5	16	0,125	0,125	256
4	<i>C. albicans</i>	0,5	0,25	8	0,125	0,125	0,25
5	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	-*	-	1	-	-
6	<i>C. glabrata</i>	1	2	8	0,25	0,125	0,125
7	<i>C. glabrata</i>	1	2	8	0,25	0,125	0,25
8	<i>C. albicans</i>	0,5	0,25	8	0,125	0,125	>256
9	<i>C. parapsilosis</i>	1	128	128	0,25	8	128
10	<i>C. albicans</i>	1	0,25	16	0,125	0,25	>256
11	<i>C. tropicalis</i>	0,25	4	16	0,0625	0,25	1
12	<i>C. albicans</i>	1	4	8	0,125	0,125	0,25
13	<i>C. albicans</i>	1	0,25	4	0,0625	0,125	0,125
14	<i>C. tropicalis</i>	1	4	32	0,0625	0,125	0,25
15	<i>C. albicans</i>	0,5	0,0625	16	0,125	0,125	>256
16	<i>C. glabrata</i>	1	4	16	0,125	0,125	0,125
17	<i>C. tropicalis</i>	1	4	16	0,125	1	1
18	<i>C. albicans</i>	0,5	0,0625	16	0,0625	0,125	256
19	<i>C. albicans</i>	1	0,125	8	0,125	0,25	256
20	<i>C. glabrata</i>	1	0,25	2	0,015	0,25	0,25
21	<i>C. glabrata</i>	1	0,5	2	0,125	0,25	0,25
22	<i>C. tropicalis</i>	0,5	4	32	0,0625	0,5	1
23	<i>C. albicans</i>	1	0,25	4	0,125	0,5	>256
24	<i>C. glabrata</i>	1	2	2	0,0625	0,25	0,25
25	<i>C. glabrata</i>	1	1	4	0,125	0,25	0,25
26	<i>C. tropicalis</i>	0,25	2	16	0,125	0,5	1
27	<i>C. albicans</i>	0,5	0,125	8	0,0625	0,125	256
28	<i>C. glabrata</i>	1	1	2	0,0313	0,125	0,125
29	<i>C. albicans</i>	1	0,25	8	0,25	0,125	256
30	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	-	-	0,5	-	-
31	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	-	-	0,5	-	-
32	<i>C. albicans</i>	1	0,125	4	0,25	0,125	1
33	<i>C. albicans</i>	0,5	0,25	8	0,125	0,25	4
34	<i>C. tropicalis</i>	0,5	4	16	0,125	0,5	1
35	<i>C. glabrata</i>	1	0,5	4	0,0625	0,25	0,25
36	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	16	128	1	1	2
37	<i>C. tropicalis</i>	1	2	16	0,0625	0,5	2
38	<i>C. albicans</i>	1	4	>64	0,0625	0,25	0,25
39	<i>C. parapsilosis</i>	1	-	-	0,5	-	-
40	<i>C. albicans</i>	0,5	4	8	0,25	0,25	0,25
41	<i>C. albicans</i>	1	0,25	8	0,0625	0,125	16
42	<i>C. orthopsilosis</i>	1	8	32	0,25	0,25	0,5

