

LUCIANA FERNANDES DOS SANTOS

**ATIVIDADE *IN VITRO* DE EQUINOCANDINAS EM BIOFILMES MISTOS DE
Candida spp. e *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2019

LUCIANA FERNANDES DOS SANTOS

ATIVIDADE *IN VITRO* DE EQUINOCANDINAS EM BIOFILMES MISTOS DE

Candida spp. e Pseudomonas aeruginosa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Ishida

Versão Original

São Paulo
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Fernandes, Luciana
ATIVIDADE IN VITRO DE EQUINOCANDINAS EM
BIOFILMES MISTOS DE *Candida* spp. e *Pseudomonas*
aeruginosa / Luciana Fernandes; orientador Kelly
Ishida. -- São Paulo, 2019.
110 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Biofilmes polimicrobianos. 2. Infecção
nosocomial. 3. *Candida* spp.. 4. *Pseudomonas*
aeruginosa. 5. Antifúngicos. I. Ishida, Kelly,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Luciana Fernandes dos Santos

Título da Dissertação: Atividade *in vitro* de equinocandinas em biofilmes mistos de *Candida* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*

Orientadora: Kelly Ishida

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou a candidata:

Aprovada

Reprovada

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **845/2016** referente ao projeto intitulado: "*Atividade "in vitro" de Caspofungina em biofilme polimicrobiano de Candida albicans e Pseudomonas aeruginosa*" sob a responsabilidade de **Luciana Fernandes dos Santos** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Kelly Ishida**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 22 de novembro de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo Marinho A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP



Declaro, para os devidos fins, que

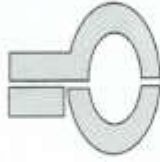
Luciana Fernandes dos Santos

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos", realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 4 abril 2016
(Declaração válida por 5 anos)

Helayne Freitas
Presidente da Comissão de Resíduos Químicos

Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt
Diretor do ICB



Certificado



Certificamos que **Luciana Fernandes dos Santos** participou do Treinamento em Biossegurança realizado no Departamento de Microbiologia/ICB-USP, no dia 30 de março de 2016, com carga horária total de 8 horas.

Gabriel Padilla

Prof. Dr. Gabriel Padilla
Responsável pelo Treinamento

Tatiana Alves dos Reis

Tatiana Alves dos Reis
Técnica Responsável pelo Treinamento

Dedico este trabalho aos meus pais, meu companheiro, minha filha e a todos que fizeram parte da minha rede de apoio durante esse período. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus aos Orixás de Umbanda por minha vida e pelo suporte divino que tornou possível a concretização desse mestrado. Por me darem a oportunidade de estudar e me colocarem em condições nas quais eu tenho tão pouco a pedir e tanto para agradecer.

À todas as entidades de luz que trabalham incansavelmente me guiando, abençoando e protegendo, por jamais me deixarem desamparada!

Agradeço à minha querida mãe Fatima e ao meu pai Leonildo, pelo amor, cuidados e orientações e por me darem todas as ferramentas para estudar e crescer cada vez mais em conhecimento e aos meus irmãos, Juliana e Éder, que de forma muito carinhosa sempre me apoiaram e incentivaram a enfrentar os desafios na vida e nos estudos.

À minha amada filha, Mariana, que é a maior razão do meu viver e em seus nove anos já me ensinou muita coisa, sendo sempre um grande incentivo para a busca de novos conhecimentos e superação das barreiras e desafios.

Ao meu companheiro, Vinícius, por sempre me apoiar e incentivar diariamente, em especial nos momentos de dificuldade. Agradeço por compartilhar comigo o seu conhecimento acadêmico e de vivência, por suas valiosas dicas durante a execução dessa dissertação, por dividir comigo todos os compromissos da rotina diária e por todo tempo dedicado a mim e à nossa família.

À minha orientadora, Kelly Ishida, pela orientação em cada etapa de desenvolvimento desse trabalho, desde o projeto até a sua finalização. Agradeço por todo tempo disponibilizado para me auxiliar, pela paciência e compreensão.

Aos meus colegas do Laboratório de Quimioterapia Antifúngica (LQA) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES - PROEX) - Código de Financiamento 001. Agradeço pela concessão da bolsa através do Programa de Pós Graduação; Processo 1658275; Curso: Ciências Biológicas (Microbiologia); Modalidade: Mestrado-ME; Vigência: De 11/2016 a 10/2018.

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

“Os dons se complementam. São diferentes e indispensáveis um ao outro. A obra de educação científica e racional, para homens e mulheres, é o mais perfeito instrumento de liberdade. É a extinção da miséria universal, é o acúmulo de riquezas, a contribuição para a solidariedade – a moral do futuro”.

Maria Lacerda De Moura

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa e *Candida* spp. são patógenos formadores de biofilme comumente encontrados colonizando cateteres venosos centrais e aparelhos de ventilação mecânica, estando associados principalmente a casos de pneumonia e infecção da corrente sanguínea. A co-infecção por esses agentes apresenta maiores taxas de mortalidade quando comparada às causadas por uma única espécie microbiana. Portanto, torna-se crucial analisar as suas interações e estratégias de tratamento. Neste trabalho foi padronizado um protocolo para estudar a formação “*in vitro*” de biofilmes mistos de *P. aeruginosa* com *Candida* spp. e posteriormente a ação dos antimicrobianos Caspofungina, Micafungina, Anfotericina B e Polimixina B foi avaliada tanto para células planctônicas de cada micro-organismo quanto em biofilmes mono- e polimicrobianos. A biomassa dos biofilmes foi quantificada pela coloração com cristal violeta (CV) a 590 nm. Além disso, os biofilmes foram raspados e as células aderentes foram ressuspensas em PBS, diluídas e plaqueadas para a determinação da unidade formadora de colônia (UFC). No presente estudo, a anfotericina B apresenta excelente ação sobre células planctônicas e pouca ação antibiofilme polimicrobiano; entretanto, o antibiótico Polimixina B foi eficaz em reduzir de forma significativa a biomassa e a viabilidade dos biofilmes e apresentou ação sobre a viabilidade de *Candida* spp. em biofilme, em concentrações maiores ou iguais a 8 µg/mL. Caspofungina e Micafungina mostraram ter efeito para células planctônicas e células de biofilme de *Candida* spp. e de *P. aeruginosa*. Em biofilmes mistos a Caspofungina reduziu de maneira dose-dependente o número de UFC de *Candida* spp. em até 5 Log e em até 2 Log o número de UFC de *P. aeruginosa*, permitindo afirmar que esse antifúngico possui efeito na redução de biofilmes polimicrobianos de *Candida* spp. e *P. aeruginosa*. Resultados semelhantes foram encontrados no tratamento com Micafungina. As equinocandinas demonstraram potencial efeito em desorganizar a estrutura do biofilme, reduzindo a sua biomassa total e a viabilidade celular fúngica e bacteriana no interior dos biofilmes, comprovando seu efeito antibiofilme. Esses achados permitem sugerir que as equinocandinas podem ser utilizadas como uma alternativa no tratamento de infecções polimicrobianas envolvendo bactérias e fungos. No entanto, para fins de aplicação na terapêutica clínica, serão necessários testes adicionais “*in vitro*” e “*in vivo*” para avançar os resultados aqui encontrados e definir as concentrações antimicrobianas, bem como a duração do tratamento e formas de administração necessárias para o tratamento das infecções causadas por biofilmes polimicrobianos.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa and *Candida* spp. are biofilm-forming pathogens commonly found colonizing central venous catheters and mechanical ventilation devices, being associated mainly with cases of pneumonia and bloodstream infection. The co-infection by these agents presents higher mortality rates when compared to those caused by a single microbial species. Therefore, it is crucial to analyze their interactions. A protocol was used to study the in vitro formation of mixed biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* with *Candida* spp. and the effect of the Caspofungin, Micafungin, Amphotericin B and Polimixin was evaluated both for planktonic cells as well as in mono and polymicrobial biofilms. Biofilm biomass was quantified by crystal violet (CV) at 590 nm. In addition, the biofilms were scraped and the adherent cells were resuspended in PBS, diluted and plated for determination of cell viability. In the present study, Caspofungin and Micafungin showed to have an effect on planktonic cells and *P. aeruginosa* biofilm cells. In mixed biofilms, Caspofungin dose-dependently reduced the number of CFUs in *Candida* spp. in up to 5 Log and up to 2 Log the number of UFC *P. aeruginosa*, allowing to affirm that this antifungal has an effect on the reduction of polymicrobial biofilms of *Candida* spp. and *P. aeruginosa*. Similar results were found in treatment with Micafungin. These findings suggest that echinocandins, especially Caspofungin and Micafungin, may be used as an alternative in the treatment of polymicrobial infections involving bacteria and fungi. In addition, the antibiotic Polimixin B was effective in significantly reducing biomass and biofilm viability and presented action on the viability of *Candida* spp. in biofilms at concentrations greater than or equal to 8 µg / mL. Caspofungin and Micafungin demonstrated a potential effect on disorganizing the biofilm structure, reducing its biomass and the fungal and bacterial cellular viability within the biofilms, proving its anti-biofilm effect. However, for the purposes of clinical therapy, additional "in vitro" and "in vivo" tests will be required to advance the results found herein and to define antimicrobial concentrations as well as the duration of treatment and administration forms required for the treatment of infections caused by polymicrobial biofilms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A formação dos biofilmes de <i>Candida</i> spp. dividida em quatro etapas: aderência, proliferação, maturação e dispersão	34
Figura 2. Estrutura química da Anfotericina B	35
Figura 3. Estrutura química dos agentes triazólicos (Fluconazol e Voriconazol).....	37
Figura 4. Estrutura química da caspofungina	40
Figura 5. Estrutura química da micafungina	41
Figura 6. Estrutura química da anidulafungina.	42
Figura 7. Estrutura química da Polimixina B	50
Figura 8. Distribuição das concentrações finais dos antimicrobianos nos poços da microplaca de 96 poços. CP	62
Figura 9. Cinética da formação dos biofilmes monomicrobianos de <i>C. albicans</i> SC5314 e <i>P. aeruginosa</i> PAO1 sob agitação orbital a 150 RPM e sem agitação a 37 °C por 96h de incubação.	77
Figura 10. Cinética da formação dos biofilmes monomicrobianos das seis cepas de <i>Candida</i> spp. em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16M sob agitação orbital a 150 RPM a 37 °C por 96 h de incubação.	78
Figura 11. Cinética da formação dos biofilmes monomicrobianos das sete cepas de <i>P. aeruginosa</i> em caldo Luria Bertani sob agitação orbital a 150 RPM a 37 °C por 96 h de incubação.	79
Figura 12. Cinética de formação de biofilmes polimicrobianos de <i>Candida albicans</i> SC5314 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 utilizando três diferentes estratégias	82
Figura 13. Efeito da caspofungina sobre a viabilidade das células dos biofilmes polimicrobianos formados em 24h pelo isolado <i>P. aeruginosa</i> 151 com diferentes espécies de <i>Candida</i>	95
Figura 14. Efeito da Polimixina B sobre a viabilidade das células dos biofilmes polimicrobianos formados em 24h pelo isolado <i>P. aeruginosa</i> 151 com diferentes espécies de <i>Candida</i>	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cepas de <i>Candida albicans</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> utilizadas neste trabalho.	59
Tabela 2. Agrupamento dos agentes antimicrobianos que devem ser considerados pelos laboratórios de microbiologia clínica para testes e relatórios de rotina sobre micro-organismos não fastidiosos, de acordo com o sugerido no documento CLSI M100-S15 (2015).....	61
Tabela 3. Critérios para classificação dos isolados de <i>Candida</i> spp. e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em baixa, intermediária e alta formação de biofilmes.....	67
Tabela 4. Valores de Concentração inibitória mínima (CIM-P) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos antimicrobianos sobre cepas de <i>Candida</i> spp. na forma planctônica.....	69
Tabela 5. Perfil de suscetibilidade das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aos antibióticos de uso clínico.....	73
Tabela 6. Valores de Concentração inibitória mínima (CIM-P) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos antimicrobianos sobre cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na forma planctônica.....	76
Tabela 7. Valores de concentração inibitória mínima (CIM-B) dos antimicrobianos sobre biofilmes monomicrobianos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida</i> spp.	89
Tabela 8. Valores de concentração inibitória mínima (CIM-B) dos antimicrobianos sobre biofilmes polimicrobianos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida</i> spp.	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM	Australian imipenemase
AMB	Anfotericina B desoxicolato
AMI	Amicacina
ANOVA	Teste de análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATM	Aztreonam
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
Bcr1	<i>Biofilm and cell wall regulator 1</i>
CAS	Casposfungina
CAZ	Ceftazidima
CBM	Concentração bactericida mínima
CFM	Concentração fungicida
CIM	Concentração inibitória mínima
CIM-B	Concentração inibitória mínima sobre células de biofilme
CIM-P	Concentração inibitória mínima sobre células planctônicas
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
COM	Cefepime
CV	Cristal violeta
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECN	<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>
EPS	Exopolissacarídeo
GEN	Gentamicina
GIM	Imipenemase alemã
H	Hora
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Hwp1	<i>Hyphal wall protein 1 precursor</i>
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
ICS	Infecção da corrente sanguínea
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Segurança

IPM	Imipenem
ISC	Infecção do sítio cirúrgico
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
MDR	<i>Multidrug Resistant</i>
MER	Meropenem
Mg	Miligrama
MICA	Micafungina
Min	Minuto
mL	Mililitro
MβL	Metalo-β-Lactamases
Nm	Nanometro
OD	Densidade Ótica
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PAV	Pneumonia associada à ventilação
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
POL	Polimixina B
PQS	<i>Pseudomonas Quinolone Signal</i>
PTT	Piperaciclina – tazobactam
QS	<i>Quorum sensing</i>
RPM	Rotação por minuto
SIM	Seul Imipenemase
SPM-1	São Paulo Metalo-β-lactamase
TGI	trato gastrintestinal
TSB	Caldo Soja Trypticaseína
UDP-glicose	glicose-uridinadifosfato
UDP-glicose	Glicose-uridina-difosfato
UFC	Unidade formadora de colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VIM	Verona Imipenemase
μg	Micrograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1 O gênero <i>Candida</i>	25
2.1.1 Descrição geral.....	25
2.1.2 Epidemiologia	25
2.1.3 Candidíase invasiva	27
2.1.6 Agentes antifúngicos.....	34
2.1.6.1 Agentes poliênicos	35
2.1.6.2 Agentes azólicos.....	36
2.1.6.3 Equinocandinas	38
2.1.6.4 Caspofungina.....	39
2.1.6.5 Micafungina.....	40
2.1.6.6 Anidulafungina.....	41
2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
2.2.1 Epidemiologia	43
2.2.2 Fatores de virulência em <i>P. aeruginosa</i>	45
2.2.3 Biofilmes de <i>P. aeruginosa</i>	45
2.2.4 Agentes <i>antipseudomonas</i>	48
2.3 Biofilmes Polimicrobianos.....	50
2.3.1 Biofilmes polimicrobianos de <i>Candida spp.</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
2.3.2 Interação entre <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> em biofilmes polimicrobianos	52
2.3.2.1 O papel das moléculas de QS de <i>P. aeruginosa</i> em biofilmes polimicrobianos.....	53
2.3.2.2 O papel das moléculas de QS de <i>Candida albicans</i> em biofilmes polimicrobianos.....	54

2.3.3	É possível uma monoterapia das infecções polimicrobianas por <i>Candida</i> spp. e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ?	56
3	OBJETIVOS	58
3.1	Objetivo geral	58
3.2	Objetivos específicos	58
3.2.1	Obter o perfil de suscetibilidade antimicrobiana de células planctônicas de <i>Candida</i> spp. e de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
3.2.2	Padronizar biofilmes monomicrobianos e mistos de <i>Candida</i> spp. e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
3.2.3	Avaliar o efeito das equinocandinas em biofilmes monomicrobianos e mistos de <i>Candida</i> spp. e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
4	MATERIAIS E MÉTODOS	58
4.1	Micro-organismos	58
4.2	Condições de cultivo e estocagem das cepas de <i>Candida</i> spp.	59
4.3	Condições de cultivo e estocagem das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60
4.4	Teste de suscetibilidade aos antibacterianos pelo método de disco-difusão	60
4.5	Determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos sobre células planctônicas (CIM-P) pelo método de microdiluição em caldo	61
4.6	Determinação da concentração fungicida/bactericida mínima (CFM e CBM)	63
4.7	Padronização dos inóculos de <i>Candida</i> spp. para a produção dos biofilmes	63
4.8	Cinética da produção dos biofilmes de <i>Candida</i> spp.	63
4.9	Padronização dos inóculos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para a produção dos biofilmes	64
4.10	Cinética da produção dos biofilmes monomicrobianos de <i>P. aeruginosa</i>	64
4.11	Padronização dos biofilmes polimicrobianos de <i>Candida</i> spp. e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64
4.12	Testes de suscetibilidade dos biofilmes mono e polimicrobianos de <i>Candida</i> spp. e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aos antimicrobianos	65
4.13	Quantificação dos biofilmes	66

4.13.1	Avaliação da viabilidade celular nos biofilmes mistos	66
4.13.2	Ensaio de coloração com Cristal Violeta (CV).....	66
4.14	Classificação da capacidade de formação de biofilme	67
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1	Suscetibilidade das células planctônicas de <i>Candida</i> spp. aos antifúngicos.....	68
5.2	Suscetibilidade das células planctônicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aos antimicrobianos	72
5.3	Determinação da CIM dos antimicrobianos frente às células planctônicas de <i>P. aeruginosa</i>	75
5.4	Cinética da formação os biofilmes monomicrobianos de <i>Candida</i> spp. e <i>P. aeruginosa</i> em diferentes estratégias de incubação	77
5.5	Cinética da formação os biofilmes monomicrobianos de <i>Candida</i> spp. e <i>P. aeruginosa</i> sob agitação.....	78
5.6	Cinética da formação os biofilmes polimicrobianos de <i>Candida</i> spp. e <i>P. aeruginosa</i> sob agitação.....	80
5.7	Suscetibilidade dos biofilmes monomicrobianos de <i>Candida</i> spp. e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	86
5.8	Suscetibilidade dos biofilmes polimicrobianos de <i>Candida</i> spp. e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	90
6	CONCLUSÕES.....	98

1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos desempenham importante papel ecológico na manutenção do equilíbrio ambiental. Estudos têm demonstrado também a participação e benefício dos micro-organismos no desenvolvimento do sistema imunológico e do sistema nervoso, além de serem indispensáveis em diversos eventos metabólicos dos seres humanos (GAUFIN; TOBIN; ALDROVANDI, 2018). Porém, algumas espécies de fungos e bactérias podem ser prejudiciais ao indivíduo, causando doenças graves. Por isso, inibir o crescimento de micro-organismos indesejados é um objetivo constante dos pesquisadores em todo o mundo. Porém a incrível capacidade de adaptação desses seres e o surgimento de cepas resistentes aos tratamentos atuais exige o desenvolvimento de novos métodos de tratamento (ROEDER et al., 2018).

A maioria dos micro-organismos ambientais organiza-se em estruturas complexas e heterogêneas, denominadas biofilmes, ao invés de viverem como células planctônicas. Os biofilmes são estruturas complexas e heterogêneas que compreendem uma ou mais espécies de micro-organismos envoltos em uma matriz extracelular de polissacarídeos secretados, aderidos a superfícies bióticas ou abióticas e permeados por canais que permitem fluxo de fluidos e de nutrientes e a excreção de metabólitos, funcionando como organismos autossustentáveis capazes de responder a estímulos e manter um ambiente homeostático resistente (BANDARA et al., 2010; IBRAHIM et al., 2018).

As diversas interações que ocorrem entre os micro-organismos no interior de um biofilme permitem o desenvolvimento de mecanismos complexos de defesa não só contra condições ambientais ou nutricionais adversas, mas também contra organismos concorrentes sendo, portanto, muito importantes para a sobrevivência desses micro-organismos e equilíbrio ecológico, além de impulsionarem a evolução das espécies (PELEG et al., 2010, HARRIOT; NOVERR, 2011; DHAMGAYE et al, 2016).

Inversamente às vantagens que a organização em biofilme proporciona aos micro-organismos, as características especiais demonstradas por células microbianas dessa estrutura muitas vezes são prejudiciais do ponto de vista humano (HARRIOT; NOVERR, 2011, BANDARA et al., 2010).

Os biofilmes têm sido amplamente estudados pelos profissionais clínicos nas últimas duas décadas. Esse interesse surgiu a partir da demonstração de biofilmes associados a casos de infecção nosocomial por bactérias e fungos, gerando grande preocupação clínica devido ao aumento da resistência dos micro-organismos ao tratamento com antimicrobianos e às defesas

do hospedeiro e, conseqüentemente, uma difícil erradicação de tais infecções (BEHLAU; GILMORE, 2008; GULATI; NOBILE, 2016; COSTA-ORLANDI et al., 2017). Estas infecções decorrem principalmente da adesão microbiana e formação de biofilmes às superfícies de dispositivos médicos-hospitalares implantados (cateteres, sondas, respiradores, entre outros) (PFALLER; DIEKEMA, 2010). Estudos recentes sugerem que os micro-organismos patogênicos produtores de biofilme também desempenham um papel significativo nas infecções persistentes da pele e tecidos moles em pacientes cirúrgicos durante o pós-operatório e sugerem que até 80% dos casos de infecção do sítio cirúrgico (ISC) podem envolver a formação de biofilme microbiano na ferida operatória (EDMISTON et al., 2015).

Biofilmes apresentam um complexo e surpreendente comportamento multicelular, que é coordenado por redes de sinalização celular. Eles produzem substâncias que os micro-organismos não podem produzir sozinhos, e sua matriz extracelular impede a fagocitose por macrófagos (IBRAHIM et al., 2018). Além disso, a expressão gênica alterada e as características estruturais dos biofilmes levam à evasão do sistema imunológico, sobrevivência em condições adversas e redução das taxas de crescimento e metabolismo dos micro-organismos, fazendo com que essas estruturas possam exibir uma resistência até 1.000 vezes maior à terapia antimicrobiana (IBRAHIM et al., 2018).

Uma vez que, no contexto da colonização de materiais hospitalares, os micro-organismos crescem em biofilmes, eles são mais difíceis de diagnosticar e as infecções transmitidas apresentam um risco fatal para o paciente (BAZZI et al., 2013, DESAI; MITCHELL; ANDES, 2014; ROEDER et al., 2018).

Muitos são os possíveis agentes de infecções por biofilmes, incluindo bactérias Gram-positivas (*Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.), Gram-negativas (principalmente *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) e fungos (comumente *Candida* spp. e *Aspergillus* spp.). Essas infecções podem ser causadas por um ou mais agentes microbianos simultaneamente (infecções monomicrobianas ou polimicrobianas, respectivamente) (PELEG et al., 2010; SUN et al., 2013).

Dados de estudos realizados no Brasil mostram que a taxa de mortalidade em pacientes diagnosticados com infecções da corrente sanguínea (ICS) monomicrobianas em Unidades de Terapias Intensivas (UTIs) foi extremamente elevada: 46,5%, 48,2%, 65,5% e 85,9% para *Staphylococcus coagulase negativa* (ECN), *S. aureus*, *Acinetobacter* spp. e *Candida* spp., respectivamente. Em pacientes com ICS polimicrobiana, a mortalidade foi de 45,7% (MARRA et al., 2011).

Estudos Norte-americanos afirmam que existe maior probabilidade de morte para o paciente quando ocorrem ICS polimicrobianas. Os dados apontam que nos pacientes de UTIs com candidemia simultaneamente a bacteremia as taxas de mortalidade chegam a 78%, ressaltando que esse achado clínico exige tratamento rápido e adequado (VALES et al., 2002; WISPLINGHOFF et al., 2004; KLOTZ et al., 2007).

Estudos que avaliaram dispositivos médicos infectados demonstraram que a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e leveduras do gênero *Candida* estão entre os patógenos formadores de biofilme mais comumente encontrados colonizando cateteres venosos centrais, sendo *C. albicans* a espécie fúngica mais encontrada (RAMAGE et al., 2005; KLOTZ, 2007; DESAI; MITCHELL; ANDES, 2014).

Infecções polimicrobianas envolvendo *P. aeruginosa* e *Candida* spp. em casos que vão desde cateteres contaminados a doença pulmonar crônica e infecção de ferida vêm sendo cada vez mais descritas. Casos de co-infecção tem sido documentados em pacientes com pneumonia associada à ventilação (PAV) e sabe-se que o risco de PAV causada por *P. aeruginosa* é acentuadamente aumentado em pacientes que apresentam colonização traqueobrônquica por *C. albicans* (PELEG et al., 2010; RODRIGUES et al., 2017).

Candida spp. e *P. aeruginosa* têm tendência a formar biofilmes polimicrobianos resistentes, com grande impacto na gravidade das infecções nosocomiais (TREJO-HERNANDEZ et al., 2014; RODRIGUES et al., 2017).

Estudos *in vitro* demonstram o largo espectro de interações entre *P. aeruginosa* e *Candida* spp. e enfatizam a importância das condições ambientais para determinar o resultado de uma interação. Por exemplo, uma pesquisa sobre a formação de biofilmes em cateter urinário mostrou que *P. aeruginosa* teve maior capacidade de aderência à superfície do cateter quando na presença de *C. albicans* (DE PÁDUA et al., 2008).

Ensaio clínico sugerem ainda que indivíduos com colonização traqueobrônquica por *Candida* spp. tratados com antifúngicos tiveram diminuição de infecção por *P. aeruginosa* em relação àqueles que não receberam tratamento antifúngico profilático (AZOULAY et al., 2006; NSEIR et al., 2007).

As ISC e ICS associadas a biofilmes são notoriamente difíceis de erradicar usando os esquemas antimicrobianos que normalmente são eficazes contra os mesmos patógenos em condições planctônicas. Este fenômeno mediado por biofilme é caracterizado como recalitrância antimicrobiana, que está associada à sobrevivência de um subconjunto de células, denominadas “persisters” ou células persistentes (EDMISTON et al., 2015). Por isso, o melhor método para gerenciar uma infecção mediada por biofilme é impedir que ela ocorra,

ou seja, impedir a formação do biofilme, por meio de diversas estratégias, tais como o uso racional de profilaxia antibacteriana e antifúngica (EDMISTON et al., 2015; RODRIGUES et al., 2017).

Uma vez estabelecido o biofilme, a remoção deste continua sendo um grande desafio clínico. Quando a infecção está relacionada a biofilmes em dispositivos médicos implantados geralmente recomenda-se a remoção do implante; entretanto, em alguns casos isso não é indicado devido à complexidade do procedimento para retirada de certos dispositivos e o estado crítico de saúde do paciente (PRESS et al., 2014; PAPPAS et al., 2016). Além disso, em muitos casos o biofilme já pode ter invadido a mucosa e tecidos contíguos (RAMAGE et al., 2014). Em geral, tais infecções esbarram em dificuldades no diagnóstico e no tratamento com os antimicrobianos disponíveis (PRESS et al., 2014; EDMISTON et al., 2015).

Já para o tratamento de infecções por biofilmes de *Pseudomonas* spp. não há recomendações específicas. Porém, as diretrizes atuais da *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) e da *American Thoracic Society* (ATS) sugerem que na suspeita de PAV por *P. aeruginosa*, seja realizado inicialmente o tratamento empírico com cobertura dupla, utilizando dois antibióticos antipseudomonais de classes diferentes e posteriormente deve-se realizar seleção da terapêutica em configurações individuais, com base nos testes de sensibilidade antimicrobiana, na gravidade da infecção, na existência de fatores de risco subjacentes e comorbidades e no reconhecimento da epidemiologia da unidade de saúde (AWAD et al., 2018; EKREN et al., 2018). Os especialistas da IDSA/ATS ressaltam ainda que os testes de sensibilidade antimicrobiana de rotina devem incluir a avaliação da sensibilidade a polimixina em cenários com alta prevalência de isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes (MDR) e que a monoterapia com aminoglicosídeos não deve ser usada devido a penetração deficiente desse fármaco no tecido pulmonar (AWAD et al., 2018; EKREN et al., 2018).

Para biofilmes de *Candida* spp. somente as equinocandinas e formulação lipossomal de Anfotericina B são atualmente recomendados (RAMAGE et al., 2014; PAPPAS et al., 2016). As equinocandinas representam uma classe de antifúngicos composta por três agentes: caspofungina, micafungina e anidulafungina, que têm como mecanismo de ação a inibição não competitiva da enzima β -1,3-glucano sintetase, que catalisa a polimerização da glicose-uridinadifosfato (UDP-glicose) em β (1,3)D-glucano, principal componente da parede celular de fungos, e também, da matriz extracelular dos biofilmes de *Candida* spp. (DIOMEDI, 2004; ESCHENAUER et al., 2007).

A detecção qualitativa de β (1,3)D-glucano no soro é um indicador de infecções invasivas por fungos, podendo ser usada como método auxiliar no diagnóstico e/ou prognóstico de fungemias. Apesar de β (1,3)D-glucano ser componente fundamental da parede celular de fungos e da matriz extracelular de biofilmes de *Candida* spp., esta substância foi encontrada no soro de pacientes que sofriam de infecções por *P. aeruginosa*, sugerindo uma reação cruzada com β (1,3)D-glucano bacteriana. Os estudos revelaram a presença de β (1,3)D-glucano em *P. aeruginosa* análogo ao de *C. albicans* como um glucano periplasmático e componente da matriz extracelular de biofilmes dessa bactéria. Estudos indica, que o gene *ndvB* de *P. aeruginosa* codifica uma enzima glicosiltransferase essencial na formação de β (1,3)D-glucano nessa bactéria (LEQUETTE et al. 2007; COULON et al. 2010; BEAUDOIN et al. 2012; BAZZI et al, 2013).

Desde então, surgiu o interesse em avaliar o efeito das equinocandinas em isolados de *P. aeruginosa* que produzem biofilmes. Um estudo *in vitro* avaliou o uso da micafungina em biofilmes de *P. aeruginosa*. Os resultados mostraram uma redução estatisticamente significativa na massa do biofilme em 13 dos 18 isolados testados indicando que a micafungina pode inibir a formação de biofilmes dessa bactéria. Interessantemente, alguns autores mostram que a micafungina pode inibir a glicosiltransferase (produto do gene *ndvB*) através de inibição não-competitiva (BAZZI et al, 2013).

Dessa forma, conhecendo o efeito de um fármaco antifúngico sobre células bacterianas e sabendo que infecções nosocomiais polimicrobianas associadas aos biofilmes são cada vez mais frequentes e que as opções atualmente disponíveis para o tratamento requerem administração de altas doses dos fármacos antimicrobianos, com elevado custo terapêutico e uma série de efeitos colaterais para os pacientes, estratégias como o uso das equinocandinas no tratamento de infecções polimicrobianas causadas por *Candida* spp. e *P. aeruginosa* pode ser uma alternativa para controlar essas infecções (AARON et al., 2002, RAMAGE et al., 2001, BAZZI et al, 2013; TREJO-HERNANDEZ et al., 2014).

Além disso, *P. aeruginosa* e *Candida* spp. compartilham muitos caracteres funcionais, tais como serem patógenos oportunistas, apresentarem aumento da resistência aos fármacos antimicrobianos, capacidade de formar biofilmes em dispositivos, alta incidência e mortalidade associada às infecções, além da presença de β (1,3)D-glucano como componente estrutural de suas células quanto da matriz extracelular de seus biofilmes (BAZZI et al, 2013; TREJO-HERNANDEZ et al., 2014). Por isso, pesquisas sobre as interações entre esses dois micro-organismos e como eles respondem aos fármacos quando interagindo em biofilme, podem fornecer ainda um modelo para o estudo de muitas interações bactéria-fungo. Diante

desse cenário, esse trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito *in vitro* das equinocandinas caspofungina e micafungina sobre biofilmes mistos de *Candida* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Candida*

2.1.1 Descrição geral

O gênero *Candida* está incluído no filo Ascomycota, ordem Saccharomycetales e família Saccharomycetaceae. Este gênero compreende mais de 200 espécies, das quais aproximadamente 10% são consideradas agentes etiológicos das candidíases em humanos e outros animais (CHAVES et al, 2003; DE ARAÚJO LIMA, 2017).

Os fungos pertencentes ao gênero *Candida* são leveduriformes, com diâmetro que varia de 3 a 6 µm. Em ágar Sabouraud dextrose suas colônias evidenciam cor branca ou brancoamarelada, com aspecto cremoso (MARIO et al., 2012). Diversas espécies, tais como *Candida albicans*, são capazes de filamentar formando pseudohifas ou hifas verdadeiras (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; MATILDE, 2014; DE ARAÚJO LIMA, 2017).

Candida spp. podem ser encontradas em variados ecossistemas, como solo, alimentos, água, e fazendo parte da microbiota de homens e animais. Na forma comensal, essas leveduras colonizam a mucosa oral de indivíduos saudáveis e também são encontradas colonizando o trato gastrointestinal (TGI), trato geniturinário e os pulmões (JACOBSEN et al, 2012; ALMEIDA et al, 2008). Porém, essas leveduras podem se tornar patogênicas quando ocorre algum desequilíbrio em sua relação com o hospedeiro e por isso são consideradas oportunistas. Essa transição de estado comensal para patógeno pode ocorrer devido ao comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro ou rompimento das barreiras anatômicas como ferimentos, queimaduras, inserção de cateteres ou cirurgias invasivas (ALONSO-VALLE et al, 2003; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; MARIO et al., 2012).

2.1.2 Epidemiologia

De acordo com Sidrim e Rocha (SIDRIM; ROCHA, 2004), a primeira documentação de *Candida* spp. atuando como patógeno é atribuída a Langenbeck, que em 1839 isolou e

identificou, em material coletado da cavidade oral de um paciente com afta bucal, *Candida albicans*, atualmente considerada a mais importante espécie de *Candida* patogênica do homem.

As principais espécies de interesse clínico são: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida lusitanae* (ALMEIDA et al, 2008). Entretanto, um número progressivo de casos de doenças superficiais e invasivas relacionadas a espécies emergentes de *Candida* têm sido descrito, envolvendo isolamentos de *Candida dubliniensis*, *Candida rugosa*, *Candida famata*, *Candida utilis*, *Candida lipolytica*, *Candida norvegensis* e *Candida inconspicua* (COLEMAN et al, 1997). Além dessas, espécies do Complexo *Candida haemulonii*, como *Candida auris* e *Candida haemulonii*, são espécies multirresistentes aos antifúngicos e que têm emergido em todo o mundo como importantes agentes de candidemia em pacientes imunocomprometidos (KHAN, 2007). Em outubro de 2016, a Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) publicou um alerta epidemiológico em função dos relatos de surtos de *C. auris* em serviços de saúde da América Latina e em março de 2017 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) divulgou um comunicado de risco sobre esse assunto (KATHURIA, S, SINGH, 2015; ANVISA, 2017). Até o presente momento, não há nenhum registro no Brasil de casos de candidíases causados por *C. auris*.

Infecções oportunistas por espécies de *Candida* tem emergido como um problema de saúde significativo nas últimas décadas, tornando-se uma das principais causas de doenças em indivíduos que estão com os mecanismos de defesa comprometidos. Tais infecções podem ser superficiais, atingindo as mucosas e tecidos cutâneos (candidíase cutânea e mucocutânea) ou invasivas (candidemia) (PFALLER; DIEKEMA, 2010; LI et al., 2016).

Os prematuros, com seus sistemas imunológicos imaturos, apresentam alto risco de desenvolverem infecções invasivas fatais por espécies de *Candida*. Os adultos com sistema imunológico enfraquecido tanto por doenças de base como *diabetes mellitus* ou infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) quanto por tratamentos de quimioterapia, imunossupressão ou antibioticoterapia também são suscetíveis a desenvolverem candidíase superficial e sistêmica (LI et al., 2016; KUMAR, 2018) .

Cerca de 8% das infecções sanguíneas nosocomiais são causadas por *Candida* spp., sendo este considerado o patógeno fúngico mais comum encontrado em humanos (ALMEIDA et al, 2008; DOI et al., 2016). Levantamentos recentes apontam que as infecções por *Candida* spp. são responsáveis por 80% de todas as infecções fúngicas sistêmicas em todo o mundo, sendo *C. albicans* a espécie mais comumente isolada (TURNER; BUTLER, 2014; KUMAR, 2018).

2.1.3 Candidíase invasiva

Entre as infecções invasivas causadas por *Candida*, vale destacar os casos de infecção de corrente sanguínea, conhecida como candidemia (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). As taxas de candidemia variam geograficamente, isto é, existem diferenças na epidemiologia de candidemia entre diferentes países (COLOMBO et al, 2006).

A ocorrência de casos de candidemia em hospitais aumentou substancialmente nas últimas décadas em várias partes do mundo. Em pesquisas sobre a prevalência de candidemia em hospitais dos Estados Unidos da América (EUA) foi possível observar um aumento da ordem de 400% na incidência de candidemia nos principais hospitais americanos entre os anos de 1980 a 1990 (BECK-SAGUÉ; JARVIS, 1993). Já nos anos 2000, pesquisadores identificaram os casos de candidemia relacionada à hospitalização e relataram um aumento de 49% na incidência por 1.000 hospitalizações, de 0.28 para 0.42 casos, durante o período de 2000 a 2005 (ZILBERBERG et al., 2008).

Mais recentemente, Cleveland et al. (2015) fizeram um estudo de vigilância laboratorial para candidemia em duas áreas metropolitanas dos EUA, Atlanta e Baltimore, durante 5 anos, entre 2008 e 2013. Os autores observaram um declínio significativo na incidência de candidemia ao longo do período: em Atlanta as taxas diminuíram 33% e em Baltimore o declínio foi de 54%. Todavia, houve aumento de resistência às equinocandinas e infecção por cepas MDR em ambos os locais. *Candida albicans* foi a espécie mais comumente isolada, seguida por *Candida glabrata*. No período estudado, a maioria (74%) dos isolados resistentes às equinocandinas foram *C. glabrata*, e a proporção de casos de *C. glabrata* com perfil MDR aumentou de 1,8% para 2,6%. Os autores observaram ainda que 85% dos casos de candidemia foram relacionados ao uso de cateter venoso central (CLEVELAND et al., 2015).

Outros estudos de vigilância demonstram que *C. glabrata* é a espécie que demonstra maior prevalência de resistência antifúngica às equinocandinas e a proporção de isolados não suscetíveis aumentou de 4,2% em 2008 para 7,8% em 2014 (VALLABHANENI et al., 2015). Alguns estudos institucionais relataram taxas de resistência ainda mais altas, próximas ou superiores a 10%. De forma alarmante, o aumento na resistência às equinocandinas entre *C. glabrata* é comumente acompanhado por resistência aos azóis, resultando em cepas multirresistentes (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

Em todo o mundo, a maioria das candidemias é causada pela espécie *Candida albicans*, mas diversos autores têm documentado aumento de incidência de infecções sistêmicas por

espécies não *albicans* em todas as partes do mundo, principalmente por *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (PFALLER, 1996; DEORUKHKAR; SAINI, 2016).

A espécie *Candida tropicalis* emergiu como um importante agente patogênico em escala mundial. Os incidentes de infecções por *C. tropicalis* aumentaram nas últimas duas décadas. Estudos recentes identificam *C. tropicalis* como a levedura isolada mais frequentemente em infecções na Ásia e também colocam essa espécie entre as três leveduras mais encontradas em infecções superficiais e sistêmicas na América Latina (KUMAR, 2018).

O Brasil apresenta uma frequência de estudos de epidemiologia de candidemia bem menor quando comparado aos Estados Unidos ou países da Europa. Podemos ver, entretanto, que *Candida* spp. aparece como importante agente etiológico das infecções de corrente sanguínea no país. Segundo Colombo et al. (2006), *Candida* spp. foi o quarto micro-organismo mais isolado em hemocultura de indivíduos hospitalizados, sendo responsável por 80% dos casos de infecção fúngica sistêmica e com estimativa de 38 a 75% de mortalidade (COLOMBO et al, 2006; ALMEIDA et al, 2008).

De forma semelhante, Chang et al. (2003), através de um estudo conduzido no Hospital Universitário do Mato Grosso do Sul, constataram que *Candida* spp. foi o quinto patógeno mais comum de infecções nosocomiais. Posteriormente, Pereira et al (2010) destacou em seu estudo de cinco anos de avaliação de candidemia em um hospital terciário de São Paulo, que *C. albicans* foi a espécie mais prevalente nos pacientes pediátricos. Marra et al., (2011) em estudo que abrangeu 16 hospitais de todas as regiões do Brasil e 2.563 pacientes, no período de julho de 2007 a março de 2010, identificaram *Candida* spp. como sendo o sexto micro-organismo mais comumente isolado nas UTIs (CHANG et al, 2003; PEREIRA et al, 2010; MARRA et al, 2011).

Em relação à distribuição das espécies de *Candida* em casos de candidemia no Brasil, as espécies não-*albicans* mais representativas são *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Esse perfil de distribuição foi constatado em um estudo de 1999 realizado em seis hospitais do Rio de Janeiro e São Paulo (COLOMBO et al, 1999), envolvendo 145 episódios de candidemia, onde as espécies mais frequentemente isoladas foram *C. albicans* (37%), *C. parapsilosis* (25%), *C. tropicalis* (24%), *C. rugosa* (5%) e *C. glabrata* (4 %). Estudos posteriores confirmam esses dados e mostram que o perfil brasileiro de distribuição das espécies permanece praticamente inalterado. O estudo de Bonfietti et al. (2013) mostra que *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* juntas totalizaram 47% dos isolados de *Candida* não-*albicans*. A espécie *C. glabrata* apresentou baixa incidência na maioria dos estudos, confirmando o conceito de que seja mais rara no

Brasil (COLOMBO et al., 1999; CHANG et al. 2003; MARRA et al.,2011; BONFIETTI et al, 2013).

De 2006 a 2010, Moretti et al. (2013) realizaram um estudo retrospectivo em um hospital universitário brasileiro de referência para analisar a frequência e distribuição de espécies de *Candida*. Os resultados mostraram que *C. albicans* causou 44% dos episódios globais, seguida por *C. tropicalis* (21,7%), *C. parapsilosis* (14,4%), *C. glabrata* (11,2%) e *C. krusei* (3,5%). Os autores observaram que a incidência de candidemia por *C. glabrata* aumentou significativamente de 2006-2010, em contraste com a literatura nacional atual, mas *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* permaneceram como as mais importantes espécies não-*albicans* em hospitais brasileiros (MORETTI et al, 2013).

Um grupo de pesquisadores (DOI et al, 2016) realizou de junho de 2007 a março de 2010, um estudo de vigilância multicêntrica em 16 hospitais distribuídos em cinco regiões do Brasil para avaliar a incidência, distribuição de espécies, susceptibilidade antifúngica e fatores de risco para candidemia. Nesse estudo, *Candida* spp. foi o sétimo agente mais prevalente e 46,7% dos pacientes estavam na UTI quando ocorreu candidemia. A taxa de mortalidade foi de 72,2%. A distribuição das espécies mostrou a prevalência de *C. albicans* (34,3%), seguida por *C. parapsilosis* (24,1%), *C. tropicalis* (15,3%) e *C. glabrata* (10,2%). Assim como no estudo de Moretti et al. (2013), esse grupo também observou que, apesar da baixa incidência, *C. glabrata* está surgindo como um importante agente entre as espécies não-*albicans*. A resistência ao fluconazol foi observada em algumas estirpes de *C. glabrata* e *C. krusei*. De acordo com os autores, a resistência às equinocandinas e à anfotericina B permanece rara no Brasil (MORETTI et al, 2013; DOI et al, 2016).

Em todos os estudos as taxas de mortalidade foram altas e não diferiram daquelas encontradas em outras regiões do mundo, ficando em torno de 50-70%. Pfaller et al. (2011) avaliou entre 2008 a 2009 as variações regionais de infecções invasivas por *Candida* spp. Entre os casos das regiões Ásia-Pacífico, América Latina, Europa e América do Norte a espécie *C. albicans* predominou entre os isolados (48,4%), seguida por *C. glabrata* (18,0%), *C. parapsilosis* (17,2%), *C. tropicalis* (10,5%) e *C. krusei* (1,9%). Entre as espécies não-*albicans*, os isolados de *C. glabrata* foram mais comuns na América do Norte (23,5%). Já na América Latina *C. parapsilosis* (25,6%) e *C. tropicalis* (17,0%) foram mais proeminentes. A resistência às equinocandinas e aos azóis foi mais prevalente entre os isolados de *C. glabrata* em todas as regiões, o que foi demonstrado outra vez no estudo recente de Cleveland et al. (2015).

Nucci et al. (2013) também publicou um estudo sobre a epidemiologia da candidemia na América Latina no qual *C. albicans* (37,6%), *C. parapsilosis* (26,5%) e *C. tropicalis* (17,6%) foram os principais agentes etiológicos encontrados (NUCCI et al., 2013).

A principal fonte das candidemias é de origem endógena, já que espécies de *Candida* constituem a microbiota de vários sítios anatômicos e se comportam como patógenos oportunistas. Outro mecanismo é por via exógena, a qual ocorre principalmente por meio de materiais médicos-hospitalares, como cateteres, sondas, respiradores ou soluções contaminadas por leveduras (ALONSO-VALLE et al., 2003; EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003; JACOBSEN et al., 2012).

Outro aspecto relevante em relação aos episódios de candidemia é o alto custo decorrente do atendimento ao paciente. Estudos descrevem que a maior parte dos gastos está relacionada ao maior tempo de internação e a terapia antimicrobiana, necessitando muitas vezes fazer associação entre diversos antimicrobianos e medicamentos complementares para o tratamento destes pacientes (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; DAVIES et al., 2003).

2.1.4 Fatores de virulência de *Candida* spp.

Os fatores de virulência exibidos por *Candida* spp. são responsáveis pela eficácia no desenvolvimento de infecções (NAVES et al, 2013). Geralmente, estes processos infecciosos são favorecidos pela ruptura do equilíbrio parasita-hospedeiro. Diversos autores consideram a alta capacidade de aderência a superfícies abióticas e bióticas, a produção de enzimas extracelulares, fosfolipase, proteinases, hemolisinas e toxinas que intensificam o processo inflamatório, causam lesão celular e degradam os tecidos do hospedeiro e a formação de biofilmes como os principais fatores de virulência desse fungo (DE ARAÚJO LIMA, 2017). A produção de tubo germinativo por algumas espécies de *Candida* spp., a hidrofobicidade da superfície celular e resistência ao peróxido de hidrogênio, o polimorfismo e a variabilidade fenotípica também são características de virulência que merecem destaque (CALDERONI; FONZI, 2001; DE ARAÚJO LIMA, 2017).

A adesão das células de *Candida* é um fenômeno complexo e multifatorial que se baseia na expressão de diversos tipos de adesinas nas superfícies de células modificadas morfológicamente. Além disso, a habilidade em formar biofilme sobre as células do hospedeiro é uma característica marcante deste patógeno e resulta numa estabilidade na aderência do fungo aos tecidos (KHAN et al, 2010).

Várias enzimas produzidas por *Candida* spp. têm sido associadas à infecção e são consideradas como fatores de virulência. Dentre elas destacam-se as proteases e as fosfolipases, capazes de promover a destruição nas membranas celulares das células hospedeiras. As fosfolipases degradam os fosfolipídios da membrana plasmática das células do hospedeiro, alteram as características da superfície dessas células, facilitando a aderência e, conseqüentemente, a infecção, enquanto as proteases hidrolisam ligações peptídicas das proteínas presentes nas células do hospedeiro (NAVES et al, 2013).

As toxinas peptídicas são fatores de virulência clássicos de vários patógenos bacterianos. Tais toxinas foram recentemente descritas em *Candida albicans* (MOYES, 2016). A toxina candidalisina é uma toxina peptídica citolítica fúngica que danifica diretamente as membranas epiteliais. As estirpes de *C. albicans* que não possuem esta toxina não danificam as células epiteliais e são avirulentas em modelos animais de infecção da mucosa. Portanto, a produção de toxina mostra-se como um fator molecular crítico para o dano epitelial e reconhecimento do hospedeiro à *C. albicans* (MOYES, 2016).

A variabilidade fenotípica em *C. albicans* é expressada pelo fenômeno de “switching”. Esse fenômeno é reversível e ocorre espontaneamente em estado de estresse, sendo caracterizado por resultar em mudanças nas propriedades de superfície da célula, aparência da colônia, metabolismo, atributos bioquímicos e moleculares para se tornar mais virulenta e eficaz durante a infecção. O “switching” leva, como consequência, a alterações na aderência do fungo às células epiteliais, na suscetibilidade antifúngica e na atividade fungicida de neutrófilos. Essa é uma parte muito importante da adaptabilidade do patógeno para a mudança de ambiente durante a invasão do organismo humano (KARKOWSKA-KULETA et al, 2009; KHAN et al, 2010).

A capacidade de transição entre estados morfológicos (levedura-pseudohifa/hifa), em algumas espécies *Candida* tem sido considerada significativa no estabelecimento de vários processos associados à patogênese, incluindo invasão de células epiteliais, ruptura endotelial e penetração nos tecidos hospedeiros, além da evasão de células fagocíticas e formação de biofilme (ANDES et al, 2004; JACOBSEN et al, 2012). Como resultado, uma atenção substancial tem sido focada nas vias de sinalização que regulam essas transições morfológicas, com grande parte da pesquisa ocorrendo em *C. albicans* e as vias de sinalização que permitem a mudança morfofogenética dessas leveduras para formas de crescimento filamentosas e são reguladas pela proteína quinase A (NETT et al, 2014; KUMAR, 2018).

Cepas de *Candida* spp. capazes de dimorfismo formam biofilmes em cateteres constituindo de uma camada basal de levedura, que serve como uma âncora para o substrato, e

uma camada de pseudohifas/hifas, que tem uma arquitetura mais aberta para facilitar o transporte de nutrientes. No geral, a estrutura tem várias características em comum com os biofilmes bacterianos (CHANDRA et al, 2001; ANDES et al, 2004; JACOBSEN et al, 2012; NETT et al, 2014).

2.1.5 Biofilmes de *Candida* spp.

Candida spp. são os fungos predominantes isolados de dispositivos médicos infectados e respondem por aproximadamente 15% dos casos de sepse hospitalar. Vários modelos experimentais para a formação e análise de biofilmes de *Candida* spp. *in vitro* têm sido propostos. A maior parte dos estudos disponíveis utilizam *C. albicans* como modelo por ser a espécie mais comumente identificada em contextos clínicos (GULATI; NOBILE, 2016; LOHSE et al., 2018).

Os estudos têm se concentrado na análise do impacto de diferentes tipos de substratos, meios nutricionais e presença de fluxo ou estática no desenvolvimento do biofilme. Em laboratório, *C. albicans* mostrou-se capaz de desenvolver um biofilme maduro uma ampla gama de condições e em vários substratos e diferentes (GULATI; NOBILE, 2016).

O biofilme de *C. albicans in vitro* é altamente estruturado, contendo uma rede de leveduras, hifas e pseudohifas, envolvidas por material de matriz extracelular polimérica. Em geral, esse modelo correlaciona-se bem com o biofilme *in vivo*. Biofilmes de *Candida* spp. recuperados de camundongos com estomatite dentária e de camundongos com cateteres intravasculares infectados confirmam a presença dessas estruturas (ANDES et al, 2004; NETT et al, 2014; LOHSE et al., 2018).

A descrição do desenvolvimento do biofilme de *Candida* spp. tem sido subdividida em quatro etapas: aderência, crescimento (ou proliferação), maturação e dispersão (Figura 1). A descrição do processo de formação do biofilme se inicia com um complexo fenômeno de adesão de células leveduriformes a uma superfície e a formação de uma camada basal que funciona como âncora do biofilme, através de interações fracas e reversíveis envolvendo forças hidrofóbicas e eletrostáticas (COTTER; KAVANAGH, 2000; LOHSE et al., 2018). Proteínas Als (*aglutinina-like sequence*) parecem se comportar como adesinas de biofilme (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006), uma vez que estudos observaram aumento da expressão de vários genes *ALS* durante sua formação (GREEN et al., 2004).

Nessa primeira etapa, as células de *C. albicans* aderem a superfícies bióticas e abióticas e também a outras células adjacentes de *C. albicans*, contribuindo para a integridade estrutural

do biofilme. Esse é o primeiro passo crucial na formação de biofilmes desse fungo. Após a fase de aderência, as células proliferam ainda na forma de levedura e permanecem ligadas à camada âncora. Posteriormente, acontece a fase de proliferação, na qual pseudohifas e hifas começam a se formar a partir das células leveduriformes já aderidas, e continuam a se alongar e proliferar. Subsequentemente observa-se a maturação do biofilme, caracterizada por uma rede estruturada de células sésseis de diferentes morfologias, incluindo leveduras, pseudohifas e hifas, totalmente envolvidas por uma matriz extracelular composta de proteínas, carboidratos, lipídios, hexosamina, ácido urônico e ácidos nucléicos. A presença da matriz pode ser evidenciada em fases anteriores do desenvolvimento, porém é mais abundante durante e após o estágio de maturação do biofilme (BAILLIE; DOUGLAS, 2000; COSTERTON et al., 2003; AL-FATTANI; DOUGLAS, 2004; LOHSE et al., 2018).

A matriz do biofilme funciona como uma barreira física de proteção e fornece integridade estrutural ao biofilme. Além disso, essa estrutura exerce papel fundamental na resistência de biofilmes maduros à ruptura mecânica e à ação dos fármacos antifúngicos. Sob a maioria das condições experimentais *in vitro*, o biofilme de *C. albicans* é considerado maduro após aproximadamente 24 horas de crescimento (SARDI et al., 2013; DE ARAÚJO LIMA, 2017; LOHSE et al., 2018)

A aparência espessa, com diversas camadas de células tem sido observada nos biofilmes maduros tanto em *in vitro* quanto *in vivo* e também em ambientes clínicos como, por exemplo, em cateteres contaminados retirados de pacientes (BAILLIE; DOUGLAS, 2000; LOHSE et al., 2018).

Uma vez completamente amadurecido, o biofilme inicia o seu último estágio, no qual lentamente as células, blastoconídios, se desprendem das hifas e se dispersam, contribuindo assim para a disseminação da infecção. Esses eventos são coordenados através da liberação de fatores de sinalização celular pelas células do biofilme descrito como Quorum Sensing. Nos biofilmes de *Candida* spp., o fator de Quorum Sensing denominado Farnesol foi identificado como inibidor do desenvolvimento de hifas. Uma hipótese para a função do Farnesol nos biofilmes é que a inibição na formação das hifas contribui para a fase de dispersão das células (LOHSE et al., 2018), etapa que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de candidemia e doenças invasivas por biofilme de *Candida* spp. (SHCHEPIN et al, 2003; KELLER; SURETTE, 2006; UPPULURI et al., 2010).

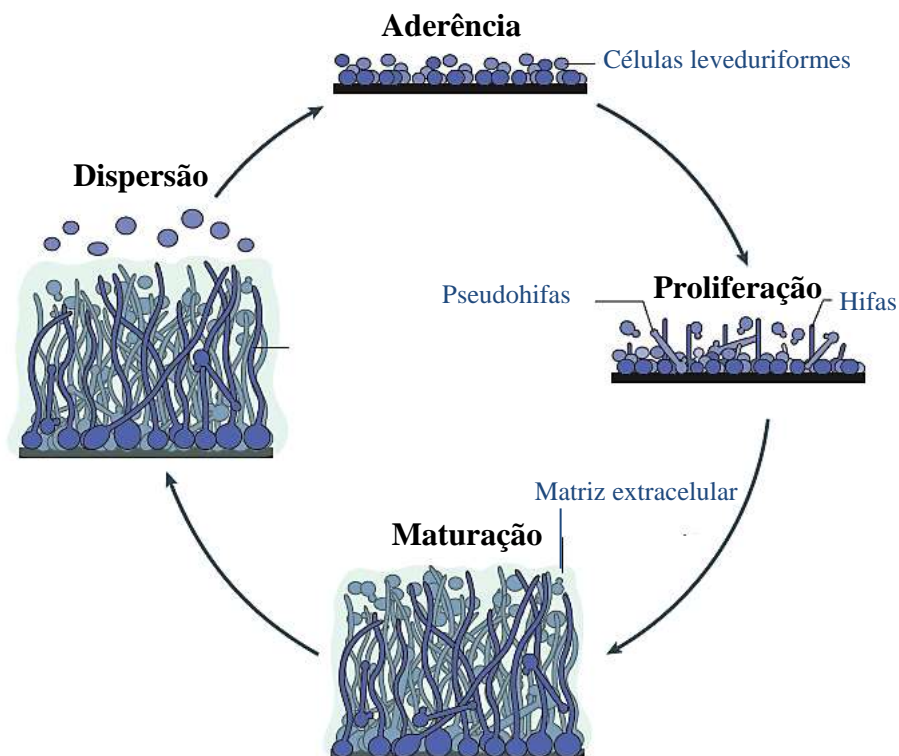


Figura 1. A formação dos biofilmes de *Candida* spp. dividida em quatro etapas: aderência, proliferação, maturação e dispersão. Fonte: Adaptado de LOHSE et al., 2018.

2.1.6 Agentes antifúngicos

Apesar do crescente número de casos de infecções fúngicas em todo o mundo, o arsenal de antifúngicos disponíveis atualmente para o tratamento dessas infecções ainda é limitado. De forma geral, para o tratamento das candidíases invasivas por *Candida* spp. são utilizados agentes poliênicos (anfotericina B), azólicos (fluconazol e voriconazol) e equinocandinas (casposfungina, anidulafungina e micafungina) (PAPPAS et al., 2016).