43	<i>C. albicans</i>	1	0,5	4	0,25	0,125	0,5
44	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	-	-	0,5	-	-
45	<i>C. albicans</i>	1	0,5	4	0,25	0,0625	0,5
46	<i>C. glabrata</i>	1	0,5	4	0,125	0,125	0,25
47	<i>C. parapsilosis</i>	1	128	128	0,25	8	128
48	<i>C. glabrata</i>	1	0,25	4	0,125	0,125	0,125
49	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	-	-	0,5	-	-
50	<i>C. glabrata</i>	1	0,25	4	0,125	0,125	0,25
51	<i>C. albicans</i>	1	8	16	0,25	0,5	256
52	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,5	4	0,5	0,5	2
53	<i>C. albicans</i>	1	8	16	0,125	2	256
54	<i>C. albicans</i>	0,5	8	16	0,0625	2	256
55	<i>C. tropicalis</i>	0,5	4	8	0,0625	0,5	2
56	<i>C. albicans</i>	0,5	0,25	16	0,125	0,25	2
57	<i>C. orthopsilosis</i>	0,5	1	8	0,125	2	128
58	<i>C. albicans</i>	1	0,5	8	0,0625	0,125	0,25
59	<i>C. tropicalis</i>	1	32	64	0,125	64	128
60	<i>C. albicans</i>	1	4	16	0,125	0,25	256
61	<i>C. albicans</i>	1	0,5	4	0,0625	0,25	8
62	<i>C. tropicalis</i>	1	4	8	0,0625	1	2
63	<i>C. orthopsilosis</i>	0,5	4	128	0,25	1	2
64	<i>C. tropicalis</i>	1	4	128	0,125	128	128
65	<i>C. glabrata</i>	1	0,25	4	0,125	0,125	0,125
66	<i>C. parapsilosis</i>	1	-	-	0,5	-	-
67	<i>C. albicans</i>	1	1	8	0,25	0,125	4
68	<i>C. albicans</i>	0,5	4	16	0,125	256	>256
69	<i>C. albicans</i>	1	4	16	0,125	0,5	256
70	<i>C. tropicalis</i>	1	32	128	0,0625	0,25	1

*Os isolados sem valores de CEM foram não formadores de biofilme. Fonte: o autor.

Apêndice C - Valores de CIM e CEM dos antifúngicos FLC e VOR.

Isolado	Espécie	CIM FLC (µg/mL)	CEM ₅₀ FLC (µg/mL)	CEM ₈₀ FLC (µg/mL)	CIM VOR (µg/mL)	CEM ₅₀ VOR (µg/mL)	CEM ₈₀ VOR (µg/mL)
1	<i>C. albicans</i>	0,125	1024	>2048	0,0313	32	>512
2	<i>C. albicans</i>	0,5	>2048	>2048	0,0313	>512	>512
3	<i>C. albicans</i>	0,125	>2048	>2048	0,0313	>512	>512
4	<i>C. albicans</i>	0,125	>2048	>2048	0,0313	>512	>512
5	<i>C. parapsilosis</i>	0,125	-*	-	0,0625	-	-
6	<i>C. glabrata</i>	4	>2048	>2048	0,125	128	>512
7	<i>C. glabrata</i>	4	256	>2048	0,0625	8	512
8	<i>C. albicans</i>	0,125	>2048	>2048	0,0313	>512	>512
9	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	2048	2048	0,0313	>512	>512
10	<i>C. albicans</i>	0,125	2048	>2048	0,0313	256	>512
11	<i>C. tropicalis</i>	0,25	2048	>2048	0,0313	512	512