As semelhanças entre as células fúngicas e as células mamíferas dificultam o desenvolvimento de novos antifúngicos, pois ambas são células eucarióticas. Por outro lado, as diferenças entre as características dos envoltórios celulares das células de mamíferos e dos fungos permitem que os processos de síntese de componentes como a parede celular fúngica tornem-se alvo para os antifúngicos, sem comprometer as células mamíferas. A inibição da biossíntese de DNA, a perturbação dos fusos mitóticos e interferência no metabolismo intermediário também são alvos muito utilizados pelos agentes antifúngicos. A diferença mais amplamente explorada entre as células de mamíferos e a dos fungos para o desenvolvimento de fármacos é a presença de ergosterol e outros esteróis na membrana celular fúngica, em

oposição ao colesterol presente nas células de mamíferos (PAPPAS et al, 2009; MARIO et al., 2012).

2.1.6.1 Agentes poliênicos

Os poliênicos agem no ergosterol localizado na membrana plasmática das células fúngicas, formando poros que causam a desestabilização da membrana e o extravasamento de componentes citoplasmáticos, o que leva a morte celular. Os dois poliênicos comercialmente disponíveis atualmente são a Nistatina e a Anfotericina B. Devido à toxicidade de Nistatina, este poliênico só é utilizado como antifúngico tópico, não sendo uma opção para o tratamento das micoses sistêmicas (KUHN et al., 2002; MARIO, 2012).

A Anfotericina B desoxicolato (Figura 2) foi isolada pela primeira vez em 1956 e em 1965 foi o primeiro agente antifúngico a ser aprovado pela U.S. *Food and Drug Administration* (FDA). Esse fármaco representou uma revolução no tratamento das infecções fúngicas invasivas, sendo o mais utilizado no tratamento de tais infecções até o início da década de 90 (MAERTENS, 2004; MARIO et al., 2012).

A Anfotericina B não é absorvida por via oral ou intramuscular, sendo necessária a administração intravenosa do fármaco. Apesar disso, ainda é considerada um dos agentes antifúngicos mais eficientes para uso sistêmico; porém, a toxicidade, sobretudo a nefrotoxicidade, tem restringido sua utilização clínica (KUHN et al., 2002; MARIO et al., 2012).

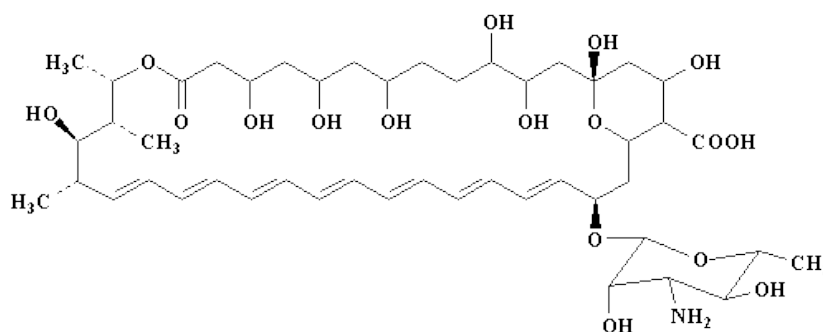


Figura 2. Estrutura química da Anfotericina B. Fonte: BERDICHEVSKI, 2003.

Por demonstrar um excelente espectro de ação antifúngico, em contrapeso aos severos efeitos adversos, a indústria farmacêutica investiu no melhoramento da formulação da Anfotericina B, desenvolvendo três novas formas de apresentação desse fármaco:

Anfotericina B complexo lipídico (ABCL), Anfotericina B em dispersão coloidal (ABCD), além da forma lipossomal (L-Amb). Essas formulações diferem entre si em relação a propriedades bioquímicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas, mas mantêm o espectro de ação da formulação em desoxicolato e apresentam menor nefrotoxicidade, além de permitirem a administração de maiores dosagens do fármaco (REX et al, 2001; DUPONT, 2002; MARIO et al., 2012). As formulações lipídicas são úteis nos casos em que ocorrem reações adversas graves relacionadas à infusão da anfotericina B desoxicolato. Entretanto, o custo de um tratamento com qualquer formulação lipídica da Anfotericina B é altíssimo quando comparado ao tratamento com a formulação tradicional (REX et al., 2000; KUHN et al. 2002; MISTRO et al., 2016).

2.1.6.2 Agentes azólicos

Os antifúngicos azólicos são fármacos sintéticos com características fungistáticas, que apresentam um anel imidazol ligados por ligação carbono-nitrogênio com outros anéis aromáticos. Estes agentes antifúngicos recebem diferentes classificações, de acordo com o número de átomos de nitrogênio presentes no anel imidazol. Os imidazólicos (miconazol, cetoconazol) possuem dois átomos de nitrogênio enquanto que os triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol) apresentam três átomos de nitrogênio no anel azólico (MARIO et al., 2012).

Os azólicos agem interferindo na síntese do ergosterol, através da inibição da enzima lanosterol 14- α -demetilase, codificada pelo gene *ERG11*. Esta enzima converte lanosterol a ergosterol e o truncamento desta via favorece o aparecimento, na membrana citoplasmática, de precursores do ergosterol, que são considerados tóxicos. O ergosterol da membrana plasmática é importante na fluidez, na permeabilidade, na estruturação da morfologia celular, na atividade enzimática e na progressão do ciclo celular (PASQUALOTTO; DENNING, 2008).

Entre os antifúngicos disponíveis comercialmente, os azólicos são os mais utilizados na prática clínica, principalmente o fluconazol (Figura 3A). Este antifúngico triazólico apresenta largo espectro de ação, com perfil farmacocinético favorável, boa disponibilidade, baixa toxicidade e apresentações para administração oral e endovenosa. Os triazólicos são a classe mais nova de antifúngicos azólicos e demonstram grande eficiência terapêutica, com um espectro de atividade mais amplo e reduzida toxicidade quando comparados aos imidazólicos,

representando uma opção mais segura e eficaz para tratar infecções fúngicas locais e sistêmicas (MAERTENS, 2004; MARIO et al., 2012).

O fluconazol é utilizado no tratamento de infecções invasivas *Candida* spp. Entretanto, espécies menos susceptíveis ou resistentes a este antifúngico, tais como *C. krusei* e *C. glabrata* têm limitado a sua utilização (MAERTENS, 2004; GOEMAERE, 2018).

O voriconazol (Figura 3B) é um triazólico de segunda geração que está estruturalmente relacionado ao fluconazol, mas apresenta ainda maior potência e espectro de ação, podendo ser utilizado em infecções refratárias ao fluconazol. Esse antifúngico difere do fluconazol pela introdução de um grupo α -metila na estrutura principal propila do fluconazol e a substituição de um anel triazol por uma estrutura 4-fluoropirimidina. Essas alterações conferiram ao voriconazol maior potência antifúngica e ação fungicida contra alguns fungos filamentosos, como *Aspergillus* spp. (GUPTA et al, 2005; ARAÚJO, 2008; HUYNH et al., 2018).

Apesar da eficácia, segurança e amplo espectro, o voriconazol ainda apresenta interações medicamentosas e efeitos colaterais clássicos dos azólicos, tais como hepatotoxicidade, além de sintomas gastrointestinais (náuseas, vômitos e diarreia) e interações medicamentosas (SABO e ABDEL-RAHMAN, 2000; MOREIRA, 2010)

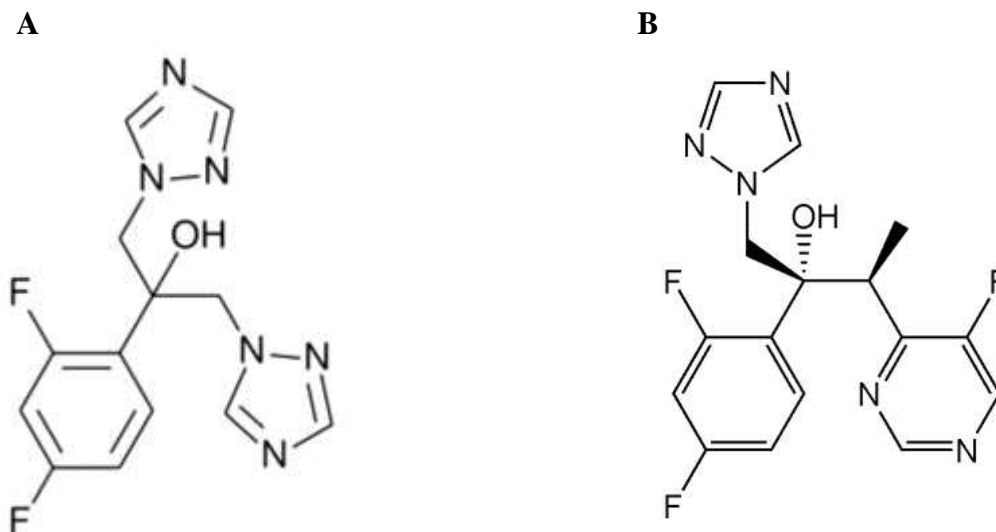


Figura 3. Estrutura química dos agentes triazólicos. **A**, Fluconazol e **B**, Voriconazol. Fonte: KAUFFMAN et al., 2011.

2.1.6.3 Equinocandinas

A mais nova classe de antifúngicos é representada pelas equinocandinas, composta por três agentes: caspofungina, anidulafungina e micafungina. Os efeitos antifúngicos dos poliênicos e azólicos se devem às suas ações sobre a membrana celular fúngica, enquanto as equinocandinas atuam desorganizando a parede celular fúngica (PFALLER, 2012; SARDI et al., 2013).

As equinocandinas são amplamente ativas contra *Candida*, apresentando efeito fungicida *in vitro* inclusive contra espécies resistentes/menos susceptível aos agentes azólicos como *C. glabrata* e *C. krusei* e contra células de biofilme. Além disso, são fungistáticas contra espécies de *Aspergillus*. A candidíase invasiva e a aspergilose são infecções fúngicas nosocomiais graves cada vez mais frequentes em todo o mundo e as equinocandinas surgiram como alternativas terapêuticas de primeira linha para tratamento dessas infecções (SARDI et al., 2013; PERLIN, 2015).

Todas as equinocandinas atuam pela inibição da 1,3- β -D-glucano sintetase, sendo inibidores seletivos e não competitivos, bloqueando a produção de β -1,3-D-glucana, um dos principais componentes da parede celular fúngica e o bloqueio de sua síntese resulta em desequilíbrio osmótico, prejudicando a viabilidade fungo (BOWMAN et al, 2002). Glucano sintetase é um complexo enzimático com subunidades transmembranas (Fksp) e uma unidade citosólica (Rho1p). A subunidade Fksp é codificada por três genes relacionados (*FKS1*, *FKS2* e *FKS3*) que catalisa a transferência de moléculas de UDP-glicose a partir de moléculas doadoras ativadas para moléculas receptoras específicas formando ligações glicosídicas (KARTSONIS et al, 2003; MARIO et al., 2012).

Essa enzima alvo não está presente nas células de mamíferos, o que confere às equinocandinas importantes vantagens tais como poucos efeitos colaterais. Além disso, as equinocandinas têm farmacocinética favorável que permite a administração uma vez ao dia e apresentam uma rápida atividade antifúngica. Por outro lado, têm o espectro de ação limitado e somente podem ser administradas por via intravenosa (KAUFFMAN et al., 2011; STAN; TUCHILUS; STAN, 2014).

Devido ao seu mecanismo de ação, as equinocandinas não apresentam resistência cruzada em isolados de *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. resistentes aos azóis (KAUFFMAN et al., 2011). Essa classe de antifúngicos também demonstra diminuir *in vitro* a capacidade de *C. albicans* de formar biofilmes e, em contraste com os antifúngicos triazóis e a formulação

convencional da Anfotericina B, exibem atividade antifúngica contra células sésseis de *C. albicans* em biofilmes (STAN;TUCHILUS; STAN, 2014).

Casos de resistência às equinocandinas são pouco relatados, contudo alguns estudos descrevem que a maior parte dos casos de resistência esta associada a mutações em algumas regiões das subunidades Fks1 e Fks2 da 1,3- β -D-glucano sintetase (THOMPSON et al, 2008; PERLIN, 2015).

As equinocandinas disponíveis comercialmente são lipopeptídeos semi-sintéticos com estrutura química de hexapeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral de ácido graxo. Equinocandinas naturais e pneumocandinas naturais não têm utilidade terapêutica, porém, algumas delas foram estudadas mais profundamente para o desenvolvimento de diversos análogos semissintéticos, derivados dos compostos naturais isolados (MARIO et al., 2012).

2.1.6.4 Caspofungina

Começando com as candidatas naturais isoladas do meio de cultura das espécies de *Glarea lozoyensis*, foi obtido um análogo da pneumocandina B0, chamada caspofungina, que entrou no mercado norte-americano em 2001 (CANCIDAS® - Merck, EUA) em frascos de 50 ou 70 mg de pó liofilizado. Na Europa, foi introduzido em terapia em 2002 (CANCIDAS®, Merck & Co. Inc., EUA, MK-0991). A caspofungina também foi a primeira equinocandina a chegar ao Brasil, sendo introduzida ao mercado brasileiro em outubro de 2001 (STAN;TUCHILUS; STAN, 2014; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2016).

A caspofungina (Figura 4) tem uma boa farmacocinética, com 84% de ligação às proteínas plasmáticas e tempo de meia vida de 9-11h. A sua administração na forma acetato (CANCIDAS®) é apenas por via intravenosa (KAUFFMAN et al., 2011; STAN;TUCHILUS; STAN, 2014). A solução é obtida após a reconstituição da formulação em pó usando uma solução para perfusão. O medicamento pode ser armazenado sob refrigeração por até 24 horas após a reconstituição (PIGATTO; UCHOA; COSTA, 2009; MARIO et al., 2012).

É indicada como tratamento de primeira linha para adultos, adolescentes e crianças com candidíase invasiva ou aspergilose invasiva quando o paciente não responde ou não tolera anfotericina B ou voriconazol e também é utilizada com sucesso no tratamento da candidíase invasiva em pacientes imunocomprometidos. O esquema terapêutico recomendado é uma dose de ataque de 70 mg, seguida de 50 mg por dia. Estudos demonstram que essa terapia mantém as concentrações plasmáticas do fármaco em cerca de 1 μ g/mL a partir do primeiro

dia, sendo suficiente para inibição de *Candida* e *Aspergillus*. A duração da terapia deve ser de duas a três semanas (MARTINEZ, 2006; KAUFFMAN et al., 2011; MARIO et al., 2012).

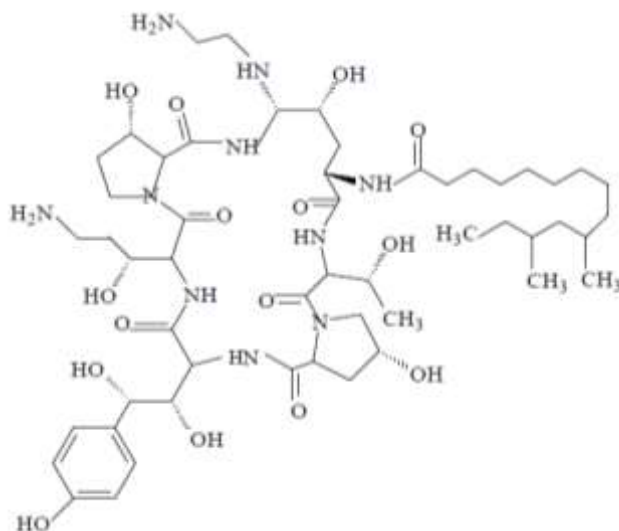


Figura 4. Estrutura química da caspofungina. Fonte: STAN;TUCHILUS; STAN, 2014.

2.1.6.5 Micafungina

Outro análogo da pneumocandina B0 é a micafungina (Figura 5), uma equinocandina semissintética obtida por conversão dos compostos naturais isolados dos caldos de fermentação de *Coleophoma empetri* F-11899 (STAN;TUCHILUS; STAN, 2014). Essa equinocandina é fabricada no Japão e comercializada pela Astellas Pharma sob o nome comercial MYCAMINE® em frascos de 50 mg ou 100 mg de pó liofilizado. O fármaco foi aprovado pelo FDA em 16 de março de 2005. Agência Europeia de Medicamentos (EMA) aprovou para o mercado europeu em 25 de abril de 2008 (STAN;TUCHILUS; STAN, 2014).

A micafungina tem uma distribuição rápida nos tecidos e eliminação lenta. O tempo de meia-vida é de aproximadamente 13 h e ligação às proteínas plasmáticas em torno de 99,5 % (WAGNER & et al., 2006; PIGATTO; UCHOA; COSTA, 2009).

Assim como as outras equinocandinas, a administração da micafungina (MYCAMINE®) é realizada apenas por via intravenosa. A Micafungina foi aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso no Brasil em 2010, sendo indicada para o tratamento de adultos, adolescentes, crianças e neonatos com candidíase invasiva profilaxia em indivíduos submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas, tratamento de infecções por *Aspergillus* e terapia empírica de febre neutropênica. Para uso pediátrico a

micafungina tem sido a equinocandina mais utilizada na clínica e também a estudada e as pesquisas demonstram segurança e eficácia, com farmacocinética semelhante a observada nos adultos (DIOMEDI, 2004; PIGATTO; UCHOA; COSTA, 2009; BORMANN & MORRISON, 2009; MARIO et al., 2012).

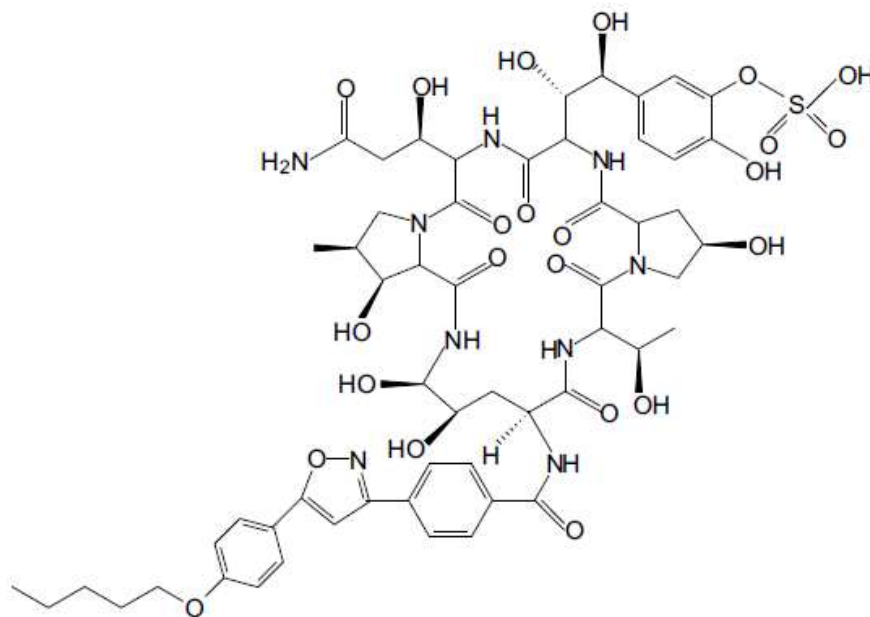


Figura 5. Estrutura química da micafungina. Fonte: STAN;TUCHILUS; STAN, 2014.

2.1.6.6 Anidulafungina

A anidulafungina (Figura 6) é um análogo semissintético da equinocandina B obtida pela conversão da equinocandina natural B isolada das espécies de *Aspergillus nidulans* e comercializado pela Pfizer (U.K.) sob o nome comercial ERAXIS® em frascos de 50 mg ou 100 mg de pó liofilizado. Foi aprovada pela FDA em 2006 e pela EMA em 2007. No mercado europeu a Anidulafungina é comercializada sob o nome comercial ECALTA® também pela Pfizer (UK). Anidulafungina é indicada para tratamento via intravenosa em casos de candidíase superficial, candidíase invasiva e aspergilose (STAN;TUCHILUS; STAN, 2014).

O perfil farmacocinético da anidulafungina apresenta um tempo de meia-vida de 25 h e percentual de ligação às proteínas plasmáticas em cerca de 80 % em humanos. A anidulafungina é a única equinocandina que apresenta 90 % da dose metabolizada lentamente no plasma humano, sendo submetido a um processo de biotransformação com abertura do anel para posterior degradação por peptidases inespecíficas (KAUFFMAN et al., 2011; STAN;TUCHILUS; STAN, 2014; PIGATTO; UCHOA; COSTA, 2009).

Estudos que avaliaram a relação farmacocinética/farmacodinâmica da anidulafungina observaram que as concentrações do fármaco encontradas na urina são baixas, fazendo com que a esse fármaco não seja útil para o tratamento de candidíases no trato urinário (SABOL & GUMBO, 2008; PIGATTO; UCHOA; COSTA, 2009).

Como ocorre com todas as equinocandinas, a anidulafungina pode ser administrada com segurança em pacientes com insuficiência renal, sem necessidade de ajuste de dose. Também não é necessário nenhum ajuste na dose de anidulafungina para qualquer grau de insuficiência hepática (VAZQUEZ & SOBEL, 2006).

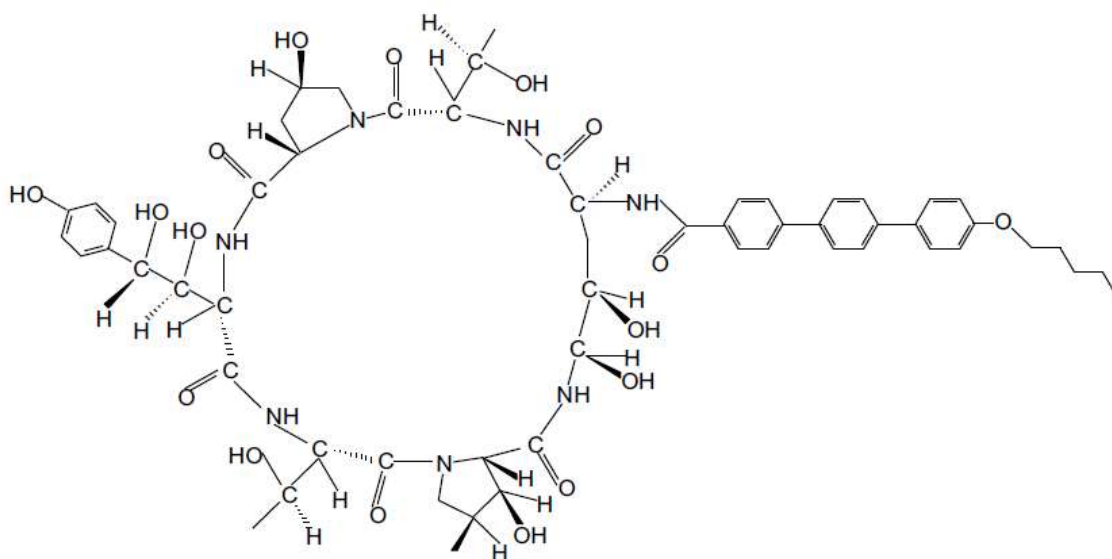


Figura 6. Estrutura química da anidulafungina. Fonte: STAN;TUCHILUS; STAN, 2014.

2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* pertence à família Pseudomonadaceae e foi proposto pela primeira vez em 1984. Esse gênero compreende mais de cem espécies, que são classificadas de acordo com critérios morfológicos, estrutura celular, composição da parede celular, tipos de pigmentos produzidos, características nutricionais e metabólicas, suscetibilidade a diferentes compostos e produção de antibióticos (MOORE et al., 2006; MOLINA et al., 2013; OZEN; USSERY, 2012; STAN;TUCHILUS; STAN, 2014). Bactérias do gênero *Pseudomonas* são bacilos Gram-negativos, aeróbicos, catalase positiva, oxidase positiva e não fermentadores de lactose, que se apresentam isolados ou aos pares e são movidos por flagelos polares (KISKA; GILLIGAN, 1999; TRABULSI et al., 1999).

Pseudomonas aeruginosa é o mais importante patógeno humano do gênero *Pseudomonas*, e é um micro-organismo ubiqüitário que comumente habita o solo, água e vegetais e faz parte da microbiota normal do ser humano, podendo ser encontrada na pele, garganta e nas fezes de indivíduos sadios e colonizando os mais diversos materiais hospitalares (TASSIOS et al, 1998; SILVA, 1999; MURRAY et al, 2000).

As cepas bacterianas de *P. aeruginosa* são consideradas patógenos oportunistas em humanos, uma vez que esse micro-organismo raramente causa infecções em indivíduos saudáveis, mas representa um importante agente de infecções hospitalares em indivíduos imunocomprometidos, tais como neonatos, idosos, pacientes em UTI, pacientes com câncer, transplantados e indivíduos HIV positivo (PAVIANI; STADNIK; HEINEK, 2004).

P. aeruginosa apresenta ampla expressão de fatores de virulência, resistência natural e adquirida a diversos antibióticos e desinfetantes e uma grande capacidade de receber e transmitir fatores de resistência a antimicrobianos. Essa bactéria é intrinsecamente resistente a vários antimicrobianos, incluindo cloranfenicol, tetraciclínas, algumas quinolonas e alguns β -lactâmicos. Infecções hospitalares causadas por essa bactéria são de difícil tratamento e podem ter uma evolução fatal (FERREIRA, 2005).

Atualmente, a gama de antibacterianos com atividade contra *P. aeruginosa* inclui penicilinas (piperacilina), cefalosporinas (ceftazidima, cefepima), carbapenêmicos (imipenem, meropenem), monobactams (aztreonam), aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina, ampicacina) e fluoroquinolonas (ciprofloxacina) e as polimixinas (polimixina B e colistina) (TASSIOS et al, 1998; BHAT et al, 2007).

2.2.1 Epidemiologia

Pseudomonas aeruginosa está envolvida em infecções de diversos sítios anatômicos, incluindo aquelas localizadas no trato gastrintestinal, sistema nervoso central, sistema musculoesquelético, sistema urinário e, principalmente, infecções do trato respiratório, especialmente em Unidades de Terapia Intensiva. Sua importância clínica está baseada na difícil erradicação da infecção e contínuos fracassos terapêuticos, consequência direta da ampla expressão de fatores de virulência, assim como a resistência natural e adquirida a muitos antibióticos e desinfetantes (MURRAY et al, 2000; TORTORA et al, 2002).

Segundo dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) e do *National nosocomial infections surveillance system* (NNIS), *P. aeruginosa* é a segunda causa de pneumonia adquirida em hospital, terceira causa de infecção do trato urinário, quarta causa de

infecção do sítio cirúrgico (8%), sétimo patógeno isolado da corrente sanguínea (2%) e o quinto patógeno isolado de todos os locais (9%) (EL SOLH; ALHAJHUSAIN, 2009).

A alta incidência de infecções hospitalares por *P. aeruginosa* pode ser atribuída a diversas propriedades, tais como a fácil adaptação às diferentes condições ambientais de nutrição, temperatura e sua capacidade de sobreviver durante longos períodos de tempo em ambientes úmidos. Essas propriedades fazem com que quase todos os equipamentos e utensílios hospitalares, principalmente aqueles com componentes líquidos, possam servir de reservatório para essa bactéria, como nebulizadores, soluções antissépticas, desinfetantes, pias, sanitários, respiradores, equipamentos de ventilação mecânica, fluídos de administração intravenosa, entre outros. Este conjunto de fatores propicia a infecção dos pacientes internados, principalmente em UTI. A transmissão pode ocorrer por meio de algum reservatório ou através das mãos dos profissionais da saúde (FERREIRA, 2005). Na América Latina, o SENTRY – Latin America Study Group, desenvolve um programa de vigilância antimicrobiana, fornecendo relatórios sobre a incidência de micro-organismos em infecções hospitalares, nos quais *P. aeruginosa* aparece como o micro-organismo mais isolado entre os agentes bacterianos de pacientes com infecção no trato respiratório inferior, internados em 11 centros médicos de seis países da América Latina (SADER et al, 1998). Um estudo epidemiológico mais recente analisou as infecções por patógenos Gram-Negativos em UTIs da América Latina e Caribe e mostrou *P. aeruginosa* como o terceiro agente mais isolado (LUNA et al, 2014).

No Brasil, o programa SENTRY de vigilância antimicrobiana disponibilizou em 2001 o resumo dos resultados de três anos de estudo sobre frequência dos patógenos e padrões de resistência em hospitais brasileiros. Os resultados mostraram *P. aeruginosa* como o 3º patógeno mais frequentemente identificado e o agente que apresentou maior problema de resistência bacteriana, com 30,2% das cepas isoladas apresentando resistência ao imipenem (SADER et al, 2001). Dados atuais mostram que *P. aeruginosa* continua sendo um dos principais patógenos envolvidos em infecções nosocomiais no Brasil e que o número de cepas resistentes subiu consideravelmente nos últimos anos, apresentando taxas de resistência ao carbapenem de até 66% em alguns hospitais da América Latina (LABARCA et al., 2016).

Dentre todas as possíveis topografias das infecções hospitalares, as localizadas no trato respiratório inferior são consideradas as de maior importância clínica, não somente pela alta frequência em que ocorrem, mas também pela alta taxa de morbimortalidade associada. O risco é ainda mais elevado quando a infecção está associada à ventilação mecânica através de intubação orotraqueal ou traqueostomia. Esses pacientes apresentam um risco 2 a 10 vezes

maior de morte que pacientes sem ventilação, especialmente quando a pneumonia está associada a *Pseudomonas* spp. (AMARAL; CORTÊS; PIRES, 2009; ANVISA, 2004).

2.2.2 Fatores de virulência em *P. aeruginosa*

Como as infecções causadas por *P. aeruginosa* envolvem diferentes órgãos e tecidos, os seus fatores de virulência são obrigatoriamente diversificados e em grande número, alguns fazem parte da estrutura celular e outros são produtos extracelulares. A expressão desses fatores é regulada por condições externas como osmolaridade, concentração de ferro e também mecanismos moleculares, chamados de *Quorum Sensing* (LINCOPAN; TRABULSI, 2008; PULCRANO et al., 2012).

Esse micro-organismo possui adesinas que são fundamentais para o estabelecimento da infecção. Há pelo menos quatro componentes estruturais da superfície de *P. aeruginosa* descritos como envolvidos no processo de adesão: flagelo, pili, lipopolissacarídeo (LPS) e alginato. O flagelo e o pili também medeiam a mobilidade de *P. aeruginosa*, e o lipídio A, componente do LPS, é responsável pela atividade de endotoxina. O alginato é um exopolissacarídeo mucoide que forma uma cápsula proeminente na superfície bacteriana e protege os organismos da fagocitose e da ação dos antibacterianos. A produção deste polissacarídeo mucoide tem uma regulamentação complexa. Os genes que controlam a produção do alginato podem ser ativados em pacientes com fibrose cística ou outras doenças respiratórias crônicas, que são predispostos à colonização de longa duração com cepas mucoides de *P. aeruginosa* (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER 2015; TORTORA et al, 2002). Além desses mencionados, toxinas e enzimas secretadas, tais como a exotoxina A, piocianina, Pioverdina, elastases, hemolisinas, proteases, fosfolipase C, exoenzimas, sistemas de secreção (Tipo III e tipo VI) e capacidade de formar biofilmes são extremamente importantes para o estabelecimento da infecção (LINCOPAN; TRABULSI, 2008; PULCRANO et al., 2012; ZHAO et al., 2018).

2.2.3 Biofilmes de *P. aeruginosa*

Cepas de *P. aeruginosa* podem ser encontradas tanto em forma planctônica quanto em biofilmes. Quando a densidade populacional torna-se suficientemente elevada o *quorum-sensing* desencadeia a expressão de um grande número de genes que auxiliam a transição das células bacterianas planctônicas para um crescimento em biofilme. Quando estão em sua

forma sésil em biofilme essas cepas exibem uma capsula polissacarídica composta por alginato. (LINCOPAN; TRABULSI, 2008; PULCRANO et al., 2012).

Em termos de estrutura, os biofilmes de *P. aeruginosa* são semelhantes aos biofilmes de *Candida* spp. São heterogêneos, contendo várias microcolônias de células bacterianas envolvidas por uma matriz de exopolissacarídeo (EPS), permeadas por canais de água, que permitem fluxo de fluidos e de nutrientes (FREITAS; SAND; SIMONETTI, 2010; PULCRANO et al., 2012).

A formação do biofilme de *P. aeruginosa* ocorre através de etapas de desenvolvimento distintas baseadas em dados observacionais. Após a ligação inicial de células individuais a uma superfície, as bactérias movem-se sobre a superfície por movimentos de motilidade para formar aglomerados de células ou microcolônias. As células continuam a proliferar e formam um biofilme maduro constituído por várias camadas de células empilhadas uma sobre a outra. (COSTERTON et al, 1995; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; O'TOOLE; KOLTER, 1998).

Em biofilmes, *P. aeruginosa* pode sintetizar três diferentes tipos de EPS designados como Pel, Psl e alginato, embora a capacidade genética para o fazer varie entre as cepas (HARMSSEN et al, 2010). As evidências disponíveis sugerem que principalmente Pel e Psl são sintetizados durante a formação de biofilme *in vitro*, enquanto o polissacarídeo de alginato é produzido durante infecções *in vivo*. O alginato é um exopolissacarídeo consistido de monômeros de ácido manurônico e de ácido gulurônico e, frequentemente, é produzido em grandes quantidades durante infecções crônicas por *P. aeruginosa* como, por exemplo, infecção pulmonar crônica em pacientes com fibrose cística (FC). Eventualmente, o ambiente desfavorável no pulmão com FC faz com que *P. aeruginosa* apresente uma superprodução de alginato, que faz com que a bactéria sofra uma conversão para um fenótipo mucoide (SIMPSON; SMITH; DEAN, 1989; HENTZER et al, 2001).

Acredita-se que o alginato tenha uma função protetora em ambientes relativamente hostis, nos quais as bactérias são continuamente submetidas a estresse oxidativo e ataque pelo sistema imunológico. Também se pensa que a mudança para esse fenótipo mucoide promova a persistência de *P. aeruginosa* nas vias aéreas, causando a infecção crônica (SIMPSON; SMITH; DEAN, 1989; HENTZER et al, 2001). Alguns autores acreditam que as adaptações genéticas ao meio ambiente podem resultar na não repressão dos genes de biossíntese de alginato em *P. aeruginosa*, o que leva à superprodução de alginato e conseqüente mudança para o fenótipo mucoide (WOZNIAK, 2003; HARMSSEN et al, 2010; RYBTKE et al, 2015).As pesquisas realizadas nas últimas décadas demonstram que os biofilmes são a causa

subjacente de uma variedade de infecções associadas a implantes. As infecções humanas ocasionadas por biofilmes nos quais *P. aeruginosa* desempenha um papel substancial incluem pneumonia em pacientes com fibrose cística, infecções crônicas de ferida, otite média crônica, prostatite bacteriana crônica e infecções relacionadas a dispositivos médicos, especialmente pneumonia associada a aparelhos de ventilação mecânica (RYBTKE et al., 2015).

Vários grupos de pesquisa investigaram a penetração de antimicrobianos em biofilmes de *P. aeruginosa*. A conclusão geral desses trabalhos foi que as fluoroquinolonas penetram facilmente os biofilmes de *P. aeruginosa*, enquanto que os aminoglicosídeos se difundem mais lentamente, se ligando a polímeros de matriz tais como alginato (DAVIES et al, 1998; BAILLIE; DOUGLAS, 1999).

É crescente o número de evidências demonstrando que as infecções crônicas por *P. aeruginosa* envolvem comunidades de micro-organismos ligadas à superfície, organizadas em biofilmes, e altamente resistentes aos antibióticos (HENTZER et al, 2001). Sabe-se que os biofilmes bacterianos estão envolvidos em muitos tipos de infecções crônicas e que bactérias de biofilme são fisiologicamente distintas das bactérias planctônicas da mesma espécie. Uma característica das bactérias de biofilme é que elas podem ser até 1.000 vezes mais resistentes aos antibióticos do que os seus homólogos de vida livre. Além disso, já foi demonstrado que a matriz EPS de alginato, produzida por bactérias de *P. aeruginosa* em biofilmes, inibe a fagocitose não-opsônica pelas células do sistema imunológico, possivelmente impedindo que os componentes bacterianos ativem os receptores nos macrófagos (RYBTKE et al., 2015; GOMPELMAN; VAN ASTEN; PETERS, 2016).

Os biofilmes bacterianos de *P. aeruginosa* têm sido bastante estudados em pulmões de pacientes com FC. É característico os biofilmes nos pulmões desses pacientes estejam envolvidos por leucócitos polimorfonucleares (PMNs) que são constantemente recrutados (RYBTKE et al., 2015).

Apesar da resposta imune inflamatória prolongada, dominada pelos PMNs, o sistema imunológico não é capaz de erradicar a infecção. Ramnolipídeo, um fator de virulência produzido por *P. aeruginosa*, mostrou causar necrose de PMNs em estudos *in vitro* e *in vivo* e acredita-se que esteja envolvido no mecanismo de resistência dos biofilmes de *P. aeruginosa* nas infecções crônicas (RYBTKE et al., 2015).

Quando a fagocitose é ineficaz, os PMNs ativados podem liberar as chamadas armadilhas extracelulares de neutrófilos (*Neutrophil Extracellular Traps* - NETs) compostas de DNA e proteínas associadas, incluindo elastase neutrofílica e mieloperoxidase (DWYER et al., 2014; RYBTKE et al., 2015). Entretanto, estudos *in vitro* mostraram que a *P. aeruginosa* pode se

beneficiar do DNA liberado e incorporá-lo como parte da matriz extracelular, o que pode aumentar ainda mais a integridade e a resistência da matriz do biofilme contra antibióticos e defesas do hospedeiro (MANZENREITER, 2012; DWYER et al., 2014).

2.2.4 Agentes antipseudomonas

São considerados agentes antipseudomonas os seguintes antibióticos: Penicilinas (Piperacilina, Ticarcillina), combinações de β -lactâmico/ β -lactamase (Piperacilina/Tazobactam), cefalosporinas (Cefepime e Ceftazidima), monobactâmicos (Aztreonam), carbapenemas (Imipenem e Meropenem), aminoglicosídeos (Gentamicina, Tobramicina, Amicacina, Netilmicina), lipopeptídicos (Polimixina B e Colistina) e fluoroquinolonas (Ciprofloxacino, Levofloxacino, Lomefloxacina, Ofloxacina e Norfloxacina) (CLSI, 2015).

Apesar da disponibilidade de vários antimicrobianos antipseudomonas, as taxas de resistência tem aumentado em todo o mundo e por isso a vigilância epidemiológica em resistência antimicrobiana para *P. aeruginosa* é considerada necessária para conhecimento de dados locais, monitoramento de mudanças na resistência e estabelecimento do tratamento empírico e em cada unidade hospitalar. Pacientes com diabetes ou infecção do trato urinário também podem apresentar uma resposta desfavorável ao uso de antibióticos antipseudomonas (GIAMARELLOU; ANTONIADOU, 2001; CHOI et al., 2018).

Desde a década de 1990, o aumento da prevalência de infecções causadas por isolados resistentes de *P. aeruginosa* tem se tornado um grande problema clínico por todo o mundo. Infelizmente, há um descompasso entre a necessidade de novas alternativas para tratar as infecções resistentes e o desenvolvimento de fármacos antimicrobianos. Atualmente não há nenhuma nova classe de antibióticos antipseudomonas disponíveis para tratar esses patógenos multirresistentes e muitos dos isolados são resistentes a todos os antibióticos atualmente disponíveis, exceto as polimixinas. Por isso, os clínicos estão sendo forçados a usar polimixinas como a última linha de combate (BERGEN et al., 2012; LIU et al., 2018).

As Polimixinas disponíveis comercialmente são a polimixina B e a Colistina (Polimixina E), que possuem espectros antibacterianos semelhantes e atividade bactericida rápida. Ao contrário da Colistina, que é administrada por via parenteral e por inalação na forma de seu pró-fármaco inativo (Colistina metanossulfonato de sódio), a Polimixina B é administrada como seu sal sulfato (GIAMARELLOU; ANTONIADOU, 2001; ZAVASCKI, 2007). Embora a colistina e a polimixina B tenham atividade antibacteriana *in vitro* muito

semelhante, há diferenças importantes em sua ação em humanos. Estas diferenças surgem principalmente porque a polimixina B é administrada por via intravenosa na sua forma ativa, enquanto a colistina é administrada na forma do seu pró-fármaco colistimetato que é convertido na colistina ativa através de um processo que está sujeito a variabilidade interpessoal (NATION et al., 2015).

O sulfato de Polimixina B (500,000 UI para uso injetável) foi aprovado pelo FDA em 29 de junho de 1964 sendo uma revolução no tratamento de infecções por micro-organismos Gram-negativos. Porém, frequência de uso desses agentes diminuiu drasticamente ao longo dos anos devido ao seu elevado potencial de toxicidade (especialmente a nefrotoxicidade e neurotoxicidade) e a disponibilidade de antibióticos menos tóxicos (ZAVASCKI et al., 2008; BERGEN et al., 2012).

Ao longo das últimas décadas estudos de referência foram publicados relatando a farmacocinética de Colistina e Polimixina B e, dessa forma, permitiram a proposição de regimes de dose cientificamente baseados. Entretanto, ainda existem lacunas no conhecimento de sua farmacodinâmica e farmacocinética, tais como informações sobre a biodisponibilidade das Polimixinas em determinados grupos de pacientes até então não investigados (ZAVASCKI et al., 2008; BERGEN et al., 2012). Os estudos são necessários para definir as possíveis variações na ação do medicamento e no esquema de dosagem necessário para o tratamento de diferentes grupos de pacientes. Por exemplo, pacientes obesos têm sido mal representados nos estudos farmacocinéticos populacionais de colistina e polimixina B. Da mesma forma, pouca informação está disponível para orientar dosagem em pacientes pediátricos (NATION et al., 2015; TRAN et al., 2016).

Devido à sua maior disponibilidade no mercado global, a maioria dos estudos clínicos que visam a otimização da dosagem tem sido focados na colistina. Maiores estudos clínicos avaliando a farmacocinética e farmacodinâmica de polimixina B são urgentemente necessários para desenvolver estratégias de dosagem melhoradas com este fármaco. Diante da escassez de novas drogas a Polimixina B deve ser usada de forma que seu efeito antibacteriano seja maximizado e os efeitos nefrotóxicos sejam minimizados, bem como a emergência de resistência (NATION et al., 2015; TRAN et al., 2016; ZABAWA, 2016).

Embora o nível de resistência à polimixina B seja baixo, casos de resistência tem sido relatados recentemente, mas é possível que isso ocorra devido ao uso de esquemas terapêuticos com dosagens subinibitórias decorrentes da compreensão insuficiente da farmacocinética e farmacodinâmica do fármaco. Não há, por exemplo, nenhum estudo randomizado ou estudos com *quorum* suficiente avaliando a concentração plasmática da

Polimixina B ao longo do tempo após a administração intravenosa. Um estudo que avaliou a distribuição da Polimixina B após a administração via intravenosa em nove pacientes observou que o volume médio de distribuição foi de 47,2 L e a meia-vida em torno de 13 horas. Estudos adicionais são escassos (KWA et al, 2008; ZAVASCKI et al., 2008; BERGEN et al., 2012).

A Polimixina B (Figura 7) é uma mistura dos polipeptídeos polimixinas B1 e B2, ambos obtidos de linhagens de *Bacillus polymyxa* com atividade bactericida para micro-organismos Gram negativos. A polimixina B exerce seu efeito antimicrobiano através de sua ação nas membranas celulares das bactérias. Especificamente, este antibiótico atua ligando-se ao componente fosfolipídico de carga negativa da membrana celular bacteriana via afinidade eletrostática com os grupos amino carregados positivamente, causando alterações na estrutura da membrana celular, ruptura da integridade da parede celular e aumento da permeabilidade à água e às moléculas e consequente lise celular. Como as células eucarióticas também contêm fosfolipídios em suas membranas celulares, a polimixina B também é capaz de romper as barreiras de permeabilidade dessas células, fato que é apontado como o responsável pela elevada toxicidade demonstrada pelo fármaco (GIAMARELLOU; ANTONIADOU, 2001; KWA et al, 2008; ZAVASCKI et al., 2008; BERGEN et al., 2012).

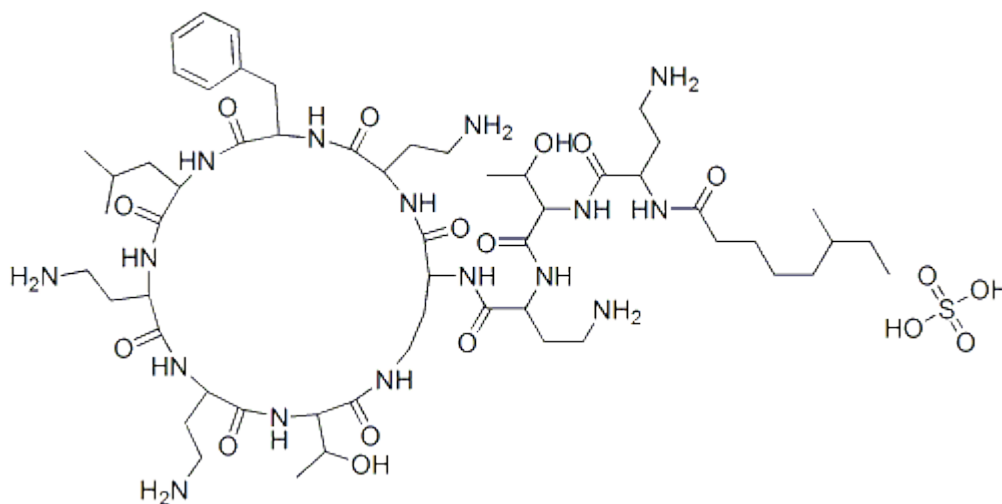


Figura 7. Estrutura química da Polimixina B. Fonte: LIU et al., 2018

2.3 Biofilmes Polimicrobianos

Muitas infecções da corrente sanguínea, infecções do trato urinário e infecções pulmonares em ambiente hospitalar estão associadas a formação de biofilmes nos dispositivos

médicos implantados (DONLAN, 2001). Os biofilmes podem ser compostos de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e/ou fungos. Em dispositivos médicos-hospitalares as bactérias Gram-positivas geralmente isoladas a partir destes incluem *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus viridans* e as Gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Entre as espécies fúngicas as comumente associadas aos biofilmes são *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. Estes micro-organismos podem originar-se da pele de pacientes ou de fontes no ambiente hospitalar. Os biofilmes em dispositivos podem ser compostos de uma única espécie ou de várias espécies microbianas, sendo mais frequentes os polimicrobianos. A composição do biofilme varia dependendo do tipo de dispositivo e da sua duração de utilização no doente (DONLAN, 2001). Por exemplo, biofilmes em cateter urinário podem, inicialmente, ser compostos de uma única espécie, mas exposições mais longas levam, inevitavelmente, a formação de biofilmes polimicrobianos (STICKLER, 1996; DE PÁDUA, 2008).

Em ambiente hospitalar os biofilmes polimicrobianos representam um problema de saúde clinicamente relevante com potencial para servir como reservatório infeccioso para uma variedade de micro-organismos como bactérias e fungos. Infecções relacionadas também estão associadas as taxas de mortalidade mais altas quando comparadas com infecções causadas por uma espécie microbiana. Além disso, a presença de patógenos eucarióticos e procarióticos é um evento muito importante, pois dificulta tanto o diagnóstico quanto o tratamento (FAIX e KOVARIK, 1989; HARRIOTT; NOVERR, 2011; TREJO-HERNANDEZ et al., 2014).

2.3.1 Biofilmes polimicrobianos de *Candida* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*

Exames realizados em dispositivos de pacientes infectados revelaram que *P.aeruginosa* e *Candida* spp. estão entre os patógenos formadores de biofilme mais comumente encontrados colonizando cateteres venosos centrais, sendo *C. albicans* a espécie fúngica mais encontrada (DOUGLAS, 2003; DESAI; MITCHELL; ANDES, 2014, RAMAGE et al., 2005, THOMAS; LITTON; RINDE, 2005). Pacientes sob ventilação mecânica ou com doença pulmonar crônica, como a fibrose cística, são susceptíveis a infecção por *P. aeruginosa* e *Candida* (TREJO-HERNANDEZ et al., 2014).

Casos de co-infecção por ambas as espécies também já foram bem documentados em pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV), com amplas evidências

que suportam as interações multifacetadas entre fungo-bactéria-hospedeiro. Estudos clínicos sugerem ainda que a colonização do trato respiratório por *Candida* spp. poderia aumentar o risco de PAV causada por *P. aeruginosa*, tendo uma mortalidade estimada de 10-40%. Indivíduos com colonização traqueobrônquica por *Candida* spp. tratados com antifúngicos tiveram diminuição de infecção por *P. aeruginosa* em relação àqueles que não receberam tratamento (AZOULAY et al., 2006; NSEIR et al., 2007).

Pacientes vítimas de queimaduras também são suscetíveis a co-colonização e co-infecção por *C. albicans* e *P. aeruginosa*. Um estudo que avaliou infecção de ferida de queimadura em modelo murino (NEELY; LAW; HOLDER, 1986) demonstrou o aumento da virulência de *C. albicans* na presença de *Pseudomonas*. A co-infecção levou a uma maior mortalidade do que a infecção monomicrobiana e maiores encargos fúngicos foram observados no local da ferida e nos órgãos internos, sugerindo que seria o fungo o principal agente causador da infecção que levou ao óbito (NEELY; LAW; HOLDER, 1986). Casos fatais de candidemia em pacientes queimados são muitas vezes precedidos por infecção bacteriana no local da ferida, especialmente por *P. aeruginosa* (PELEG et al., 2010; DHAMGAYE et al, 2016).

Muitos estudos têm descrito infecções mistas com *P. aeruginosa* e *C. albicans* em casos que vão desde cateteres contaminados a doença pulmonar crônica e as observações sugerem que as populações bacterianas e fúngicas influenciam uma as outras (PELEG et al., 2010). Os estudos *in vitro* demonstram o largo espectro de interações entre *P. aeruginosa* e *C. albicans* e enfatizam a importância das condições ambientais para determinar o resultado de uma interação. Por exemplo, uma pesquisa sobre a formação de biofilmes em cateter urinário mostrou que *P. aeruginosa* teve maior capacidade de aderência à superfície do cateter quando na presença de *C. albicans* (DE PÁDUA et al., 2008).

2.3.2 Interação entre *P. aeruginosa* e *C. albicans* em biofilmes polimicrobianos

Diversas condições influenciam o comportamento e a interação dos micro-organismos em biofilme. Já foi demonstrado que fatores como hipóxia, disponibilidade de ferro, presença de DNA extracelular e produção de etanol influenciam nos biofilmes mistos de *C. albicans* e *P. aeruginosa in vitro* (FOURIE et al., 2016; DEVEAU et al., 2018).

Estudos identificaram o nível de oxigênio como um importante modulador para as interações entre *C. albicans* e bactérias. Os biofilmes de *C. albicans* e outras espécies de *Candida* criam um nicho anaeróbico, favorecendo bactérias anaeróbias e antagonizando as

aeróbias, influenciando diretamente na composição do microbioma (JANUS; WILLEMS; KROM, 2016, JANUS et al., 2017). Entretanto, *P. aeruginosa* é um micro-organismo de metabolismo bastante versátil e, apesar de utilizar o oxigênio como o aceptor final de elétrons, possui alternativas que permitem o seu crescimento em condições de anaerobiose. Em baixas condições de oxigênio *P. aeruginosa* utiliza fenazinas, tais como a Piocianina, para sobreviver (KOLEY et al, 2011). Acredita-se que esse seja um dos motivos para a produção de fenazinas mostrar-se aumentada em biofilmes mistos de *P. aeruginosa* e *C. albicans* em comparação com biofilmes monomicrobianos dessa bactéria (O'BRIEN; FOTHERGILL, 2017). Dessa forma, nos biofilmes mistos, a produção aumentada de fenazina por *P. aeruginosa*, por sua vez, aumenta a produção de etanol de *C. albicans*, na medida em que as fenazinas exercem uma mudança da respiração para a fermentação no fungo (MORALES et al., 2013). Por outro lado, a produção de etanol por *C. albicans* estimula ainda mais a produção de fenazina por *P. aeruginosa* e a formação de biofilme por essa bactéria, gerando um ciclo de realimentação entre bactéria e fungo que, teoricamente, aumenta a virulência de ambos os micro-organismos (CHEN et al. 2014). Esses efeitos mediados pelo oxigênio e produção de metabólitos podem desempenhar um papel importante para a diversidade e composição do biofilme, bem como para a sua resistência ao tratamento nos processos de infecção (O'BRIEN; FOTHERGILL, 2017; DEVEAU et al, 2018).

Além disso, sabe-se que as populações bacterianas e fúngicas modulam o comportamento coletivo usando sinais extracelulares conhecidos como *quorum sensing* (QS). Uma vez que este regulamento geralmente ocorre em resposta à densidade celular, processos como co-agregação e formação de biofilme promovem a síntese e secreção de moléculas QS, aumentando a probabilidade de que as células vizinhas detectem os sinais em níveis suficientes para induzir uma resposta. Assim, o estudo de interações bacteriana-fúngicas em associação com biofilmes mistos revela que a comunicação entre bactérias e fungos é um processo comum, e que sinais de QS, conhecido por seus papéis na comunicação entre membros de uma mesma espécie, também podem mediar a interferência entre bactérias e fungos (PELEG et al, 2010).

2.3.2.1 O papel das moléculas de QS de *P. aeruginosa* em biofilmes polimicrobianos

Diversas pesquisas sobre o *crosstalk* entre *P. aeruginosa* e *C. albicans* revelaram que cada espécie secreta uma molécula QS estruturada de forma semelhante, que pode ser detectada por outras espécies. Por exemplo, a N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserina lactona (3-oxo-

HSL), uma importante molécula de QS produzida por *P. aeruginosa* teve seu efeito estudado na adesão celular em biofilmes polimicrobianos de *P. aeruginosa* e *C. albicans* (OVCHINNIKOVA ET AL. 2012). O estudo mostrou que mutantes para 3-oxo-HSL foram incapazes de aderir às hifas de *C. albicans* enquanto que uma estirpe não mutante foi capaz de fazer a adesão às hifas de *C. albicans*. O estudo sugeriu que a 3-oxo-HSL é necessária para a aderência da *P. aeruginosa* em hifas de *C. albicans*, isso porque 3-oxo-HSL é necessária para a produção de proteínas de adesão de superfície em células de *P. aeruginosa*.

Outro estudo realizado (MCALESTER ET AL., 2008) mostrou que se um sobrenadante livre de células de uma cepa de *P. aeruginosa* produtora de altas concentrações de 3-oxo-HSL for adicionado à cultura de *C. albicans*, a transição de levedura para hifas é inibida, enquanto que o sobrenadante de estirpes que produziram quantidades reduzidas de 3-oxo-HSL não inibiu a transição de levedura para hifas quando foi adicionado às culturas de *C. albicans*. Esses resultados sugeriram a molécula de QS de *P. aeruginosa* é capaz de preservar o processo de filamentação de *C. albicans* de forma dose-dependente, a forma fúngica importante para a adesão da bactéria (MORALES; HOGAN, 2010, OVCHINNIKOVA ET AL., 2012, GULATI; NOBILE, 2016).

Outros autores sugerem ainda que a resposta de *C. albicans* para a 3-oxo-HSL pode levar à dispersão das células de *C. albicans* quando na presença de *P. aeruginosa*. Isso porque a filamentação de *C. albicans* é um pré-requisito para a adesão, formação de biofilme e subsequente infecção por esse fungo (FOURIE et al., 2016; GULATI; NOBILE, 2016)

Dessa forma, estes estudos mostram que 3-oxo-HSL não é apenas importante para a comunicação bacteriana, mas também é uma das responsáveis pela interação com outros micro-organismos, tais como *C. albicans*. Em conjunto, estes dados suportam o conceito de que espécies filogeneticamente distintas podem detectar e responder às moléculas de sinalização diversificadas, produzidas nos nichos onde eles coexistem (PELEG et al., 2010).

2.3.2.2 O papel das moléculas de QS de *C. albicans* em biofilmes polimicrobianos

Estudos *in vitro* sobre os perfis transcricionais de isolados clínicos de *C. albicans* com diferentes capacidades para formar biofilmes revelaram que cepas que formavam biofilmes mais espessos tinham expressão aumentada de genes específicos de hifas, como por exemplo, o *Hyphal wall protein 1 precursor* (Hwp1) em comparação com as cepas formou biofilmes mais finos (BEAUSSART et al, 2013; SCHLECHT et al., 2015). Outros estudos

demonstraram que reguladores de transcrição (por exemplo, *Biofilm and cell wall regulator 1* - Bcr1) também desempenham papéis cruciais nas interações entre *C. albicans* e espécies bacterianas, tais como *S. epidermidis* e *S. aureus* (PETERS et al., 2012; SCHLECHT et al., 2015; LOHSE et al., 2017)

Embora o regulador de biofilme Bcr1 não seja necessário para a formação de hifas, ele é necessário para que as hifas se aderem umas às outras, uma propriedade crítica para manter a rede do biofilme. Consistente com essa ideia, pesquisas com biofilmes mistos envolvendo a deleção dos genes *BCR1* ou *HWPI* resultaram em menos bactérias aderidas e interagindo com *C. albicans*, bem como menor retenção de células dentro de um biofilme (NOBILE et al., 2016).