12	<i>C. albicans</i>	0,125	2048	2048	0,0313	256	512
13	<i>C. albicans</i>	0,125	512	>2048	0,0313	32	512
14	<i>C. tropicalis</i>	0,125	2048	2048	0,0313	512	512
15	<i>C. albicans</i>	0,125	>2048	>2048	0,0313	>512	>512
16	<i>C. glabrata</i>	2	32	512	0,0625	8	16
17	<i>C. tropicalis</i>	0,125	>2048	>2048	0,0313	>512	>512
18	<i>C. albicans</i>	0,125	>2048	>2048	0,0313	>512	>512
19	<i>C. albicans</i>	0,125	10247	>2048	0,0313	256	>512
20	<i>C. glabrata</i>	2	>2048	>2048	0,0313	>512	>512
21	<i>C. glabrata</i>	2	4	16	0,0625	0,125	4
22	<i>C. tropicalis</i>	0,25	>2048	>2048	0,0313	>512	>512
23	<i>C. albicans</i>	0,125	>2048	>2048	0,0313	>512	>512
24	<i>C. glabrata</i>	2	8	128	0,0625	0,125	2
25	<i>C. glabrata</i>	2	64	>2048	0,0625	8	32
26	<i>C. tropicalis</i>	0,125	>2048	>2048	0,0313	>512	>512
27	<i>C. albicans</i>	0,125	2014	>2048	0,0313	256	>512
28	<i>C. glabrata</i>	2	4	>2048	0,0625	2	>512
29	<i>C. albicans</i>	0,125	>2048	>2048	0,0313	512	>512
30	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	-	-	0,0313	-	-
31	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	-	-	0,0313	-	-
32	<i>C. albicans</i>	0,125	2048	>2048	0,0313	>512	>512
33	<i>C. albicans</i>	0,125	2048	>2048	0,0313	256	>512
34	<i>C. tropicalis</i>	2	2048	>2048	0,0625	>512	>512
35	<i>C. glabrata</i>	2	2	16	0,0625	0,125	0,5
36	<i>C. parapsilosis</i>	1	2048	2048	0,0313	512	512
37	<i>C. tropicalis</i>	0,25	2048	>2048	0,0313	>512	>512
38	<i>C. albicans</i>	0,125	>2048	>2048	0,0313	512	>512
39	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	-	-	0,0313	-	-
40	<i>C. albicans</i>	0,125	2048	>2048	0,0313	512	>512
41	<i>C. albicans</i>	0,125	1024	>2048	0,0313	512	>512
42	<i>C. orthopsilosis</i>	0,5	2048	2048	0,0313	128	128
43	<i>C. albicans</i>	0,125	128	1024	0,0313	32	256
44	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	-	-	0,0313	-	-
45	<i>C. albicans</i>	0,125	>2048	>2048	0,0313	>512	>512
46	<i>C. glabrata</i>	4	128	>2048	0,0625	0,125	0,5
47	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	1024	2048	0,0313	512	512
48	<i>C. glabrata</i>	4	4	128	0,125	0,125	>512
49	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	-	-	0,0313	-	-
50	<i>C. glabrata</i>	4	4	4	0,0625	0,125	0,125
51	<i>C. albicans</i>	0,125	>2048	>2048	0,0313	>512	>512
52	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	64	128	0,0313	0,5	1
53	<i>C. albicans</i>	0,25	>2048	>2048	0,0313	512	>512
54	<i>C. albicans</i>	0,125	2048	>2048	0,0313	512	>512
55	<i>C. tropicalis</i>	0,25	>2048	>2048	0,0313	>512	>512
56	<i>C. albicans</i>	0,125	1024	>2048	0,0313	>512	>512
57	<i>C. orthopsilosis</i>	0,5	128	1024	0,0313	32	128

58	<i>C. albicans</i>	0,125	1024	1024	0,0313	128	128
59	<i>C. tropicalis</i>	0,5	>2048	>2048	0,0313	>512	>512
60	<i>C. albicans</i>	0,125	64	>2048	0,0313	256	>512
61	<i>C. albicans</i>	0,125	1024	>2048	0,0313	128	>512
62	<i>C. tropicalis</i>	0,25	>2048	>2048	0,0313	>512	>512
63	<i>C. orthopsilosis</i>	0,5	32	64	0,0313	8	16
64	<i>C. tropicalis</i>	1	1024	>2048	0,25	>512	>512
65	<i>C. glabrata</i>	2	2	1024	0,0625	0,125	256
66	<i>C. parapsilosis</i>	4	-	-	0,0625	-	-
67	<i>C. albicans</i>	512	2048	>2048	128	256	512
68	<i>C. albicans</i>	0,125	1024	>2048	0,0313	256	>512
69	<i>C. albicans</i>	0,25	1024	>2048	0,0625	128	256
70	<i>C. tropicalis</i>	0,5	>2048	>2048	0,0313	256	>512

*Os isolados sem valores de CEM foram não formadores de biofilme. Fonte: o autor.