Assim, as hifas presentes no biofilme de *C. albicans* fornecem um arcabouço para outras células e para a matriz, resultando em uma estrutura resiliente com várias centenas de micrômetros de espessura. As extensas redes de hifas observadas em biofilmes maduros de *C. albicans* são uma característica que distingue os biofilmes de *C. albicans* dos de espécies fúngicas estreitamente relacionadas, tais como *C. parapsilosis*, que formam leveduras e pseudohifas; esta diferença pode resultar no aumento da resistência de biofilmes monomicrobianos e polimicrobianos de *C. albicans* em relação aos de outras espécies (NOBILE et al., 2016; LOHSE et al., 2017).

A molécula de QS de *C. albicans* chamada farnesol também tem sido amplamente estudada. Essa molécula inibe a formação do tubo germinativo e causa uma mudança morfológica do estado de hifa para levedura. Essa molécula inibe a via controlada por *RAS1*, envolvida no crescimento de hifas, mesmo em condições que normalmente desencadeiam filamentação tais como presença de soro e temperatura de 37°C (MORALES; HOGAN, 2010). Recentemente o farnesol também foi identificado atraindo macrófagos em hospedeiros (HARGARTEN ET AL., 2015). Os autores especularam que essas células imunes poderiam estar envolvidas com a disseminação, à medida que os macrófagos são mortos por *C. albicans* após o processo de englobamento na fagocitose (HARGARTEN ET AL., 2015.).

Foi demonstrado que esta molécula pode também modular o comportamento de bactérias e sua virulência, alterando a produção de fenazinas tóxicas, tais como a piocianina em *P. aeruginosa*. Quando *P. aeruginosa* e *C. albicans* são colocados em uma co-cultura o farnesol inibe a quinolona *Pseudomonas Quinolone Signal* (PQS) e um subsequente fator de virulência, piocianina, cuja produção é controlada por PQS. Entretanto não foi demonstrado efeito sobre o crescimento global de *P. aeruginosa in vitro* (MORALES; HOGAN, 2010; GULATI; NOBILE, 2016; FOURIE et al., 2016).

Além de diminuir a produção de PQS e piocianina, o farnesol inibe a motilidade do tipo *swarming* em *P. aeruginosa* (MCALESTER ET AL., 2008; FOURIE et al., 2016). Adicionalmente, o farnesol também pode induzir a geração de espécies reativas de oxigênio em certo número de micro-organismos e este processo pode desempenhar um papel importante em competição com as bactérias (HORNBY et al., 2001; MORALES; HOGAN, 2010; GULATI; NOBILE, 2016).

Além disso, a interação entre as bactérias e fungos parece influenciar o comportamento desses patógenos nas co-infecções em modelos animais e em humanos, levando ao aumento da produção de toxinas, maior inflamação e dano tecidual no hospedeiro (PELEG et al., 2010).

2.3.3 É possível uma monoterapia das infecções polimicrobianas por *Candida* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* ?

No tratamento de infecções relacionadas a biofilmes, geralmente recomenda-se a remoção do dispositivo médico; entretanto, em alguns casos isso não é indicado e, muitas vezes o biofilme já pode ter invadido a mucosa e tecidos contíguo (PAPPAS et al., 2016; RAMAGE et al., 2014). Em geral, tais infecções esbarram em dificuldades no diagnóstico e no tratamento com os antimicrobianos disponíveis. Para biofilmes de *Candida*, somente as equinocandinas e formulação lipossomal de Anfotericina B são atualmente recomendados (PRESS et al., 2014; RAMAGE et al., 2014; PAPPAS et al., 2016).

As equinocandinas representam uma classe de antifúngicos composta por três agentes: caspofungina, micafungina e anidulafungina, que têm como mecanismo de ação a inibição não competitiva da enzima β -1,3-glucano sintetase, que catalisa a polimerização da glicose-uridina-difosfato (UDP-glicose) em β (1,3)D-glucano, principal componente da parede celular de fungos e da matriz extracelular dos biofilmes de *Candida* spp. (DIOMEDI, 2004; ESCHENAUER et al., 2007).

A detecção qualitativa de β (1,3)D-glucano no soro é um indicador de infecções invasivas por fungos, podendo ser usada como método auxiliar no diagnóstico e/ou prognóstico de fungemias. Apesar de β (1,3)D-glucano ser componente fundamental da parede celular de fungos e da matriz extracelular de biofilmes de *Candida* spp., esta substância tem sido encontrada no soro de pacientes que sofrem de infecções por *P. aeruginosa*, sugerindo uma reação cruzada com β (1,3)D-glucano bacteriana. Os estudos revelaram a presença de β (1,3)D-glucano em *P. aeruginosa* semelhante ao de *C. albicans*

como um glucano periplasmático e componente da matriz extracelular de biofilmes da bactéria. Estudos documentaram que o gene *NDVB* de *P. aeruginosa* codifica uma enzima glicosiltransferase essencial na formação de β (1,3)D-glucano nessa bactéria (LEQUETTE et al. 2007; COULON et al. 2010; BEAUDOIN et al. 2012; BAZZI et al, 2013).

Desde então, surgiu o interesse em avaliar o efeito das equinocandinas em isolados de *P. aeruginosa* que produzem biofilmes. Um estudo “*in vitro*” avaliou o uso da micafungina em biofilmes de *P. aeruginosa* (BAZZI et al, 2013). Os resultados mostraram uma redução estatisticamente significativa na biomassa do biofilme em 13 dos 18 isolados testados indicando que a micafungina pode inibir a formação de biofilmes dessa bactéria. Interessantemente, os autores mostram que a micafungina pode inibir a glicosiltransferase (produto do gene *NDVB*) através de inibição não-competitiva (BAZZI et al, 2013). Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa avaliou o efeito da Micafungina em combinação com quatro diferentes agentes antibacterianos (ceftazidima, levofloxacina, ciprofloxacina e aztreonam) *in vitro* e *in vivo* (KISSOYAN et al., 2016). Os pesquisadores observaram que após o tratamento com micafungina sozinha ou combinada com um dos quatro agentes antibacterianos a produção de biofilme foi significativamente reduzida e os níveis relativos de transcrição de mRNA de *NDVB* diminuíram significativamente com o tratamento com Micafungina. *In vivo*, as taxas de sobrevivência de camundongos BALB/c infectados com *P. aeruginosa* aumentaram significativamente após tratamento com Micafungina combinada a cada um dos agentes antibacterianos, sendo a combinação de micafungina com levofloxacina a que apresentou maior eficácia contra a infecção induzida por *P. aeruginosa* (KISSOYAN, 2016).

Conhecendo através de tais pesquisas prévias o efeito de uma equinocandina sobre células bacterianas e sabendo que infecções nosocomiais polimicrobianas associadas a biofilmes são cada vez mais frequentes e que as opções atualmente disponíveis para o tratamento requerem administração de grande quantidade de antimicrobianos, com elevado custo terapêutico e uma série de efeitos colaterais para os pacientes, estratégias como o uso das equinocandinas no tratamento de infecções polimicrobianas disseminadas causadas por *C. albicans* e *P. aeruginosa* pode melhorar os desfechos dessas enfermidades e, também, reduzir efeitos colaterais e custos, sendo uma alternativa para o tratamento da infecção mista.

Pesquisas sobre as interações entre *P. aeruginosa* e *C. albicans* e como esses dois micro-organismos respondem aos fármacos quando interagindo em biofilme, podem fornecer um modelo para o estudo de muitas interações bactéria-fungo (AARON et al., 2002, RAMAGE et al., 2001, BAZZI et al, 2013). Em vista disso, esse trabalho teve como principal

objetivo avaliar o efeito inibitório “*in vitro*” da caspofungina e micafungina sobre biofilmes mistos de *Candida* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito inibitório *in vitro* de equinocandinas sobre biofilmes mistos de *Candida* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Obter o perfil de suscetibilidade antimicrobiana de células planctônicas de *Candida* spp. e de *Pseudomonas aeruginosa*;

3.2.2 Padronizar biofilmes monomicrobianos e mistos de *Candida* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*;

3.2.3 Avaliar o efeito das equinocandinas em biofilmes monomicrobianos e mistos de *Candida* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Foram utilizados seis isolados de *Candida* spp. e sete isolados de *Pseudomonas aeruginosa* para a realização dos ensaios desse trabalho. As cepas padrão das diferentes espécies de *Candida* foram cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Segurança (INCQS, Fiocruz, Rio de Janeiro/RJ, Brasil) e o isolado *C. albicans* SC5314 e IAL-40 foram cedidos pela Profa. Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem do Instituto Adolfo Lutz (IAL, São Paulo/SP, Brasil). As cepas padrão e os isolados clínicos de

Pseudomonas aeruginosa foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Nilton Lincopan do departamento de Microbiologia do ICB/USP, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Cepas de *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas neste trabalho.

Isolados	Origem	Cedido por
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Clínica	INCQS – Fiocruz
<i>C. albicans</i> IAL-40	Clínica	Prof. Dra. Marcia S. C. Melhem (IAL)
<i>C. albicans</i> SC5314	Clínica	Prof. Dra. Marcia S. C. Melhem (IAL)
<i>C. tropicalis</i> ATCC 200956	Clínica	INCQS – Fiocruz,
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	Clínica	INCQS – Fiocruz
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	Clínica	INCQS – Fiocruz
<i>P. aeruginosa</i> PA01	Clínica	Prof. Dr. Nilton Lincopan (ICB/USP)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	Ambiental	Prof. Dr. Nilton Lincopan (ICB/USP)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Clínica	Prof. Dr. Nilton Lincopan (ICB/USP)
<i>P. aeruginosa</i> 48-1997 ^a	Clínica	Prof. Dr. Nilton Lincopan (ICB/USP)
<i>P. aeruginosa</i> 141	Ambiental	Prof. Dr. Nilton Lincopan (ICB/USP)
<i>P. aeruginosa</i> 151	Ambiental	Prof. Dr. Nilton Lincopan (ICB/USP)
<i>P. aeruginosa</i> 564-FC	Clínica	Prof. Dr. Nilton Lincopan (ICB/USP)

INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Segurança (INCQS, Fiocruz, Rio de Janeiro/RJ, Brasil); Instituto Adolfo Lutz (IAL, São Paulo/SP, Brasil); Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP, São Paulo/SP, Brasil).

4.2 Condições de cultivo e estocagem das cepas de *Candida* spp.

As leveduras de *Candida* spp. foram semeadas em meio ágar Sabouraud dextrose e incubadas por 24h a 37 °C. Posteriormente as colônias foram semeadas em 2 mL de meio Caldo Sabouraud dextrose e incubadas por 24h a 37 °C a 150 RPM. O resultado dessa semeadura foi acrescido de 20% de glicerol e congelado em freezer a -80°C. Para os experimentos as cepas foram reativadas utilizando 2 mL de meio Caldo Sabouraud dextrose e incubando-as por 24 h a 37 °C a 150 RPM. Após o crescimento, os isolados foram

subcultivados no mesmo meio e incubados por 24 h a 37 °C e a 150 RPM para obtenção de um ótimo crescimento fúngico.

4.3 Condições de cultivo e estocagem das cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram semeadas em meio ágar MacConkey e incubadas por 24 h a 37 °C. Posteriormente as colônias foram semeadas em 2 mL de meio Caldo Soja Trypticaseína (TSB) e incubadas por 24h a 37 °C a 150 RPM. O resultado dessa semeadura foi acrescido de 20% de glicerol e congelado em freezer a -80 para preservação. Para os experimentos as cepas foram reativadas utilizando 2 mL de caldo Luria Bertani (LB) e incubando-as por 24 h a 37 °C e a 150 RPM.

4.4 Teste de suscetibilidade aos antibacterianos pelo método de disco-difusão

Para a determinação do perfil suscetibilidade de células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa* aos antibacterianos foi realizado o ensaio de disco-difusão, seguindo as normas padronizadas pelo documento M7-A10 (CLSI, 2015). O critério de interpretação utilizado foi de acordo com o estabelecido pelo documento M100-S25 (CLSI, 2015). Foram testados discos de antibacterianos de seis diferentes classes (aminoglicosídeos, lipopeptídicos, carbapenêmicos, monobactâmicos, fluoroquinolonas e combinação de inibidores β -lactâmico/ β -lactamase) que se encontram listados em três dos cinco grupos de antimicrobianos indicados para testes de rotina nos laboratórios clínicos de acordo com o CLSI (2015): Amicacina (30 μ g), Aztreonam (30 μ g), Cefepime (30 μ g), Ceftazidima (30 μ g), Ciprofloxacino (5 μ g), Gentamicina (10 μ g), Imipenem (10 μ g), Meropenem (10 μ g), Piperaciclina/Tazobactam (100/10 μ g) e Polimixina B (300 U), todos da Sensifar-Cefar, Diagnóstica, São Paulo, Brasil. O experimento foi realizado em duplicata e repetido em dias diferentes (Tabela 2).

Tabela 2. Agrupamento dos agentes antimicrobianos que devem ser considerados pelos laboratórios de microbiologia clínica para testes e relatórios de rotina sobre micro-organismos não fastidiosos, de acordo com o sugerido no documento CLSI M100-S15 (2015).

Teste/Relatório de grupos	Agente antimicrobiano	Conteúdo do disco	Critério interpretativo do halo de inibição (em mm)		
			S	I	R
COMBINAÇÕES DE INIBIDORES β-LACTAMICO/β-LACTAMASE					
B	Piperacillina-tazobactam	100/10 μ g	≥ 21	15-20	≤ 14
CEFEMAS (SOMENTE VIA PARENTERAL) (Incluindo cefalosporinas I, II, III, e IV)					
A	Ceftazidima	30 μ g	≥ 18	15-17	≤ 14
B	Cefepime	30 μ g	≥ 18	15-17	≤ 14
MONOBACTAMICOS					
B	Aztreonam	30 μ g	≥ 22	16-21	≤ 15
CARBAPENEMICOS					
B	Imipenem	10 μ g	≥ 19	16-18	≤ 15
B	Meropenem	10 μ g	≥ 19	16-18	≤ 15
POLYPEPTÍDEOS CÍCLICOS (LIPOPEPTÍDICOS)					
O	Polimixina B	300 unidades	≥ 12	-	≤ 11
AMINOGLICOSÍDEOS					
A	Gentamicina	10 μ g	≥ 15	13-14	≤ 12
B	Amicacina	30 μ g	≥ 17	15-16	≤ 14
FLUOROQUINOLONAS					
B	Ciprofloxacino	5 μ g	≥ 21	16-20	≤ 15

Nota: Grupos de antimicrobianos – Grupo A, Teste e relatório primários; Grupo B, Teste primário e relatório seletivo; Grupo O ("outros"), Possuem indicação clínica específica para alguns grupos de organismos, mas não são candidatos a testes e relatórios rotineiros pelo CLSI.

4.5 Determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos sobre células planctônicas (CIM-P) pelo método de microdiluição em caldo

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado o ensaio de microdiluição seguindo o protocolo proposto no documento M27-A3 (CLSI, 2008) para *Candida* spp. e M7-A10 (CLSI, 2015) para *P. aeruginosa*. O critério de interpretação foi de acordo com o estabelecido pelo documento M27S4 (CLSI, 2012) para as leveduras e pelo documento M100-S25 (CLSI, 2015) para *P. aeruginosa*.

Preparo dos antimicrobianos: Utilizou-se o antibiótico Polimixina B (POL) da Oxoid e os antifúngicos Caspofungina (CAS), Micafungina (MICA) e Anfotericina B desoxicolato (AMB), todos da Sigma Aldrich Co., MO, USA. Os antimicrobianos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), água destilada estéril ou solução salina estéril, conforme a

necessidade, para obter soluções estoque 100x concentradas (1600 µg/mL para AMB, CAS e MICA, 800 µg/mL para POL) e estocadas a -20 °C para utilização nos ensaios.

Resumidamente, uma alíquota de 100 µL de RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16M foi distribuído em cada poço da microplaca de 96 poços e, posteriormente, diluições seriadas (1:2) dos antimicrobianos foram realizadas a fim de obter concentrações finais desejadas nos poços para cada fármaco testado (Figura 8).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anfotericina B	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	CP	CN
Caspofugina	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	CP	CN
Micafungina	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	CP	CN
Polimixina B	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	0,01	CP	CN

Figura 8. Distribuição das concentrações finais dos antimicrobianos nos poços da microplaca de 96 poços. CP; Controle Positivo, CN; Controle Negativo

Preparo do inóculo:

Candida spp. – Uma alçada retirada de uma cultura recente, semeada em Ágar Sabouraud Dextrose, foi transferida para um microtubo e dispersa em 1 mL de solução salina para a contagem de células em câmara de Neubauer e ajustadas para uma suspensão-padrão de levedura contendo 1- 5 x 10⁶ UFC/mL. A suspensão de trabalho foi produzida fazendo-se uma diluição 1:20 dessa suspensão-padrão, seguida de uma diluição de 1:50 em RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16M, resultando em concentração final de trabalho de 1 - 5 x 10³ UFC/mL.

P. aeruginosa - Uma alçada retirada de uma cultura recente, semeada em Ágar MacConkey, foi transferida para um microtubo e dispersa em 1 mL de solução salina. O ajuste da suspensão foi realizada utilizando um espectrofotômetro em comprimento de onda de 625nm acrescentando-se solução salina até se obter uma absorbância de 0,08 a 0,10, que é equivalente a turbidez da escala 0,5 McFarland (1 - 2 x 10⁸ UFC/mL. Em seguida, foi realizada uma diluição 1:1000, resultando em concentração de trabalho de 1 - 2 x 10⁵ UFC/mL em RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16M.

Incubação: Um volume de 100 µL de uma suspensão de leveduras ou bactérias previamente padronizadas foi dispensado em cada poço e as microplacas de 96 poços incubadas a 35 °C por 24-48h para *Candida* spp. e por 24h para *P. aeruginosa*.

Interpretação dos resultados: A concentração inibitória mínima de cada antimicrobiano sobre células planctônicas (CIM-P) foi definida visualmente como a menor concentração da droga capaz de inibir 50% ou 90% do crescimento microbiano (CI₅₀ e CI₉₀, respectivamente), dependendo do antimicrobiano (CI₉₀ para AMB, CI₅₀ para CAS, MICA e POL). Para confirmar a concentração inibitória mínima de cada antimicrobiano sobre células planctônicas (CIM-P) de *Candida* spp.

4.6 Determinação da concentração fungicida/bactericida mínima (CFM e CBM)

Após determinação da CIM-P, foram retirados 10 µL dos poços em que houveram inibição do crescimento microbiano para subcultivo em placas de ágar Sabouraud dextrose (para as leveduras) ou Ágar MacConkey (para as bactérias). Após 24 h de incubação a 35°C, a concentração fungicida ou bactericida mínima (CFM ou CBM, respectivamente) foi determinada sendo definida como a menor concentração capaz de impedir o recrescimento visível no subcultivo. Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos em dias diferentes.

4.7 Padronização dos inóculos de *Candida* spp. para a produção dos biofilmes

Para os ensaios de biofilme os inóculos foram preparados incubando uma a cinco colônias de *Candida* spp. em meio caldo Sabouraud dextrose por 24 h a 37 °C, sob agitação de 150 RPM. Posteriormente o sedimento contendo as leveduras foi obtido pela centrifugação das amostras a 5500 RPM por 10 minutos em condições assépticas. O sedimento foi ressuspenso em 5 mL de PBS e o número de leveduras por mL dessa suspensão foi determinado através de contagem de células em uma câmara de Neubauer. Finalmente, foi realizado o ajuste das amostras em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16M para a obtenção de uma suspensão a 1×10^7 UFC/mL.

4.8 Cinética da produção dos biofilmes de *Candida* spp.

Para a produção dos biofilmes de *Candida* spp. uma alíquota de 100 µL da suspensão previamente padronizada a 1×10^7 UFC/mL em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16

M foi dispensada nos poços da microplaca de 96 poços de poliestireno e de fundo chato. As placas foram incubadas por 96 h a 37 °C (PIERCE et al., 2008) em duas estratégias: sem e com agitação (150 RPM). Após cada período de 24 h de incubação por até 96 h, o sobrenadante foi retirado e os biofilmes lavados com PBS para remoção das células não aderentes. Posteriormente os biofilmes foram quantificados pela coloração com cristal violeta (CV) (Ver tópico “Quantificação dos biofilmes”). Esse ensaio foi realizado em quadruplicata e repetido em dias diferentes.

4.9 Padronização dos inóculos de *Pseudomonas aeruginosa* para a produção dos biofilmes

Os inóculos foram preparados incubando uma a cinco colônias de *Pseudomonas aeruginosa* em caldo LB por 24 h a 37 °C, sob agitação de 150 RPM. As amostras foram então centrifugadas a 5500 RPM por 10 minutos em condições assépticas e o sedimento contendo as células bacterianas foi ressuscitado em 5 mL de meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16M ou de caldo LB, de acordo com o experimento a ser realizado. Verificou-se então a densidade da solução utilizando uma cubeta em espectrofotômetro (Epoch 2; BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) a 625nm para determinar a absorbância e realizar o ajuste do inóculo para uma absorbância entre 0,08 a 0,10, turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland e concentração de aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC/mL (CLSI, 2015).

4.10 Cinética da produção dos biofilmes monomicrobianos de *P. aeruginosa*

Para a produção dos biofilmes de *P. aeruginosa* uma alíquota de 100 µL da suspensão padronizada em caldo LB foi dispensada em uma microplaca de 96 poços de poliestireno e fundo chato. As microplacas foram incubadas a 37 °C em duas estratégias: sob agitação (150 RPM) e sem agitação, por 96 h (BAZZI et. al, 2013). A biomassa do biofilme foi quantificada a cada 24 horas pela coloração com cristal violeta (Ver tópico “Quantificação dos biofilmes”). Esse ensaio foi realizado em quadruplicata e repetido em dias diferentes.

4.11 Padronização dos biofilmes polimicrobianos de *Candida* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*

Os biofilmes mistos foram formados utilizando as seguintes estratégias:

(1) Incubou-se simultaneamente 50 µL da suspensão de *Candida* spp. (1×10^7 UFC/mL) com 50 µL da suspensão de *P. aeruginosa* (1×10^8 UFC/mL) em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16M.

(2) Incubou-se 100 µL da suspensão de *Candida* spp. (1×10^7 UFC/mL) em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16M por 24h a 150 RPM para a formação do biofilme maduro. Após o período de incubação, retirou-se o meio de cultura e sobre o biofilme maduro de *Candida* spp. colocou-se 100 µL da suspensão de *P. aeruginosa* (1×10^8 UFC/mL) em meio RPMI com MOPS 0,16M.

(3) Incubou-se 100 µL da suspensão de *P. aeruginosa* (1×10^8 UFC/mL) em meio LB por 24h a 150 RPM para a formação do biofilme maduro. Após o período de incubação, retirou-se o meio de cultura e sobre o biofilme maduro de *P. aeruginosa* colocou-se 100 µL da suspensão de *Candida* spp. (1×10^7 UFC/mL) em meio RPMI com MOPS 0,16M.

Em todas as estratégias, as microplacas foram incubadas por 96 h a 37 °C, sob agitação a 150 RPM e após cada período de 24 h de incubação o sobrenadante foi retirado e os biofilmes lavados com PBS para remoção das células não aderentes. Posteriormente foi realizada a quantificação dos biofilmes mistos pelo ensaio de coloração com cristal violeta (CV) e a viabilidade celular foi avaliada pelo método de contagem de viáveis (RODRIGUES et al, 2017) (Ver tópico “Quantificação dos biofilmes” e “Avaliação da viabilidade celular nos biofilmes mistos”). Os experimentos foram realizados em quadruplicata e repetidos três vezes, em dias diferentes.

4.12 Testes de suscetibilidade dos biofilmes mono e polimicrobianos de *Candida* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos

Os testes de suscetibilidade para células de biofilme foram realizados com os mesmos fármacos que foram usados para as células planctônicas: POL, CAS, MICA e AMB. As concentrações finais nos poços foram: AMB: 0,06 a 32µg/mL; CAS: 0,25 a 128µg/mL; MICA: 0,25 a 128µg/mL; POL: 0,01 a 8µg/mL. As concentrações testadas foram mais altas do que para os testes com células planctônicas pois sabe-se que células de biofilme podem apresentar valores de CIM até 1.000 vezes maiores do que células planctônicas (VAN ASTEN; PETERS, 2016).

Para a realização dos ensaios, os biofilmes mono e polimicrobianos foram previamente formados por 24 h a 150 RPM e, em seguida, o sobrenadante foi retirado, a fim de remover

células não aderidas. As placas foram então lavadas duas vezes com PBS estéril. Posteriormente, os antimicrobianos diluídos previamente em meio RPMI com MOPS 0,16 M em diferentes concentrações, foram adicionados aos poços contendo as células sésseis dos biofilmes, e as placas incubadas a 37°C, por 24h sob agitação a 150 RPM.

Após a incubação, o sobrenadante foi retirado para quantificar os biofilmes utilizando-se a metodologia do Cristal Violeta (Ver tópico “Quantificação dos biofilmes”) e determinar a Concentração Inibitória Mínima para células de biofilme (CIM-B). Os valores de CIM-B foram definidos como a concentração mínima do antimicrobiano capaz de reduzir a biomassa total do biofilme em 50% (CIM-B₅₀) e em 90% (CIM-B₉₀) em relação ao controle de biofilmes sem a exposição aos antimicrobianos.

4.13 Quantificação dos biofilmes

4.13.1 Avaliação da viabilidade celular nos biofilmes mistos: Após a formação do biofilme, o meio de cultura foi retirado e foram lavados com solução salina (100 µL por poço) para retirar a fração planctônica. Após, foram adicionados 200 µL de solução salina em cada poço e os biofilmes foram raspados utilizando uma ponta de pipeta de 200 µL e raspando cada poço durante 1 minuto na mesma rota e velocidade. As suspensões de células de biofilme resultantes foram então diluídas em série 1:10 em solução salina e plaqueadas em placas contendo meio de cultura seletivo utilizando o método de semeadura por espalhamento, para permitir a determinação nas unidades formadoras de colônia (UFC) de cada micro-organismo no biofilme. Foi utilizado ágar MacConkey para permitir a contagem de *P. aeruginosa* e Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) com 50 mg/L de cloranfenicol, para suprimir o crescimento de *P. aeruginosa* e permitir a contagem de *Candida* spp. As placas de ágar foram incubadas em aerobiose, a 37 ° C durante 24 h para contagem de células cultiváveis. Todas as placas com crescimento entre 30 e 300 colônias foram consideradas para a contagem. Os valores de células sésseis cultiváveis foram expressos como log₁₀ UFC/mL. O mesmo método foi utilizado para a avaliação da viabilidade celular nos biofilmes mistos após tratamento com os antimicrobianos.

4.13.2 Ensaio de coloração com Cristal Violeta (CV): A biomassa total dos biofilmes bacterianos, fúngicos e mistos foi quantificada utilizando o ensaio de coloração com cristal violeta (LUIZ et al., 2015). Após o período de incubação os biofilmes foram lavados com PBS e fixados com 100 µL de metanol por 15 minutos. Em seguida, o excesso de fixador foi

removido e as placas foram deixadas abertas para secar ao ar por 2 minutos. Posteriormente, 100 µL de uma solução 0,1% (v/v) de CV foram adicionados a cada poço. Após 15 minutos, o excesso de CV foi removido e as placas foram lavadas com água corrente destilada por 30 segundos e deixados novamente para secar durante 10 minutos. Por fim, a descoloração do CV do biofilme foi feita pela adição de 100 µL de ácido acético 33% (v/v). Então, alíquotas de 80 µL de cada poço foram transferidas para uma nova microplaca e a absorbância da fase aquosa foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda 590 nm. Todo o ensaio foi realizado a temperatura ambiente.

4.14 Classificação da capacidade de formação de biofilme

Os biofilmes monomicrobianos de *Candida* spp. e *P. aeruginosa* sem tratamento foram classificados de acordo com a biomassa total obtida após a coloração com cristal violeta (Tabela 3).

Tabela 3. Critérios para classificação dos isolados de *Candida* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* em baixa, intermediária e alta formação de biofilmes.

	Baixa formação	Formação intermediária	Alta formação
Valores de Densidade ótica a 590 nm			
<i>Candida</i> spp. ^a	< 2	≥ 2 e < 3	≥ 3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^b	< 0,6	≥ 0,6 e ≤ 0,9	≥ 1

^a Critério proposto por Marcos-Zambrano (2014); ^b Critério proposto por Quatrin (2016)

4.15 Análise estatística

Para avaliar as diferenças na formação dos diferentes biofilmes e na suscetibilidade aos antifúngicos foram realizadas análises estatísticas pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey (Tukey's Multiple Comparison Test) para avaliar a formação dos biofilmes ou teste de Dunnett (Dunnett's Multiple Comparison) para avaliar o tratamento dos biofilmes. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Suscetibilidade das células planctônicas de *Candida* spp. aos antifúngicos

Foi definida a CIM-P de todas as cepas de *Candida* spp. utilizadas nesse estudo para Anfotericina B, Caspofungina e Micafungina, antifúngicos recomendados no tratamento de candidemia relacionada a biofilmes. Também avaliou-se a suscetibilidade das cepas para o antibiótico Polimixina B (Tabela 3). As células planctônicas de *Candida* spp. foram avaliadas quanto à suscetibilidade aos antimicrobianos por meio da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o padronizado pelo CLSI (2008) e interpretados de acordo com os valores de “breakpoints” estabelecidos pelo documento M27-S4 (CLSI, 2012). Os valores de CIM-P obtidos para Anfotericina B variaram de 0,06 a 0,25 µg/mL para as cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Já a cepa *C. tropicalis* ATCC 200956 apresentou CIM-P de 2 µg/mL, sendo considerada resistente a esse antifúngico.

Para a Caspofungina, os valores de CIM-P ficaram na faixa de 0,12 a 0,5 µg/mL para todas as cepas testadas e a Micafungina apresentou atividade similar à Caspofungina, com valores de CIM-P entre 0,03 e 1,0 µg/mL. A atividade fungicida foi observada para a Anfotericina B, bem como para as equinocandinas, em todas as cepas (Tabela 3).

Em relação à Polimixina B, esse antibacteriano demonstrou ação fungistática para os isolados *C. albicans* ATCC 10231 e *C. tropicalis* ATCC 200956 nas maiores concentrações, com valor de CIM-P de 2 µg/mL para ambas; enquanto para os outros isolados a POL não apresentou efeito antifúngico nas concentrações testadas (Tabela 4). Não há diretrizes interpretativas disponíveis para testes de suscetibilidade de espécies de *Candida* spp. à Polimixina.

Tabela 4. Valores de Concentração inibitória mínima (CIM-P) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos antimicrobianos sobre cepas de *Candida* spp. na forma planctônica.

Cepas Testadas	Concentração (µg/mL)							
	CAS		MICA		AMB		POL	
	CIM-P	CFM	CIM-P	CFM	CIM-P	CFM	CIM-P	CFM
<i>C. albicans</i> SC5314	0,25	0,25	0,12	0,12	0,06	0,12	> 8	> 8
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,25	0,25	0,06	0,06	0,06	0,06	2	> 8
<i>C. albicans</i> IAL-40	0,12	0,25	0,03	0,12	0,25	0,25	> 8	> 8
<i>C. tropicalis</i> ATCC 200956	0,5 ^I	1	0,12	0,25	2 ^R	2	2	> 8
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,5	1	0,5	2	0,06	0,25	>8	> 8
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	0,5	2	1 ^R	2	0,25	0,25	>8	> 8

Nota: CIM, concentração inibitória mínima; CFM, concentração fungicida mínima; CBM, concentração bactericida mínima. Antimicrobianos – CAS, Caspofungina; MICA, Micafungina; AMB, Anfotericina B; POL, Polimixina; R, resistente; I, intermediário.

Observando os valores de CIM apresentados é possível constatar que as equinocandinas (Micafungina e Caspofungina) tiveram boa efetividade para todas as cepas de *Candida*, em especial para os isolados da espécie *C. albicans*. A Anfotericina também apresentou baixos valores de CIM para as cepas testadas, com exceção de *C. tropicalis*, que foi considerada resistente a esse antifúngico.

Na prática clínica, a administração de Anfotericina B deve ser realizada com cautela, devido ao alto risco de toxicidade. A Micafungina e a Caspofungina são fármacos pertencentes à classe das equinocandinas, uma classe de antifúngicos que atua inibindo a síntese da (1,3)- β -D-glucana, um polissacarídeo presente na parede celular fúngica. Esses anti-fúngicos têm demonstrado serem boas opções terapêuticas para infecções fúngicas invasivas, como as candidemias e infecções relacionadas à biofilmes e também em infecções causadas por espécies resistentes ao fluconazol. Todos os três agentes da classe das equinocandinas são aprovados para o tratamento da candidíase esofágica, candidemia e outras formas de candidíase invasiva. Somente a Micafungina é licenciada para profilaxia antifúngica no transplante de células tronco, enquanto que a caspofungina é aprovada para terapia empírica da neutropenia febril (DE OLIVEIRA DEMITTO et al., 2012).

Um estudo randomizado, duplo-cego, que avaliou a eficácia, segurança e tolerabilidade da caspofungina, em comparação com a Anfotericina B como terapia para

candidíase orofaríngea em pacientes portadores do HIV relevou que uma proporção maior de pacientes em cada um dos grupos tratados com caspofungina (74 a 91%) apresentou respostas favoráveis em comparação com que receberam doses de Anfotericina B. Os autores concluíram que caspofungina forneceu uma opção terapêutica parenteral geralmente bem tolerada para pacientes infectados pelo HIV com candidíase orofaríngea (ARATHOON et al., 2002)

Em um estudo realizado na Austrália, que comparou a atividade das equinocandinas, os pesquisadores obtiveram CIM90 de 0,06 para *Candida albicans* utilizando a caspofungina (SHARON et al., 2011). Em outro estudo, realizado no Brasil por Freitas, Martinez e Gironi (2011), que avaliou a suscetibilidade de isolados clínicos de *Candida* spp. provenientes de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) às equinocandinas Anidulafungina e Caspofungina, houve uma variação de 0,25 µg/ml a > 4,0 µg/mL para a Caspofungina, que apresentou valores de CIM mais elevados do que os da Anidulafungina. Em estudo multicêntrico que avaliou a suscetibilidade de *C. albicans* para Anidulafungina e Micafungina realizando o Método de Microdiluição de Caldo preconizado pelo documento CLSI M27-A3 a CIM da Micafungina foi de 0,03 g/mL para *C. albicans* (PFALLER et al., 2014)

Em relação às taxas de resistência aos antifúngicos, estudo multicêntrico realizado na Romênia mostrou que 47 isolados (8,4%) eram resistentes a pelo menos uma equinocandina, mais frequentemente anidulafungina. As espécies que apresentaram maior tolerância foram *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Havia 17 isolados (3%) resistentes às equinocandinas e ao fluconazol e estes também pertenciam às mesmas três espécies (MARES et al., 2017). Outro estudo multicêntrico, realizado entre 2005 e 2013, que incluiu hospitais da Nova Zelândia, Austrália e Estados Unidos que executavam rotineiramente teste de suscetibilidade de todos os isolados de infecção de corrente sanguínea frente às equinocandinas, foi observada a resistência a pelo menos uma das equinocandinas em 1,4% dos isolados de *C. albicans* (ESCHENAUER et al., 2014). A resistência ao fluconazol foi observada em 12,7% dos isolados de *Candida* spp., incluindo isolados de *C. glabrata* no estudo multicêntrico realizado no Peru entre 2013 e 2015 (RODRIGUEZ et al., 2017).

Considerando, portanto, os estudos prévios que utilizaram a técnica de microdiluição em caldo para avaliar a suscetibilidade das equinocandinas, os resultados de CIM obtidos nesse estudo são coerentes com os disponíveis na literatura. As diferenças observadas na literatura entre as taxas de resistência aos antifúngicos dos isolados de diferentes países

mostram a necessidade de vigilância contínua para acompanhar as tendências da distribuição de patógenos e suscetibilidade aos antifúngicos em cada local (ZEPELIN et al., 2007).

As Polimixinas são antibióticos polipeptídeos com potente ação sobre diversas bactérias Gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa* (MENDES et al, 2009). Esse fármaco geralmente causa ruptura da membrana citoplasmática das bactérias, mas também pode inibir processos intracelulares, como a síntese de proteínas. As propriedades antifúngicas da POL para *C. albicans* já foram descritas previamente (OGITA et al., 2007; OGITA; FUJITA; TANAKA, 2009; ZHAI et al., 2010; RODRIGUES et al., 2017) mas o potencial dessa droga como agente antifúngico sozinho geralmente requer altas doses de ataque para inibir as infecções, o que é condizente com os altos valores de CIM encontrados no presente estudo.

A baixa eficiência de POL para as cepas de *Candida* spp. neste estudo pode ser parcialmente explicada pela presença de esteróis na membrana eucariótica, uma vez que foi previamente demonstrado (OGITA; FUJITA; TANAKA, 2009) que os esteróis reduzem a inserção de peptídeos catiônicos nas membranas celulares fúngicas e conseqüentemente reduzem a capacidade de ação da POL para esses micro-organismos.

Por outro lado, a terapia combinada de POL com outros agentes antifúngicos provavelmente terá um importante impacto em terapias antifúngicas mais eficazes, visto que estudos anteriores descreveram que essa droga apresenta interações sinérgicas com os antifúngicos azólicos, como o fluconazol, podendo ter efeito fungicida contra *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* e, também, espécies de *Candida* não-*albicans*, quando utilizada em associação ao fluconazol (SCHWARTZ et al., 1972; ZHAI et al., 2010). A polimixina B também apresentou efeito sinérgico quando combinada com a Anfotericina B, no estudo de Moneib (1995). A combinação da AMB com POL também mostrou-se eficaz contra *Fusarium* spp. no estudo de Venturini et al. (2016) que avaliou a suscetibilidade *in vitro* de 25 isolados clínicos de *Fusarium* spp. contra antifúngicos (anfotericina B, caspofungina, itraconazol e voriconazol) e antimicrobianos (pentamidina, polimixina B, tigeciclina e tobramicina) utilizando o método de microdiluição em caldo. Nesse estudo, a POL apresentou valores de CIM ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ contra *Fusarium* spp. e apresentou alta taxa de sinergismo (76%) quando foi combinado com AMB resistência ao fluconazol em infecções invasivas por *Candida* é agora considerada uma ameaça grave à saúde em todo o mundo. Tem ocorrido também um aumento nas taxas de resistência às equinocandinas entre as espécies de *Candida*, principalmente em *C. glabrata*. Buscando propor novas alternativas terapêuticas, um estudo realizado por ZEIDLER et al., 2013 encontrou sinergismo *in vitro* entre Caspofungina e Colistina (polimixina E). Os autores propuseram que as alterações da parede

celular mediadas pela caspofungina podem permitir a Colistina o rápido acesso à membrana celular do fungo e conseqüentemente a produção dos seus efeitos, o que por sua vez aumenta a atividade da caspofungina.

Em conseqüente, outro estudo avaliou se ocorria efeito sinérgico na combinação de Caspofungina e Polimixina B para isolados clínicos de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol (ADAMS; ASHCRAFT; PANKEY, 2016). Os testes demonstraram sinergia para quatro dos sete isolados testados e apenas uma amostra demonstrou adversidade. Os outros dois isolados eram resistentes à caspofungina e mostraram resultados indiferentes à combinação de drogas, quando comparados a monoterapia. Os autores concluíram que a suscetibilidade à caspofungina pode ser necessária para o sinergismo entre a caspofungina e a polimixina B, porém ainda não há estudos “in vivo” que possam correlacionar com os resultados observados.

5.2 Suscetibilidade das células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos

Nesse trabalho sete cepas de *P. aeruginosa* foram avaliadas quanto a suscetibilidade das células planctônicas aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão em ágar e interpretados de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2015) (Tabela 4). Das sete cepas de *P. aeruginosa* testadas, três (151, 141 e 48-1997A) apresentaram resistência a diversos antibacterianos comumente utilizados no tratamento de infecções causadas por essa bactéria, configurando o perfil de micro-organismos multirresistentes aos antibacterianos (MDR) descrito por Magiorakos et al. (2012), ou seja, os isolados são resistentes a ≥ 1 agente antimicrobiano de 3 ou mais categorias de antibacterianos. As cepas ATCC 27853, ATCC 15442 e PA01 foram sensíveis a todos os antibacterianos testados. A cepa 564-FC mostrou-se sensível a maioria dos antibacterianos, exceto Amicacina e Ciprofloxacino.

Tabela 5. Perfil de suscetibilidade das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aos antibióticos de uso clínico.

Cepas	AMI	GEN	ATM	CPM	CAZ	CIP	IPM	MER	PTT	POL
141	R	R	I	R	R	R	R	R	I	S
151	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
48-1997A	R	R	S	R	R	R	R	R	I	S
564-FC	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
ATCC 15442	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ATCC 27853	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PAO1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Nota: Classes dos antimicrobianos – A, aminoglicosídeos; B, monobactâmicos; C, cefalosporinas de terceira e quarta gerações (cefepemas); D, fluoroquinolonas; E, carbapenêmicos; F, Combinação de inibidores β -LACTAMICO/ β -LACTAMASE; G, Lipopeptídicos. Antimicrobianos - AMI, amicacina; ATM, aztreonam; CPM, cefepime; CAZ, ceftazidima; CIP, ciprofloxacino; GEN, gentamicina; IPM, imipenem; MER, meropenem; POL, polimixina B; PTT, piperaciclina – tazobactam. Critério de interpretação – R, Resistente; I, Intermediário; S, Sensível.

O contínuo aumento da resistência aos antibióticos é um problema mundial. Diante desse cenário, antibióticos que tiveram seu uso abdicado no passado têm sido novamente utilizados para o tratamento de pacientes com infecção hospitalar por bactérias multirresistentes, tais como a Polimixina B e a Colistina (KAYE et al., 2017; BALSALOBRE et al., 2014). A produção de enzimas capazes de inativar os antibióticos, como as β -lactamases, é um dos principais mecanismos de resistência encontrados em *P. aeruginosa*. Existem diferentes tipos de enzimas β -lactamases entre elas as carbapenemases, que conseguem hidrolisar diferentes tipos de antibióticos, como cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Várias enzimas representantes das carbapenemases têm sido descritas, como as pertencentes às classes moleculares A e D de Ambler. Entre as representantes da classe D encontramos principalmente as enzimas do tipo OXA e as da classe B são também denominadas Metallo- β -Lactamases (M β L) e entre as principais podemos citar a VIM (Verona Imipenemase), SPM-1 (São Paulo Metallo- β -lactamase), GIM (Imipenemase alemã), SIM (Seul Imipenemase) e AIM (Australian imipenemase) (BUSH, 2013; MURPHY et al, 2003; MENDES et al., 2017).

As M β LS hidrolisam todos os betalactâmicos comercialmente disponíveis, com exceção do Aztreonam, antibiótico pertencente à classe dos monobactâmicos. Essas enzimas caracterizam-se por necessitarem de dois íons divalentes, usualmente zinco, como cofator para atividade catalítica, por terem a mesma estrutura tridimensional e por apresentarem resíduos conservados, os quais são responsáveis pela interação da enzima com cátions

divalentes (BUSH, 1995). Além disso, a ação dessas enzimas não é impedida pelos inibidores de serino-betalactamases disponíveis comercialmente, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (MURPHY et al, 2003; MENDES et al., 2017).

As cepas 141, 151 e 48-1997A, utilizadas nesse estudo, apresentam o mecanismo de resistência caracterizado pela produção de Metalo- β -Lactamases (M β LS) como descrito previamente (PICÃO, 2009; LINCOPAN; TRABULSI, 2008). Este é considerado o principal mecanismo responsável pelos elevados níveis de resistência de *P. aeruginosa* aos carbapenêmicos no Brasil (NEVES, et al., 2011). A expressão das M β LS é associada a elementos genéticos móveis incluindo integrons, transposons e plasmídeos (WALSH et al., 2005).

No estudo de Sader et al. (2005) observou-se que, entre os isolados de *P. aeruginosa* produtores de M β L, 43,9% eram resistentes ao Imipenem (IPM) e 55,6% desses apresentavam a M β L "São Paulo Metallo- β -lactamase" (SPM-1). No estudo de Franco et al., (2010) 30,4% dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem foram M β L positivos, sendo 81% do genótipo SPM-1. Isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao IPM representam uma grande preocupação na clínica médica, especialmente nos ambientes hospitalares, devido às opções terapêuticas limitadas para o tratamento de infecções relacionadas a esse patógeno. As enzimas MBLs podem desempenhar um papel crítico na resistência ao IPM e prevalência de *P. aeruginosa* produtoras de M β LS têm aumentado significativamente nos últimos anos, variando de 12 a 44% dos isolados resistentes analisados em estudos brasileiros (SADER et al., 2005; MARRA et al., 2011; FRANCO et al., 2010; COSTA et al., 2015).

No presente estudo, as três cepas de *P. aeruginosa* resistentes ao IPM são SPM-1. A SPM-1 é uma das subclasses de M β L adquirida e foi identificada na amostra de *P. aeruginosa* 48-1997A, recuperada do trato urinário de um paciente hospitalizado no complexo Hospital São Paulo, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) (GALES et al, 2003; MENDES et al., 2006). Essa amostra bacteriana foi enviada ao programa *Antimicrobial Surveillance Program* (SENTRY), que, em parceria com o laboratório *Bristol Centre for Antimicrobial Research and Evaluation* (BCARE) caracterizou esse novo determinante de resistência. A produção de metalo- β -lactamases de São Paulo (SPM-1) é o mecanismo mais comum de resistência a carbapenens detectado entre os isolados clínicos de *P. aeruginosa* multirresistentes no Brasil. A disseminação de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 foi restrita aos ambientes nosocomiais durante muitos anos, com relatos esporádicos de isolados ambientais devido à contaminação por esgoto hospitalar. Entretanto um estudo recente (MARTINS et al., 2018) detectou e caracterizou *P. aeruginosa* produtora de SPM-1

recuperada da microbiota de aves migratórias no Brasil. O gene que codifica SPM-1 parece estar especificamente relacionado à espécie *P. aeruginosa*, pois o mesmo não foi descrito até o momento em outras espécies bacterianas (GALES et al, 2003; MENDES et al., 2006; RÍOS et al., 2018).

A resistência aos β -lactâmicos ocorre por mecanismos variados: produção da β -lactamase AmpC, β -lactamases de espectro estendido, carbapenemases, diminuição da permeabilidade celular e mecanismo de efluxo estão entre os descritos. A perda da permeabilidade e o mecanismo ativo de efluxo podem afetar a atividade de outros tipos de fármacos como aminoglicosídeos e quinolonas. Esta pode ser complementada com alterações na DNA girase. Muitas publicações têm mencionado um aumento importante na frequência e na resistência da *P. aeruginosa* aos antimicrobianos. Atualmente essa bactéria é o mais comum bacilo Gram-negativo multirresistente a drogas (MDR) causador de pneumonia em pacientes hospitalizados (CHEN et al, 1995; FLOURNOY, 2000; PAVIANI; STADNIK; HEINEK, 2004; EL SOLH; ALHAJHUSAIN, 2009).

No presente estudo as cepas IPM resistentes apresentaram fenótipo de multirresistência aos antimicrobianos e a polimixina B foi o único fármaco para o qual essas três cepas (141,151 e 48-1997A) foram sensíveis. O Aztreonam também foi ativo para algumas das cepas multirresistentes, apresentando perfil de sensibilidade (S) para a cepa 48-1997A e intermediário (I) para a cepa 141.

No estudo de Franco et al., (2010) 85,7% dos isolados produtores de M β L eram suscetíveis ao Aztreonam. Os autores sugeriram, portanto, uma possível associação com outros mecanismos de resistência semelhantes às enzimas M β L nas cepas resistentes ao Azteonam.

5.3 Determinação da CIM dos antimicrobianos frente às células planctônicas de *P. aeruginosa*

As células planctônicas das sete cepas bacterianas também foram analisadas pelo método de microdiluição em caldo para confirmar os resultados de suscetibilidade dos isolados à Polimixina B obtidos no teste de disco-difusão, conforme é preconizado pelo CLSI (2015). Além disso, as cepas foram avaliadas quanto à suscetibilidade ao antifúngico poliênicos Anfotericina B e dois antifúngicos da classe das equinocandinas: Caspofungina e Micafungina (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de Concentração inibitória mínima (CIM-P) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos antimicrobianos sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* na forma planctônica.

Cepas	Concentração (µg/mL)											
	CAS			MICA			AMB			POL		
	CI ₅₀	CI ₉₀	CBM	CI ₅₀	CI ₉₀	CBM	CI ₅₀	CI ₉₀	CBM	CI ₅₀	CI ₉₀	CBM
141	128	128	>128	>128	>128	>128	>32	>32	>32	0,5	0,5	0,5
151	128	>128	>128	128	>128	>128	>32	>32	>32	0,5	0,5	0,5
48-1997A	64	128	>128	128	>128	>128	>32	>32	>32	0,5	0,5	0,5
564-FC	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>32	>32	>32	0,5	0,5	0,5
ATCC 15442	64	>128	>128	>128	>128	>128	>32	>32	>32	0,5	0,5	0,5
ATCC 27853	64	>128	>128	>128	>128	>128	>32	>32	>32	0,5	0,5	0,5
PAO1	64	>128	>128	>128	>128	>128	>32	>32	>32	0,5	0,5	0,5

Nota: CI₅₀, menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento microbiano; CI₉₀, menor concentração capaz de inibir 90% do crescimento microbiano; CBM, concentração bactericida mínima. Antimicrobianos – CAS, Caspofungina; MICA, Micafungina; AMB, Anfotericina B; POL, Polimixina B.

Os resultados obtidos demonstram que, entre os antifúngicos testados, a Caspofungina apresentou ação bacteriostática para 5 das 7 cepas de *P. aeruginosa* e valores de CI₅₀/CI₉₀ entre 64 e 128 µg/mL. Esse fármaco mostrou-se ativo inclusive para os três isolados MDR (141, 151 e 48-1997A). O antifúngico Micafungina apresentou ação para apenas duas das cepas testadas, com valor de CI₅₀ de 128 µg/mL para ambas (151 e 48-1997A). A concentração bactericida mínima para os antifúngicos também não pôde ser determinada pelo subcultivo realizado (houve crescimento em todas as concentrações testadas). Os valores de CI₅₀/CI₉₀ para a Polimixina B mostraram-se de acordo com o critério de avaliação do CLSI (2015) e todas as cepas foram suscetíveis.

Conforme o esperado, a Anfotericina B não foi eficaz em inibir o crescimento de nenhuma das cepas mesmo na maior concentração testada (32 µg/mL). A AMB é um antifúngico poliênico amplamente utilizado para o tratamento de infecções invasivas por *Candida* spp. e exerce atividade fungicida induzindo a formação de poros na membrana celular do fungo devido à interação com o ergosterol ligado à membrana e subsequente perda de conteúdo

citoplasmático e de viabilidade celular (KHAN et al., 2013). As bactérias, entretanto, não são afetadas por esse fármaco, pois suas membranas celulares não contêm esteróis (BROGDEN, 2005; RODRIGUES et al., 2017).

5.4 Cinética da formação os biofilmes monomicrobianos de *Candida spp.* e *P. aeruginosa* em diferentes estratégias de incubação

Para estabelecer a melhor estratégia de incubação que permitisse a formação de um biofilme bacteriano ou fúngico foi realizado o ensaio de cinética da formação de biofilme das cepas *C. albicans* SC5314 e *P. aeruginosa* PAO1. A maturação do biofilme foi acompanhada por 96 h, com leitura a cada 24h. As placas foram incubadas com e sem agitação e a quantificação dos biofilmes foi realizada pelo ensaio do cristal violeta (Figura 9).

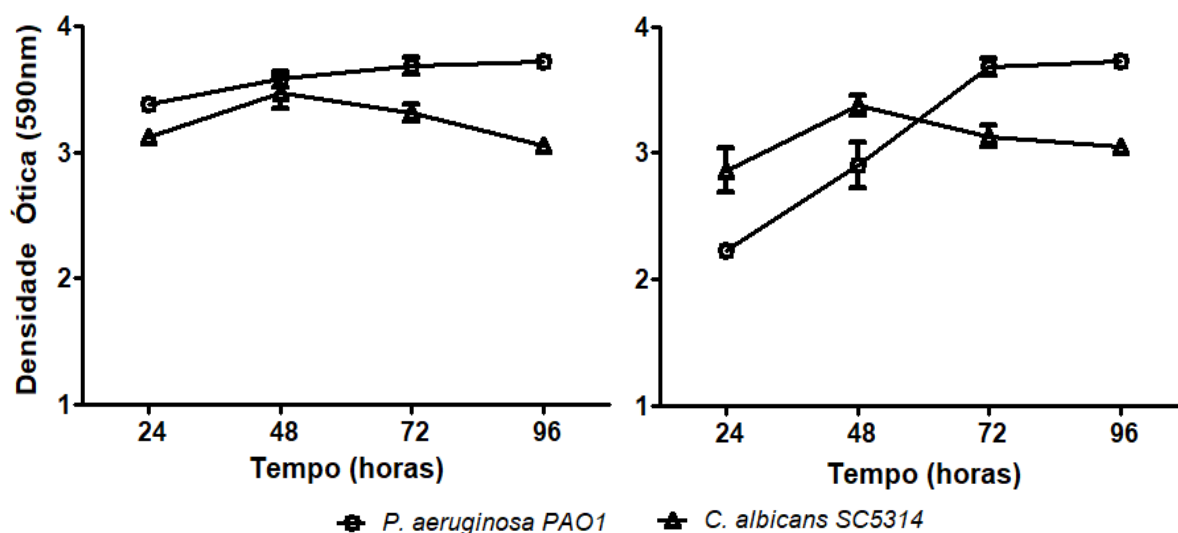


Figura 9. Cinética da formação dos biofilmes monomicrobianos de *C. albicans* SC5314 e *P. aeruginosa* PAO1 sob agitação orbital a 150 RPM (A) e sem agitação (B) a 37 °C por 96 horas de incubação.

Neste experimento, biofilmes de *P. aeruginosa* atingem o pico máximo em 24h (sob agitação) e 48 h (sem agitação) com biomassa constante até 96h. Para *C. albicans* nas duas condições o pico máximo de formação ocorre em 48 h de incubação com declínio nas próximas horas. Através da análise dos resultados obtidos foi constatado que placas deixadas sob agitação permitiram a formação de um biofilme robusto em menor tempo (24 h) do que as placas deixadas sem agitação. Os biofilmes formados sob agitação mostraram-se também mais estáveis ao longo das 96 h. Dessa forma, determinou-se que os biofilmes seriam incubados sob agitação a 150 RPM.

5.5 Cinética da formação os biofilmes monomicrobianos de *Candida* spp. e *P. aeruginosa* sob agitação

Após definir as condições de incubação, foi realizada a cinética da formação dos biofilmes monomicrobianos, sob agitação, de todas as cepas de *P. aeruginosa* e *Candida* spp. utilizadas nos experimentos desse estudo, para definir as melhores cepas formadoras de biofilme bacteriano ou fúngico (Figuras 10 e 11). A maturação do biofilme foi acompanhada por 96 h, com leitura a cada 24h. As placas foram incubadas em agitação de 150 RPM e a quantificação dos biofilmes foi realizada pelo ensaio do cristal violeta.

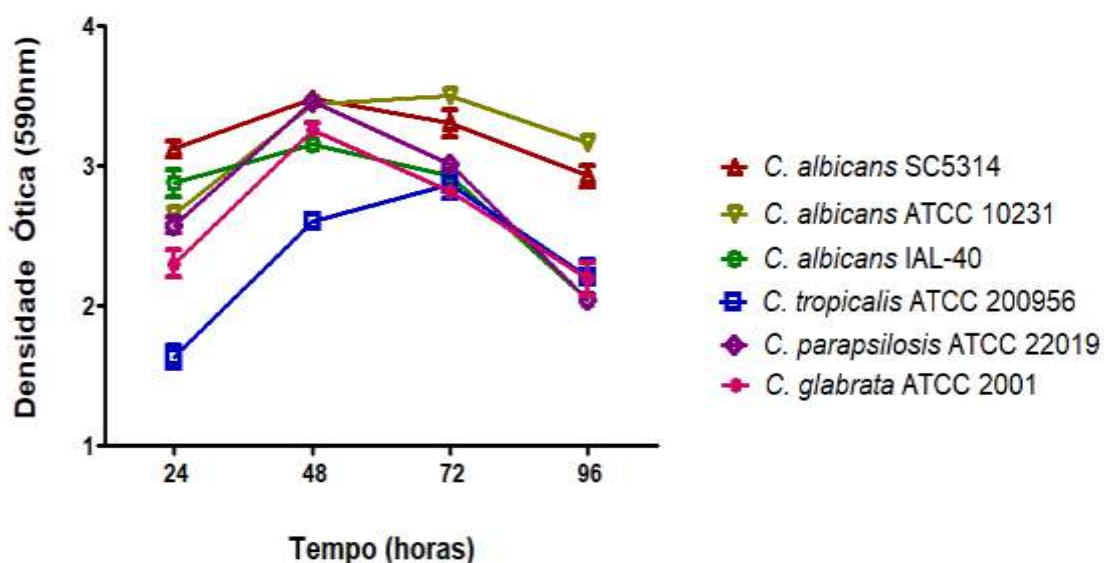


Figura 10. Cinética da formação dos biofilmes monomicrobianos das seis cepas de *Candida* spp. em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16M sob agitação orbital a 150 RPM a 37 °C por 96 h de incubação.