ANEXOS

Anexos

ANEXO A - Meios de Cultura

1. Meio YPD

Extrato de levedura (Medix).....	10g
Peptona (Himedia)	20g
Dextrose (Synth).....	20g
Água destilada.....	1L

Dissolver todos os componentes em 1L de água destilada. Autoclavar a 121°C, 1kgk/cm², por 20 minutos.

2. Meio Ágar Sabouraud Dextrose

Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid).....	65g
Água destilada.....	1L

Conforme a recomendação do fabricante, misturar o pó em água, aquecer até a fusão e distribuir em tubos. Autoclavar a 121°C, 1kgk/cm², por 20 minutos. Solidificar em posição inclinada e conservar em geladeira.

3. Meio RPMI 1640 tamponado com MOPS a 0,165M

RPMI 1640 (Sigma-Aldrich).....	10,4g
MOPS (Sigma-Aldrich).....	34,53g
Água destilada.....	1L

Dissolver o RPMI 1640 e o tampão MOPS em 900 mL de água, sob agitação constante. Ajustar o pH para 7,0 ± 1, com hidróxido de sódio 1M. Completar o volume do meio para 1L e esterilizar por filtração a vácuo em membrana de 0,22µm.

4. Ração das larvas de *G. mellonella*

A ração utilizada é composta de 200 g de cera de abelha, 96 g de leite em pó, 188 g de extrato de levedura, 385 g de fubá, 416 mL de mel, 160 g de soja triturada e 300 mL de água. Os componentes da ração foram misturados no fogo alto e devidamente autoclavados.

ANEXO B – “Primers” utilizados para a confirmação da identificação dos isolados de *Candida* spp.

Espécie	“primer”	Fragmento (pb)
<i>C. albicans</i>	Fw: 5'- AAGTATTTGGGAGAAGGGAAAGGG-3' Rv: 5'- AAAATGGGCATTAAGGAAAAGAGC-3'	406
<i>C. glabrata</i>	Fw: 5'-ACATATGTTTGCTGAAAAGGC-3' Rv: 5'-CTTTTCTTAGTGTTTCAGGACTTC-3'	310
<i>C. parapsilosis</i>	Fw: 5'-AGGGATTGCCAATATGCCCA-3' Rv: 5'-GTGACATTGTGTAGATCCTTGG-3'	113
<i>C. tropicalis</i>	Fw: 5'-TGATAGTTAGGAAAGATCAGGTG-3' Rv: 5'-AACATATCCCATGTGTGTGT-3'	147
<i>C. orthopsilosis</i> / <i>C. metapsilosis</i>	Fw: 5'- GCTTTAGTGGACAAATCAATGAYCT-3' Rv: 5'-AGTTGATGTAACCACCACCR TTG-3'	235/250

Fw: forward / **Rv:** reverse

Fonte: Martínez et al. (2010) e Feng et al. (2014).

ANEXO C – Soluções e Tampões

1. PBS (“Phosphate Buffered Sanile”) 1X

Cloreto de sódio (Synth).....35 mM
 Cloreto de potássio (Synth).....18 mM
 Fosfato de sódio dibásico (J.T.Baker).....2,5 mM
 Fosfato de potássio monobásico (Synth).....1,8 mM

Dissolver todos os componentes em água destilada e ajustar o pH para 7,4 com ácido clorídrico. Esterilizar em autoclave a 121°C, 1kgk/cm², por 20 minutos.

2. Solução de XTT

XTT	(2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)
(Invitrogen™)	0,5g
PBS	1000mL
Menadiona (Sigma-Aldrich)	1μM

Dissolver o XTT em PBS e esterilizar por filtração com membrana de 0,22μm. Distribuir em tubos esterilizados, e cobrir com folhas de alumínio. Manter a -70 °C. Na hora do uso, descongelar quantos tubos forem necessários, e adicionar 1μL de solução de menadiona (10mM em acetona 100%), para cada 10mL de solução de XTT.