Após a análise dos resultados obtidos, constatou-se que as cepas de *C. albicans* foram as que melhor formaram biofilme em 24 h com valores de densidade ótica (OD) ≥ 3 . A cepa de *C. tropicalis* foi a que menos formou biofilme nessas primeiras 24 h, mas teve aumento da biomassa nos tempos seguintes, chegando ao pico de robustez no tempo de 72 h. As cepas de *C. parapsilosis* e *C. glabrata* formaram biofilmes intermediários (Figura 10).

Observa-se que o comportamento dos biofilmes de todas as cepas de *Candida* spp. pelo período de incubação total (96 h) foi bastante semelhante, com aumento da biomassa nas primeiras 48 h e redução da biomassa nas 48h seguintes, exceto para o isolado *C. albicans* IAL-40, que manteve a sua biomassa constante até às 72 h, com diminuição acentuada nas últimas 24 h.

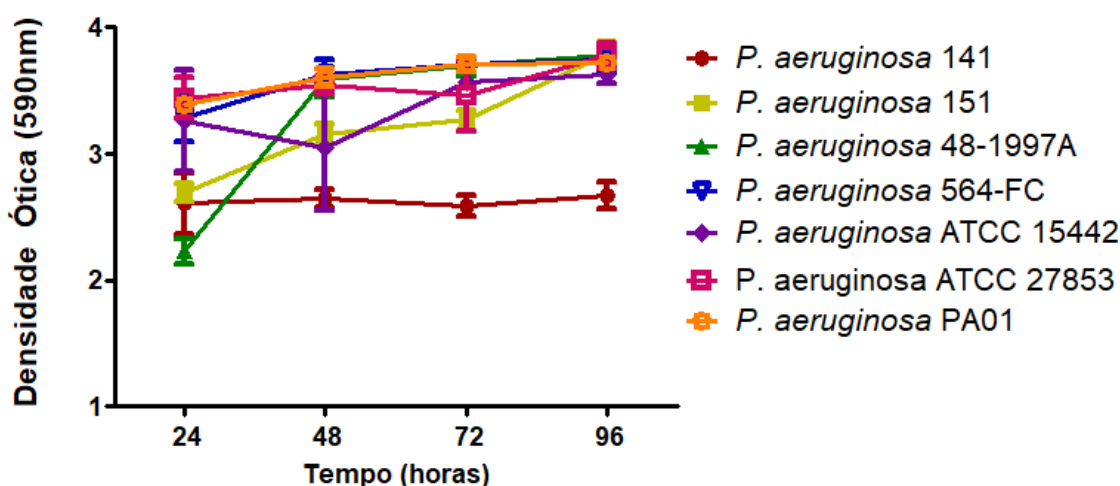


Figura 11. Cinética da formação dos biofilmes monomicrobianos das sete cepas de *P. aeruginosa* em caldo Luria Bertani sob agitação orbital a 150 RPM a 37 °C por 96 h de incubação.

Em relação às cepas bacterianas, avaliando a formação do biofilme no tempo e 24 h (Figura 11) observa-se que as cepas *P. aeruginosa* PA01, ATCC 27853, ATCC 15442 e 564-FC foram as que formaram um biofilme mais robusto ($OD > 3$), com diferença estatisticamente significativa nos valores de biomassa total ($P < 0.005$) quando comparadas com as cepas MDR 141, 151 e 48199A com o mesmo tempo de formação; e portanto, classificadas como cepas com alta capacidade de formação de biofilme.

É interessante ressaltar que as cepas ATCC 27853 e PA01, duas das que melhor formaram biofilme, também foram as que demonstraram maior sensibilidade aos antimicrobianos nos ensaios de suscetibilidade realizados. De acordo com a literatura, cepas de *P. aeruginosa* que exibem o fenótipo mucoide têm maior capacidade de produção do exopolissacarídeo alginato, uma camada espessa de mucopolissacarídeo (CAÇADOR, 2016). Isolados mucoides demonstram grande heterogeneidade fenotípica em comparação aos isolados não-mucoides, incluindo morfologia da colônia, resistência aos antibióticos e capacidade de formação de um biofilme mais robusto (PELEG et al., 2010). Clinicamente, a presença do fenótipo mucoide em pacientes portadores de fibrose cística está associada a um pior prognóstico, devido à deterioração progressiva da função pulmonar (CANTON; DEL CAMPO, 2010; CAÇADOR, 2016).

Ainda no tempo de 24h, as cepas 141 e 151 apresentaram capacidade intermediária de formação de biofilme, com valores de OD variando entre 2,4 a 2,6. Por fim, a cepa 48-1997A formou um biofilme menos robusto, com valores de OD não ultrapassando 2.2. Porém, no tempo de 48 h o biofilme da cepa 48-1997A demonstrou crescimento, atingindo o seu pico

máximo de formação e alcançando os valores de biomassa das cepas PAO1, ATCC 27853, ATCC 15442 e 564-FC. Portanto, a cepa 48-1997A parece ter uma boa capacidade de formar biofilmes, porém precisa de mais tempo para atingir maior biomassa.

A cepa 151 aumentou gradativamente a sua biomassa nos tempos de 48,72 e 96 h, chegando na máxima formação em 96 h. A cepa 141 foi a que apresentou menores valores de biomassa total ao longo das 96 h de incubação, mas o biofilme se manteve estável durante todo o período.

Diante dos resultados obtidos na cinética de formação dos biofilmes monomicrobianos e no perfil de sensibilidade dos isolados bacterianos e fúngicos aos fármacos testados foram selecionados os isolados que apresentavam diferentes perfis de produção de biofilme no tempo de 24 h (alta, intermediária e baixa) e diferentes perfis de sensibilidade aos fármacos (sensível e resistente) para a realização dos ensaios de formação de biofilmes polimicrobianos. Dessa forma, foram escolhidas quatro cepas de *Candida* spp. (*C. albicans* SC5314, *C. tropicalis* ATCC 200956, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. glabrata* ATCC 2001) e três cepas de *P. aeruginosa* (PAO1, 151 e 48-1997A) para a realização dos ensaios de formação de biofilmes polimicrobianos.

5.6 Cinética da formação os biofilmes polimicrobianos de *Candida* spp. e *P. aeruginosa* sob agitação

Após a padronização dos monomicrobianos, escolha das cepas e definição das melhores condições para o estudo, foi realizada a cinética da formação dos biofilmes polimicrobianos dos isolados *C. albicans* SC5314 e *P. aeruginosa* PAO1 em três diferentes estratégias para definir qual seria utilizada para formar biofilmes polimicrobianos. Tanto a biomassa total do biofilme bem como a quantificação de células bacterianas e fúngicas foram realizadas.

O biofilme polimicrobiano de *C. albicans* SC5314 e *P. aeruginosa* PAO1 formado na estratégia 1, na qual incubou-se ao mesmo tempo 50 µL da suspensão de *C. albicans* com 50 µL da suspensão de *P. aeruginosa* (Figura 12A e B) apresentou-se robusto em 24 h de incubação e permaneceu com biomassa estável até 96 h. Comportamento similar foi observado para o biofilme monomicrobiano de *C. albicans*; em contraste, o biofilme monomicrobiano de *P. aeruginosa*, nas mesmas condições de cultivo, foi o que apresentou a menor biomassa em 96 h de incubação. No ensaio de viabilidade celular o comportamento dos biofilmes monomicrobianos foi muito semelhante; ambas apresentaram número constante de

células durante as 96h (1×10^5 a 1×10^7 UFC/mL para *C. albicans* 1×10^6 a 1×10^{10} , para *P. aeruginosa*). Porém, em biofilme misto, *C. albicans* SC5314 apresentou aumento de células viáveis nas primeiras 48h (1×10^8 UFC/mL) e um decaimento abrupto a partir das 72h, chegando a números indetectáveis no tempo de 96 h, enquanto que *P. aeruginosa* mostrou contagem superior de células (1×10^{10} a 1×10^{11} UFC/mL) em biofilme misto, quando comparado ao controle monomicrobiano ao longo das 96h.

Na estratégia 2, na qual sobre o biofilme maduro de *C. albicans* em meio RPMI colocou-se 100 μ L da suspensão de *P. aeruginosa* para formação do biofilme misto, a biomassa também apresentou-se robusto em 24 h de incubação e manteve-se constante até 96 h, com um discreto declínio nas últimas 24 h e valores de densidade ótica variando de 3.5 (pico observado em 48hs) a 2.7 (média observada no período de 96h) (Figura 12C). Em relação à viabilidade celular, em biofilme misto, *C. albicans* e *P. aeruginosa* apresentaram maior número de células viáveis nas primeiras 24 h, quando comparado com os biofilmes monomicrobianos. A partir das 48 h, as células de ambos os micro-organismos apresentam contagem de células bastante semelhante aos respectivos controles monomicrobianos, mantendo-se viáveis até as 96h de incubação (Figura 12D).

Na estratégia 3 (Figuras 12 E e F), na qual o biofilme misto foi formado colocando-se, sobre o biofilme maduro de *P. aeruginosa*, o inóculo de *C. albicans*, o biofilme misto mostrou-se denso e bastante estável formou-se nas primeiras 24 h após a mistura das cepas e manteve-se com a mesma biomassa durante todo o período de incubação, com valores de absorvância em torno de 3.4 (Figure 12 E). O comportamento do biofilme monomicrobiano de *C. albicans* apresentou o mesmo comportamento do misto, entretanto, a biomassa do biofilme monomicrobiano de *P. aeruginosa* decaiu após a incubação (Figure 12 E). Este fato se deve provavelmente pela incubação do biofilme de 24 h formado em caldo LB e posterior incubação em meio RPMI até 96 h. Ao fazer a análise da viabilidade celular, os micro-organismos pareceram se comportar de forma muito semelhante à observada na estratégia 2, ambas mantendo-se viáveis e com contagem de células constante até as 96 h de incubação (Figure 12 F).

Observa-se, portanto, que em todas as estratégias foi possível formar um biofilme misto com biomassa robusta entre *C. albicans* e *P. aeruginosa*. No estudo da cinética da formação dos biofilmes mistos, as estratégias 2 e 3 parecem formar biofilmes estáveis quando comparados com a estratégia 1. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos valores de biomassa total ou no número de células viáveis entre as estratégias 2 e 3 ($P > 0.05$).

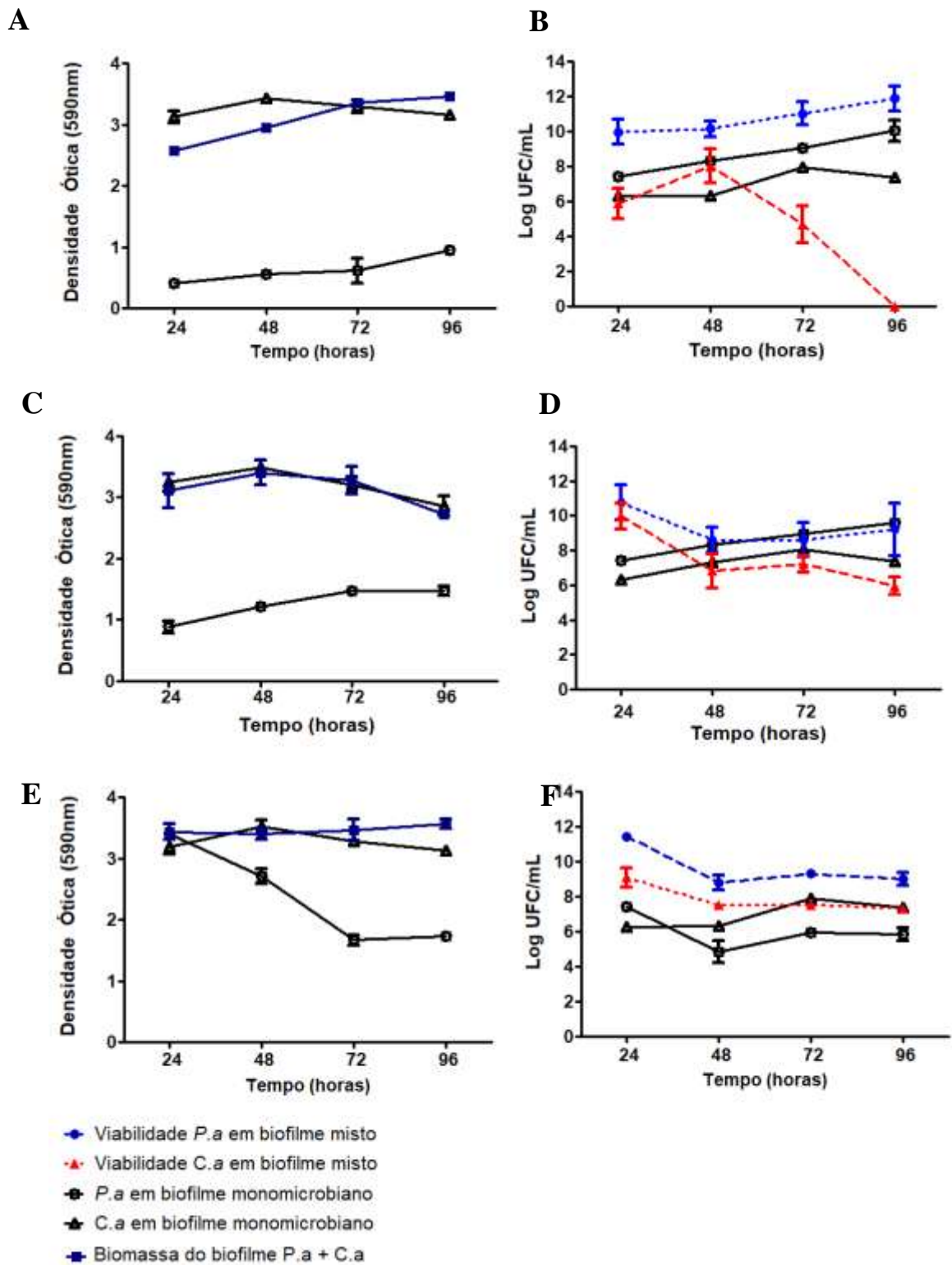


Figura 12. Cinética de formação de biofilmes polimicrobianos de *Candida albicans* SC5314 e *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 utilizando três diferentes estratégias: incubando ambas as cepas ao mesmo tempo (A-B); sobre o biofilme maduro de *C. albicans* acrescentando 100 μ L do inóculo de *P. aeruginosa* (C-D); e sobre o biofilme maduro de *P. aeruginosa* acrescentando 100 μ L do inóculo de *C. albicans* (E-F). A biomassa dos biofilmes foi quantificada pela coloração com cristal violeta (A, C e E) e a viabilidade celular foi analisada

pelo método de contagem de viáveis (B, D e F). Os resultados indicam a média \pm desvio padrão de três experimentos em quadruplicata.

Estudos anteriores disponíveis na literatura demonstram que em biofilmes mistos com *C. albicans*, a bactéria *P. aeruginosa* regula positivamente a produção de secreções associadas à virulência, como as fenazinas em relação a biofilmes monomicrobiano de *P. aeruginosa* (O'BRIEN; FOTHERGILL, 2017). Essa produção aumentada de fenazinas por *P. aeruginosa* quando está na presença de *C. albicans*, por sua vez, aumenta a produção de etanol pela levedura, uma vez que as fenazinas exercem controle da respiração para fermentação em *C. albicans* (FOURIE et al., 2016; DEVEAU et al., 2018). Algumas evidências demonstram ainda que, em consequência, o etanol produzido por *C. albicans*, estimula a formação de biofilmes em *P. aeruginosa*, resultando em taxa de crescimento aumentada e possível transformação para fenótipos mucoides (HOGAN, 2002; HOGAN, 2004). O etanol também é um imunossupressor, influenciando negativamente a resposta imune do hospedeiro (FOURIE et al., 2016). Nesse estudo, observou-se que, em todas as estratégias, os biofilmes mistos tiveram uma biomassa mais robusta que os monomicrobianos para cada espécie. Uma explicação para o aumento da biomassa dos biofilmes mistos é que a retroalimentação positiva entre a produção de fenazinas em *P. aeruginosa* e a produção de etanol em *C. albicans* pode ter ocorrido. Como citado anteriormente, a exposição a concentrações sub-tóxicas de fenazinas resulta no aumento da produção de produtos da fermentação, tais como etanol, por *C. albicans*. Em resposta ao aumento dos níveis de etanol resultantes, *P. aeruginosa* aumenta a produção de fenazinas e promove a sua própria formação do biofilme. Esta interação também tem sido demonstrada em modelos *in vivo* e poderia, a princípio, levar a um aumento da virulência por ambas as espécies no hospedeiro (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2018; FOURIE et al., 2016)

No presente estudo, quando as duas cepas foram colocadas ao mesmo tempo em co-cultura (estratégia 1), *P. aeruginosa* demonstrou capacidade de matar o fungo após 96h de interação. Isso poderia ser parcialmente explicado pelas sinalizações que ocorrem entre essas duas espécies e a ação das fenazinas, influenciando a expressão gênica, a virulência e até a sobrevivência do fungo (BJARNSHOLT et al., 2010; O'BRIEN; FOTHERGILL, 2017).

Durante a formação de biofilmes polimicrobianos *P. aeruginosa* mostrou matar hifas de *C. albicans in vitro* quando os dois micro-organismos foram adicionados simultaneamente a uma co-cultura em estudos anteriores. A morte do fungo em decorrência da formação do biofilme de *P. aeruginosa* parece ocorrer pelo envolvimento de dois fatores de virulência de

P. aeruginosa: uma fosfolipase C hemolítica secretada, que degrada fosfatidilcolina (um fosfolípido abundante em eucariotos), e fenazinas, tais como a piocianina em *P. aeruginosa*, que geram espécies tóxicas de oxigênio altamente reativas (PELEG et al, 2010; MORALES; HOGAN, 2010).

Dados anteriormente descritos demonstraram que moléculas derivadas de parede celular bacteriana, conhecidas como muramil dipeptídeos, atuam como indutores potentes do desenvolvimento de hifas em *C. albicans*, promovendo aumento da virulência do fungo e permitindo a invasão de tecidos do hospedeiro. Essas descobertas podem elucidar o possível mecanismo por trás da virulência aumentada de *C. albicans* na configuração de uma infecção bacteriana (MORALES; HOGAN, 2010).

Além disso, sabe-se que as populações de *C. albicans* secretam uma molécula de *quorum sensing* chamada farnesol, que inibe a via controlada por RAS1, envolvida no crescimento de hifas, apesar das condições que normalmente desencadeiam filamentação tais como soro e temperatura de 37 ° C (MORALES; HOGAN, 2010). Surpreendentemente, esta molécula pode também modular o comportamento de bactérias e sua virulência, alterando a produção de fenazinas tóxicas, tais como a piocianina em *P. aeruginosa* (MORALES; HOGAN, 2010; GULATI; NOBILE, 2016; FOURIE et al., 2016).

A microbiota humana proporciona diferentes condições para interações entre diversas espécies de bactérias e fungos e muitas doenças são causadas por formação de biofilme polimicrobianos, tais como a cárie dentária (cavidade oral), infecções crônicas pulmonares (por exemplo, fibrose cística), infecções do trato urinário, infecções em feridas e relacionadas a dispositivos médicos (LOHSE et al., 2017). Em vista disso, o estudo de diferentes condições de interação entre fungo-bactéria torna-se uma ferramenta valiosa.

No presente estudo, as células de *C. albicans* tiveram maior sobrevivência ao longo das 96h quando foram adicionadas ao biofilme maduro de *P. aeruginosa* (estratégia 3). Isso pode ser constatado observando os valores de UFC/mL em cada uma das estratégias. A diferença nos resultados de biomassa e viabilidade celular em cada uma das estratégias testadas demonstra que diferentes condições de cultivo afetam diretamente as interações entre os micro-organismos no interior do biofilme. Isso provavelmente ocorre pela ação das moléculas de QS e de alterações como disponibilidade de ferro, níveis de oxigênio e variações de pH no meio, influenciando no processo de aderência, crescimento e manutenção do biofilme polimicrobiano e afetando diretamente o comportamento das espécies em cada uma das condições avaliadas nesse estudo (O'BRIEN; FOTHERGILL, 2017).

Estudos prévios de microscopia eletrônica de varredura em biofilmes dessas duas espécies revelaram que as células de *P. aeruginosa* se aderem a *C. albicans* através de suas hifas. As hifas podem estar presentes tanto no biofilme fúngico quanto em células planctônicas de *C. albicans*, de acordo com a regulação gênica em diferentes condições de cultivo. Outros estudos têm demonstrado que proteínas de adesão de *C. albicans* (por exemplo, Als1, Als2 e Als3), proteínas da parede das hifas (por exemplo, Hwp1) e reguladores de transcrição (por exemplo, Bcr1) (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006; PETERS et al., 2012) desempenham um papel crucial nas interações entre *C. albicans* e espécies bacterianas (LOHSE et al., 2017).

Outros estudos demonstraram que, em meios líquidos, *P. aeruginosa* consegue aderir e formar biofilme sobre as hifas de *C. albicans* e, posteriormente, provoca a morte da célula fúngica. Porém, a bactéria não consegue se aderir e nem matar a forma de levedura de *C. albicans* (HOGAN; KOLTER, 2002). Tais estudos prévios permitem sugerir que células leveduriformes de *C. albicans* têm aumento da sobrevivência na presença de *P. aeruginosa* e, portanto, a transição de hifa para levedura pode contribuir a coexistência de ambas as espécies em culturas mistas (PELEG et al., 2010), o que pode ter ocorrido nas estratégias 2 e 3 deste estudo.

Além disso, Ovchinnikova et al. (2012) sugeriu que a 3-oxo-HSL é necessária para a aderência da *P. aeruginosa* em hifas de *C. albicans*, isso porque 3-oxo-HSL está envolvida na produção de proteínas de adesão a superfícies em células de *P. aeruginosa*. Por outro lado, essa molécula de QS de *P. aeruginosa* é capaz de agir também inibindo a filamentação de *C. albicans* de forma dose-dependente (OVCHINNIKOVA ET AL., 2012, GULATI; NOBILE, 2016).

Mcalester et al., 2008 mostrou que altas concentrações de 3-oxo-HSL inibem a filamentação de *C. albicans*, entretanto, baixas concentrações dessa molécula não são capazes de inibir a transição de levedura para hifas em co-culturas de *C. albicans* e *P. aeruginosa*. Dessa forma, é possível sugerir que no presente estudo *C. albicans* conseguiu formar uma rede de filamentos aderidos, sobre os quais *P. aeruginosa* formou seu biofilme e conseguiu matar as células filamentosas de *C. albicans* na estratégia 1. Já nas estratégias 2 e 3 as concentrações de 3-oxo-HSL influenciaram na regulação da expressão gênica de *C. albicans*, com consequência tanto na quantidade de bactérias aderidas e interagindo com *C. albicans*, quanto na retenção de células fúngicas viáveis dentro dos biofilmes (NOBILE et al., 2016). Tal teoria é concordante com a ação dose-dependente de 3-oxo-HSL sobre *C. albicans*, visto que na estratégia 3 provavelmente a quantidade dessa molécula disponível no meio era maior

do que nas duas primeiras estratégias, o que fez com que o fungo tivesse também maior taxa de sobrevivência.

Dentro deste contexto, as cepas de *C. albicans* e *P. aeruginosa* utilizadas nesse trabalho mostraram-se boas produtoras de biofilme monomicrobiano e as três estratégias utilizadas para a formação de biofilme misto com as cepas SC5314 de *C. albicans* e PAO1 de *P. aeruginosa* foram eficazes. Para o posterior tratamento dos biofilmes com a Caspofungina, o tempo de 24h de formação pode ser utilizado em todas as estratégias, mas neste estudo escolhemos a estratégia 1 para ser o modelo de atividade antibiofilme misto formado por *Candida* spp. e *P. aeruginosa*.

5.7 Suscetibilidade dos biofilmes monomicrobianos de *Candida* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*

No presente estudo, a suscetibilidade dos biofilmes fungicos de *C. albicans* SC5314, *C. glabrata* 2001, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. tropicalis* ATCC 200956 e dos biofilmes bacterianos das cepas de *P. aeruginosa* 48-1997A, *P. aeruginosa* 151 e *P. aeruginosa* PAO1 frente aos antifúngicos CAS, MICA e AMB foi analisada. Também foi analisada a suscetibilidade dessas mesmas cepas ao antibiótico POL.

Os ensaios de susceptibilidade para células do biofilme foram realizados de acordo com o descrito na Seção 4.1.1. A determinação da porcentagem de redução do crescimento foi efetuada através da coloração com cristal violeta e leitura da absorbância no espectrofotômetro. As concentrações inibitória mínima do fármaco sobre células de biofilme que promove 50% (CIM-B₅₀) e 90% (CIM-B₉₀) de redução da biomassa foram determinadas (Tabela 6). Ao contrário do observado nos ensaios com células planctônicas, os antimicrobianos em biofilme da maioria dos isolados apresentaram altos valores de CIM-B₅₀ e CIM-B₉₀.

Os estudos de susceptibilidade permitiram observar que as células de biofilmes de todos os isolados estudados são muito mais tolerantes aos antifúngicos do que suas suspensões celulares. Não foi possível, no entanto, determinar a causa da maior ou menor susceptibilidade das células de biofilme de algumas cepas aos fármacos. Por outro lado, os resultados obtidos permitem supor que a resistência dos biofilmes formados pelas diferentes espécies de *Candida* resulta de um processo complexo e multifatorial.

Em biofilmes os micro-organismos possuem mais proteção aos mecanismos de defesa do hospedeiro e aos antimicrobianos. Por isso, infecções relacionadas a biofilmes apresentam

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 persistentes resistentes, e à expressão de bombas de efluxo (MELLO et al., 2016). Mesmo que muitos avanços no entendimento de biofilmes de *Candida* spp. e de *P. aeruginosa* tenham sido alcançados na última década, ainda existem limitações que impedem ensaios clínicos para avaliação de novos agentes a serem utilizados em infecções relacionadas a biofilmes, tais como a falta de um método de referência para determinação da suscetibilidade de biofilmes aos antimicrobianos.

Dos resultados encontrados, AMB mostrou atividade contra biofilmes de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* com concentrações de CIM-B₉₀ aproximadamente 500 vezes maiores do que as encontradas para células planctônicas. Para *C. tropicalis* as concentrações necessárias para conseguir uma inibição de 90% foram maiores que a concentração máxima testada (> 128µg/mL). De acordo com Taff et al (2013) o maior problema no uso deste antifúngico é que as doses de AMB necessárias para erradicar biofilmes de *Candida* spp. podem não ser seguras para o paciente devido à elevada toxicidade do fármaco.

Em relação ao antifúngico CAS, da classe das equinocandinas, concentrações relativamente baixas foram suficientes para inibir em 50% os biofilmes de *C. glabrata* e *C. tropicalis*, sendo essas concentrações até 8 vezes maiores que a CIM-P₅₀ para células planctônicas das mesmas cepas. Já para os isolados de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, as concentrações de CIM-B₅₀ foram maiores, 8µg/mL e 64µg/mL respectivamente, sendo até 100 vezes mais altas do que as encontradas para células planctônicas.

Outros autores também demonstraram que biofilmes de *C. parapsilosis* (SIMITSOPOULOU et al., 2013; CARDOSO., 2017) e de *C. albicans* (CARDOSO., 2017) foram menos suscetíveis à Caspofungina. Apesar de pesquisas anteriores já terem comprovado a alta atividade de CAS contra biofilmes de *Candida* spp. (MAIOLO et al., 2014), no presente estudo o biofilme das espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foi reduzido em 90% somente com a maior concentração testada (128 µg/mL).

Os valores de CIM-B₅₀ e CIM-B₉₀ obtidos para o antifúngico MICA, também da classe das equinocandinas, foram bastante semelhantes aos valores encontrados nos ensaios com CAS. Entretanto, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* mostraram valores de CIM-B₅₀ e CIM-B₉₀ menores para essa droga, quando comparado com a Caspofungina.

Os resultados encontrados para POL sugerem que, nas concentrações testadas, esse antimicrobiano não possui ação contra biofilmes de *Candida* spp., com exceção do biofilme de *C. tropicalis*, que apresentou CIM-B₅₀ de 32 µg/mL, concentração 16 vezes maior do que a

necessária para inibir 50% das células planctônicas dessa mesma cepa. ZHAI e colaboradores (2010) descreveram que, em concentrações elevadas (20 a 50 µg/mL), essa droga possui atividade antifúngica para células planctônicas de *C. albicans*, o que não se observou no presente estudo. Entretanto, até o momento não há dados disponíveis na literatura para a ação em células planctônicas de *C. tropicalis* ou para células de biofilme de *Candida* spp.

Sobre biofilmes monomicrobianos de *P. aeruginosa*, somente os isolados MDR (151 e 48-1997A) foram susceptíveis as equinocandinas em altas concentrações enquanto o antibiótico POL foi ativo para todas as cepas testadas (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de concentração inibitória mínima (CIM-B) dos antimicrobianos sobre biofilmes monomicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida* spp.

Biofilmes	CAS		MICA		AMB		POL	
	CIM-B ₅₀	CIM-B ₉₀	CIM-B ₅₀	CIM-B ₉₀	CIM-B ₅₀	CIM-B ₉₀	CIM-B ₅₀	CIM-B ₉₀
<i>C. a</i> SC5314	8	128	16	128	8	128	>128	>128
<i>C.t</i> ATCC 200956	4	128	≤ 2	32	64	>128	32	>128
<i>C.p</i> ATCC 22019	64	128	16	64	≤ 2	32	>128	>128
<i>C.g</i> ATCC 2001	≤ 2	16	≤ 2	64	≤ 2	32	>128	>128
<i>P.a</i> PAO1	>128	>128	>128	>128	>128	>128	8	16
<i>P.a</i> 151	64	>128	>128	>128	>128	>128	≤ 2	16
<i>P.a</i> 48-1997A	>128	>128	128	>128	> 128	>128	≤ 2	16

Nota: Os valores estão expressos em µg/mL. CIM-B₅₀, menor concentração capaz de inibir 50% da biomassa do biofilme; CIM-B₉₀, menor concentração capaz de inibir 90% da biomassa do biofilme; *P.a*, *Pseudomonas aeruginosa*; *C.a*, *Candida albicans*; *C.p*, *Candida parapsilosis*; *C.g*, *Candida glabrata*; *C.t*, *Candida tropicalis*

5.8 Suscetibilidade dos biofilmes polimicrobianos de *Candida* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*

Crescentes evidências apontam que muitas infecções hospitalares são decorrentes de processos complexos envolvendo vários patógenos, o que poderia explicar parcialmente as altas taxas de insucesso terapêutico pelos métodos convencionais, que visam combater um agente isolado como único responsável pela doença. A capacidade de formação de biofilme por espécies bacterianas e fúngicas também causa impacto na suscetibilidade aos antimicrobianos, levando à maior resistência (WATERS; MUSCEDERE, 2015; O'BRIEN; FOTHERGILL, 2017). Dessa forma, é sugerido que o resultado da terapia antimicrobiana em infecções pode ser severamente impactado pela interação de micro-organismos dentro de biofilmes polimicrobianos, especialmente nos casos de infecções associadas a dispositivos médico-hospitalares (RODRIGUES et al., 2017).

À luz dos relatos recentes sobre interações entre *P. aeruginosa* e espécies de *Candida* spp. em infecções, esse estudo avaliou a suscetibilidade dos biofilmes polimicrobianos de *P. aeruginosa* e diferentes espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* para antifúngicos (Caspofungina, Micafungina e Anfotericina B) e um antibiótico (Polimixina B).

Observando os valores de CIM-B₅₀ e CIM-B₉₀ obtidos para os biofilmes mistos de *P. aeruginosa* e *Candida* spp. (Tabela 8) é possível observar que os biofilmes tratados com AMB não foram significativamente perturbados, nem mesmo nas maiores concentrações da droga apresentando valores de CIM-B₅₀ apenas para os biofilmes mistos de *C. albicans* com duas diferentes cepas, *P. aeruginosa* 151 e *P. aeruginosa* 48-1997A e para o biofilme misto de *C. glabrata* com *P. aeruginosa* 151. AMB não foi capaz de inibir biofilmes monomicrobianos de *P. aeruginosa*, entretanto esse antifúngico demonstrou ter efeito em reduzir 90% das células de biofilme monomicrobiano das cepas de *C. albicans* (CIM-B₅₀ 8 µg/mL e CIM-B₉₀ 128 µg/mL) e *C. glabrata* (CIM-B₅₀ >2 µg/mL e CIM-B₉₀ 32 µg/mL). O efeito do fármaco sobre as células fúngicas presentes no biofilme misto de *Candida* spp. e *P. aeruginosa* pode ser uma explicação para a redução de 50% da biomassa observada no ensaio de biofilmes mistos. O estudo de Rodrigues e colaboradores (2017) encontraram resultados semelhantes aos do presente estudo para biofilmes mistos de *C. albicans* com *P. aeruginosa* tratados com AMB e, avaliando a viabilidade celular dos biofilmes mistos, os autores demonstraram o CIM de *P. aeruginosa* para AMB em cultura mista não foi alterado em comparação com populações únicas, enquanto um aumento de 8 vezes no CIM para AMB foi

observado para *C. albicans*. Concordante com tais achados, neste estudo foram necessárias concentrações de 4 a 8 vezes maiores de AMB para inibir 50% da biomassa dos biofilmes de *C. albicans* quando em cultura mista com *P. aeruginosa*.

O tratamento dos biofilmes mistos com POL promoveu resultados surpreendentes, com significativa redução da biomassa em todas as combinações de micro-organismos testadas (Tabela 7). Com as maiores concentrações (entre 4 e 128 µg/mL) foi possível observar reduções de 90% da biomassa (CIM-B₉₀) para os biofilmes de espécies mistas, com exceção das combinações de *C. albicans* SC5314 com *P. aeruginosa* PAO1 e com *P. aeruginosa* 48-1997A que apresentaram redução de 50% da biomassa em concentrações elevadas de POL (64 µg/mL para *C. albicans* SC5314 com *P. aeruginosa* PAO1 e 8 µg/mL para *C. albicans* SC5314 com *P. aeruginosa* 48-1997A). Os melhores resultados obtidos no tratamento com esse antimicrobiano foram para os biofilmes mistos de *C. tropicalis* com cada uma das cepas de *P. aeruginosa* os quais apresentaram valores de CIM-B₅₀ <2 µg/mL e CIM-B₉₀ em concentrações entre 4 e 8 µg/mL de POL.

As equinocandinas, CAS e MICA, apresentaram valores de CIM-B₅₀ entre 4 até 128 µg/mL tendo melhor atividade sobre os biofilmes mistos de *Candida* spp. com cepas de *P. aeruginosa* MDR (151 e 48-1997A); porém, nenhum dos dois fármacos foi capaz de inibir 90% dos biofilmes mistos nas concentrações testadas (Tabela 7).

Tabela 8. Valores de concentração inibitória mínima (CIM-B) dos antimicrobianos sobre biofilmes polimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida* spp.

Biofilmes	CAS		MICA		AMB		POL	
	CIM-B ₅₀	CIM-B ₉₀	CIM-B ₅₀	CIM-B ₉₀	CIM-B ₅₀	CIM-B ₉₀	CIM-B ₅₀	CIM-B ₉₀
<i>C. a</i> SC5314 + <i>P. a</i> PAO1	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	>128
<i>C. a</i> SC5314 + <i>P. a</i> 151	32	>128	32	>128	32	>128	32	128
<i>C. a</i> SC5314 + <i>P. a</i> 48-1997A	64	>128	128	>128	64	>128	8	>128
<i>C. t</i> ATCC 200956 + <i>P. a</i> PAO1	8	>128	16	>128	>128	>128	<2	4
<i>C. t</i> ATCC 200956 + <i>P. a</i> 151	4	>128	8	>128	>128	>128	<2	4
<i>C. t</i> ATCC 200956 + <i>P. a</i> 48-1997A	64	>128	32	>128	>128	>128	<2	8
<i>C. p</i> ATCC 22019 + <i>P. a</i> PAO1	>128	>128	>128	>128	>128	>128	16	32
<i>C. p</i> ATCC 22019 + <i>P. a</i> 151	32	>128	64	>128	>128	>128	4	16
<i>C. p</i> ATCC 22019 + <i>P. a</i> 48-1997A	>128	>128	>128	>128	>128	>128	4	16
<i>C. g</i> ATCC 2001 + <i>P. a</i> PAO1	>128	>128	>128	>128	>128	>128	16	32
<i>C. g</i> ATCC 2001 + <i>P. a</i> 151	32	>128	32	>128	64	>128	8	128
<i>C. g</i> ATCC 2001 + <i>P. a</i> 48-1997A	128	>128	64	>128	>128	>128	8	32

Nota: Micro-organismos - *C. a*, *Candida albicans*; *C.t*, *Candida tropicalis*; *C.p*, *Candida parapsilosis*; *C.g*, *Candida glabrata*; *P.a*, *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobianos – CAS, Caspofungina; MICA, Micafungina; AMB, Anfotericina B; POL, Polimixina B. CIM-B₅₀, menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento microbiano; CIM-B₉₀, menor concentração capaz de inibir 90% do crescimento microbiano.

No presente estudo, Caspofungina e Micafungina mostraram ter mais efeito na diminuição da formação de biofilmes mistos de *C. tropicalis* com *P. aeruginosa* do que para outras espécies de *Candida*, considerando que foram necessárias menores concentrações dos antifúngicos para obter a diminuição de 50% dos valores de DO. Esse achado é bastante interessante, pois nos últimos anos tem ocorrido o aumento na incidência de infecções sistêmicas por espécies não-*albicans* em todas as partes do mundo, e *C. tropicalis* é uma das espécies mais encontradas (DEORUKHKAR; SAINI, 2016).

O maior efeito de CAS e MICA para os biofilmes polimicrobianos de *C. tropicalis* e *P. aeruginosa* pode ser parcialmente explicado pela diferença na biomassa dos biofilmes de *C. albicans* em relação aos de *C. tropicalis*. Na cinética de formação de biofilmes monomicrobianos que foi realizada no presente estudo, a cepa de *C. tropicalis* foi a que apresentou menor biomassa no biofilme de 24h. Diversos autores já documentaram que os biofilmes de *C. albicans* apresentam, em geral, uma estrutura com várias dezenas de micrômetros de espessura e essa é uma característica que distingue os biofilmes de *C. albicans* dos de espécies não-*albicans*, que tendem a apresentar biofilmes menos espessos. Esta diferença pode resultar no aumento da resistência de biofilmes monomicrobianos e polimicrobianos de *C. albicans* em relação aos de outras espécies (NOBILE et al., 2016; LOHSE et al., 2017). Neste estudo *C. tropicalis* também apresentou redução de 50% da biomassa com concentrações menores do que *C. albicans* no ensaio de suscetibilidade para biofilmes monomicrobianos. A presença de *P. aeruginosa* concomitantemente a *C. tropicalis* no biofilme, entretanto, aumentou a resistência ao tratamento e os valores de CIM-B₅₀ foram até 16x maiores do que os encontrados para os biofilmes monomicrobianos da mesma espécie fúngica.

Observou-se que o perfil de suscetibilidade dos biofilmes monomicrobianos (Tabela 7) refletiu diretamente no perfil de suscetibilidade quando em uma comunidade polimicrobiana (Tabela 8). Portanto, biofilmes polimicrobianos formados pela combinação de dois isolados que tiveram CIM mais baixos quando em biofilme monomicrobiano também apresentaram valores menores de CIM em biofilmes mistos quando comparados àqueles que precisaram de altas concentrações de fármaco para reduzir a sua biomassa em biofilme de espécie única.

Algumas relações entre *Candida* spp. e espécies bacterianas são sinérgicas, fornecendo proteção a uma ou ambas as espécies no contexto de biofilmes mistos. Por exemplo, quando cepas de *C. albicans* e *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) foram cultivadas juntas em um biofilme, a presença de *C. albicans* pareceu proteger a cepa de MRSA da eliminação pela vancomicina, um antibiótico normalmente eficaz contra MRSA (LOHSE et al., 2017). Os

autores relacionaram essa proteção à matriz extracelular de *C. albicans* já que a suplementação com β -1,3-glucana exógena aumentou a sobrevivência de MRSA na presença de vancomicina, e esse efeito protetor foi reduzido quando a produção de β -1,3-glucana era interrompida ou sua síntese bloqueada. Entretanto, tal efeito protetor da presença de *C. albicans* ou de espécies não-*albicans* para a bactéria não foi observado no presente estudo para o tratamento dos biofilmes polimicrobianos com *P. aeruginosa*, nos quais os valores de CIM para a bactéria em biofilme polimicrobiano foram similares aos da mesma espécie em biofilme único. Possivelmente o efeito protetor foi prejudicado pelo tratamento com drogas da classe das equinocandinas, que atuam como inibidores da síntese de 1,3- β -D-glucana, que está presente não somente na parede celular e nos biofilmes de *Candida* (DIOMEDI, 2004; ESCHENAUER et al., 2007), como também é um componente da matriz extracelular de biofilmes dessa bactéria, conforme já foi demonstrado cientificamente (LEQUETTE et al. 2007; COULON et al. 2010; BEAUDOIN et al. 2012; BAZZI et al., 2013; KISSOYAN, 2016). Portanto, o mecanismo de ação das equinocandinas pode ser uma importante vantagem no uso desse antifúngico para o tratamento de infecções polimicrobianas nas quais haja envolvimento de espécies de *Candida*.

Buscando compreender melhor as diferenças entre os valores de CIM encontrados para os diferentes biofilmes polimicrobianos tratados e as interações entre os micro-organismos no interior dos biofilmes, foi realizado o ensaio de viabilidade celular, pelo método de contagem de viáveis em placa, para alguns dos biofilmes mistos que apresentaram redução de 50% da biomassa (CIM₅₀) no ensaio com cristal violeta. O ensaio de viabilidade foi realizado para o tratamento com um antifúngico (Caspofungina) e o antibiótico (Polimixina B).

Dessa forma, selecionamos quatro biofilmes polimicrobianos: *C. a* SC5314 + *P. a* 151, *C. t* ATCC 200956 + *P. a* 151, *C. p* ATCC 22019 + *P. a* 151 e *C. g* ATCC 2001 + *P. a* 151 para realizar os ensaios de viabilidade após tratamento com caspofungina e polimixina B (Figuras 13 e 14, respectivamente).

A CAS reduziu de maneira dose-dependente o número de UFC de *Candida* spp. e *P. aeruginosa* 151 em até 5 Log e de até 2 Log no número de células cultiváveis, respectivamente (Figura 13), pode-se afirmar que a Caspofungina possui efeito na redução de biofilmes polimicrobianos de *Candida* spp. e *P. aeruginosa*. É importante ressaltar também que a cepa *P. a* 151, que apresentou boa resposta à equinocandinas tanto em biofilme monomicrobiano quanto em todos os biofilmes mistos, é um isolado MDR. Dessa forma, os resultados aqui descritos são extremamente relevantes no contexto clínico, considerando que *P. aeruginosa* é responsável por uma ampla variedade de infecções nosocomiais e a

quantidade de infecções multirresistentes está aumentando gradualmente a cada ano (ANGELETTI et al., 2018).

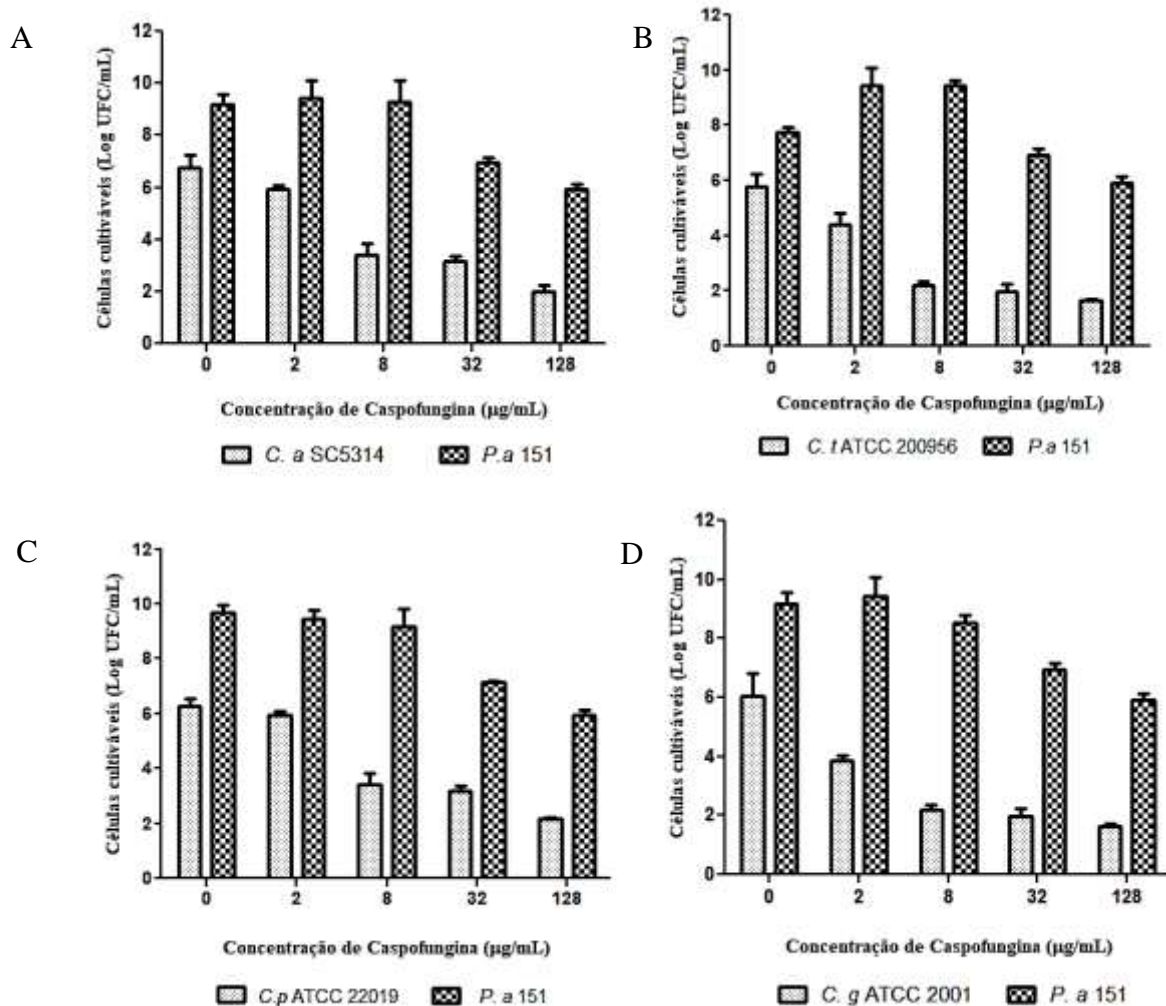


Figura 13. Efeito da caspofungina sobre a viabilidade das células dos biofilmes polimicrobianos formados em 24h pelo isolado *Pseudomonas aeruginosa* 151 com diferentes espécies de *Candida*. A, *C. albicans* SC5314; B, *C. tropicalis* ATCC 200956; C, *C. parapsilosis* ATCC 22019; D, *C. glabrata* ATCC 2001. A coluna 0 corresponde aos biofilmes polimicrobianos não tratados.

Estudos anteriores demonstraram que a Micafungina requer altas concentrações (10 mg/mL) para apresentar efeito antibacteriano em biofilmes de *P. aeruginosa* (BAZZI et al., 2013; KISSOYAN et al., 2016). No presente estudo a CAPS demonstrou agir em concentrações de, pelo menos, 32µg/mL para apresentar redução significativa no número de UFC/mL dentro dos biofilmes mistos ($p < 0.05$).

A desorganização da estrutura de um biofilme facilita a infiltração de agentes antimicrobianos através da estrutura comprometida do biofilme e permite que os componentes

de defesa imunológica do hospedeiro também tenham acesso mais fácil aos agentes infecciosos (RASAMIRAVAKA et al. 2015; KISSOYAN et al., 2016). Dessa forma, apesar das altas concentrações de CIM para as equinocandinas encontradas para a maior parte dos biofilmes polimicrobianos testados nesse estudo, essa classe de antifúngico demonstrou potencial efeito em desorganizar a estrutura do biofilme, reduzindo a sua biomassa e a viabilidade celular fúngica e bacteriana no interior dos biofilmes, comprovando seu efeito anti-biofilme. Esses achados permitem sugerir que as equinocandinas, especialmente a Caspofungina e a Micafungina, podem ser utilizadas como uma alternativa no tratamento de infecções polimicrobianas envolvendo bactérias e fungos.

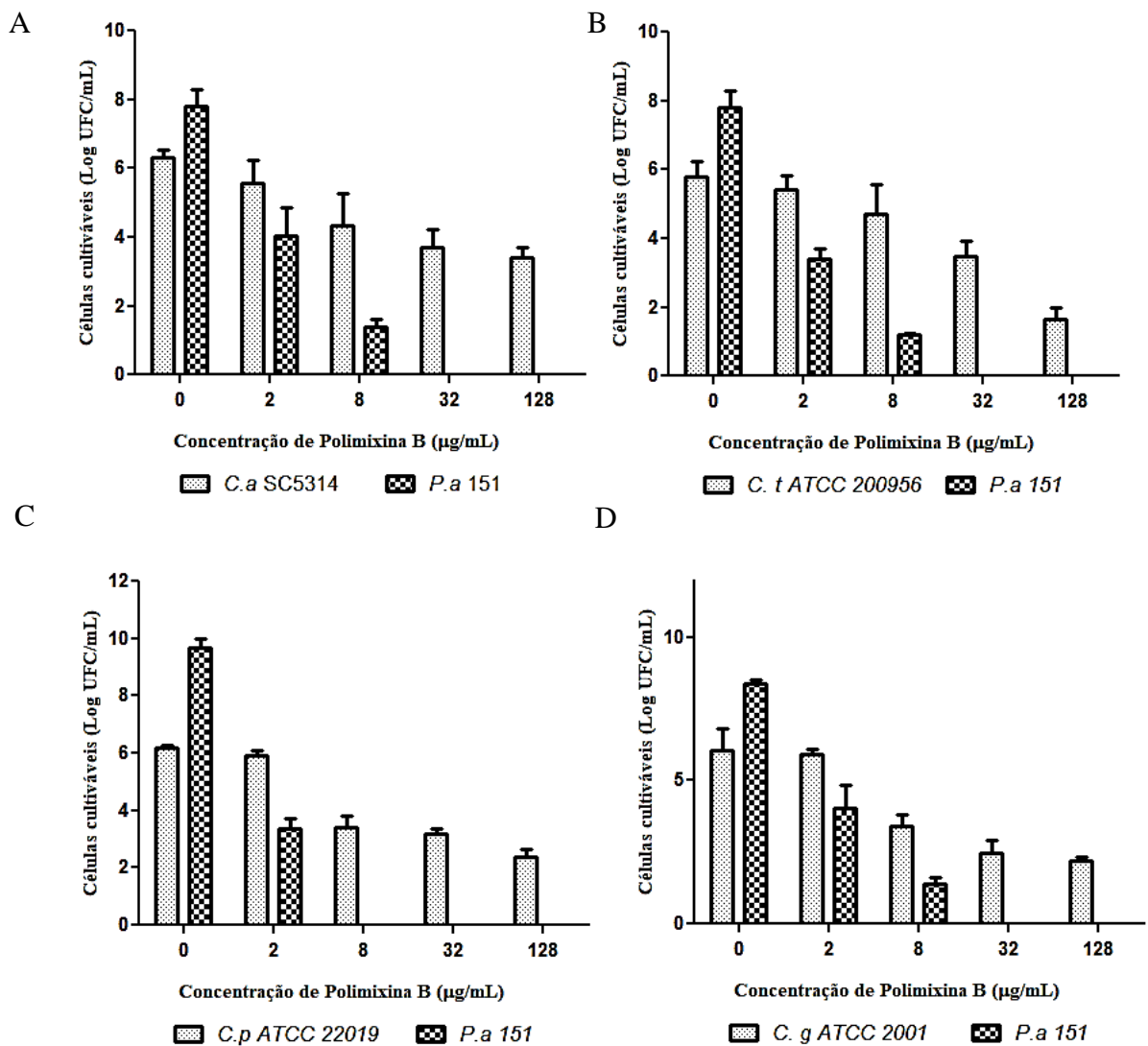


Figura 14. Efeito da Polimixina B sobre a viabilidade das células dos biofilmes polimicrobianos formados em 24h pelo isolado *Pseudomonas aeruginosa* 151 com diferentes espécies de *Candida*. A, *C. albicans* SC5314; B, *C. tropicalis* ATCC 200956; C, *C. parapsilosis* ATCC 22019; D, *C. glabrata* ATCC 2001. A coluna 0 corresponde aos biofilmes não tratados.

Na Figura 14 mostra que a POL reduziu drasticamente a viabilidade de *P. aeruginosa* 151 a níveis não detectáveis pela técnica de contagem de viagens em concentrações maiores ou iguais a 8 µg/mL; também em 2 µg/mL houve redução significativa da carga bacteriana no biofilme misto ($p < 0.001$). Sobre a viabilidade de *Candida* spp. concentrações maiores ou iguais a 8 µg/mL reduziram significativamente o número de células viáveis ($p < 0.001$).

Os ensaios de viabilidade permitiram observar que tanto a CAS e quanto a POL isoladamente não foram suficientes para erradicar os biofilmes mistos de *P. aeruginosa* e *Candida* spp. (Figuras 13 e 14). Conforme o esperado as cepas de *Candida* foram mais suscetíveis à CAS e o isolado de *P. aeruginosa* 151 à POL.

A difícil penetração dos agentes antimicrobianos e o crescimento mais lento dos micro-organismos nas camadas mais profundas do biofilme estão associados à sobrevivência de um subconjunto de células, denominadas persistentes, um dos fatores de resistência convencionalmente associados aos biofilmes (EDMISTON et al., 2015). A ocorrência desse fenômeno também poderia explicar a sobrevivência de células fúngicas e bacterianas mesmo na maior concentração (128µg/mL) de CAS ou POL utilizadas para o tratamento dos biofilmes polimicrobianos no presente estudo.

O antibiótico POL foi capaz de desencadear perturbações significativas em *P. aeruginosa*, mesmo em biofilmes mistos. Entretanto, ao observar os valores de UFC/mL de *P. aeruginosa* após tratamento dos biofilmes mistos é possível constatar que foi necessário, no mínimo, uma concentração de 8 µg/mL para eliminar totalmente as células bacterianas. Portanto, a resistência da bactéria à POL quando em biofilme foi até 16-300 vezes maior quando comparado com culturas planctônicas, sob as quais a concentração de 0,5 µg/mL foi suficiente para eliminar todas as células bacterianas da cultura (Tabela 6). Isso poderia ser uma explicação para o frequente fracasso terapêutico dos antimicrobianos contra infecções por biofilme e especificamente para biofilmes de *P. aeruginosa* (O'BRIEN; FOTHERGILL, 2017).

A terapia combinada utilizando CAS ou MICA com outro antibiótico, tais como aztreonam ou levofloxacino, também pode ser um importante alvo de estudos futuros, visto que testes “*in vitro*” e “*in vivo*” realizados por Kissoyan et al (2016) comprovaram que a MICA apresenta efeito sinérgico quando aplicada em combinação com Aztreonam ou Levofloxacino contra *P. aeruginosa*.

Com o desenvolvimento desse estudo e sabendo que *C. albicans* e outras espécies de *Candida* frequentemente desenvolvem biofilmes polimicrobianos com *P. aeruginosa* e da constatação de que apenas AMB, CAS, MICA ou POL mostraram pouca eficiência na

erradicação desses biofilmes “in vitro”, é interessante que estudos futuros possam testar estratégias de tratamento com múltiplos fármacos, combinando ambos os agentes antimicrobianos para combater essas infecções mistas e evitar a resistência. Uma combinação de Micafungina ou Caspofungina com Polimixina B pode resultar em um efeito sinérgico das drogas e levar a total erradicação dos biofilmes polimicrobianos. A combinação de agentes antibacterianos e fúngicos têm demonstrado resultados promissores em diversos estudos (RASAMIRAVAKA et al. 2015; KISSOYAN et al., 2016; RODRIGUES et al., 2017) e pode ser um novo caminho para terapia ou profilaxia de doenças associadas a biofilmes.

6 CONCLUSÕES

Compreender o papel dos biofilmes polimicrobianos em doenças infecciosas é de extrema importância para direcionar terapias eficazes no combate às infecções. Infecções mistas ocasionadas por biofilmes de *Candida* spp. e *P. aeruginosa* são cada vez mais frequentes em ambientes hospitalares; portanto, o estudo das interações entre *P. aeruginosa* e *Candida* spp. e como eles respondem aos fármacos quando interagindo em biofilme é uma ferramenta indispensável para o desenvolvimento de terapias para eficazes. Nesse estudo, dois antifúngicos da classe das equinocandinas mostraram potencial efeito sobre comunidades polimicrobianas envolvendo *P. aeruginosa* e *C. albicans*, reduzindo tanto a biomassa total quanto número de células viáveis. Além disso, o antibiótico Polimixina B foi eficaz em reduzir de forma significativa a biomassa e a viabilidade dos biofilmes. No entanto, para fins de aplicação na terapêutica clínica, serão necessários testes adicionais “in vitro” e “in vivo” para avançar os resultados aqui encontrados e definir as concentrações antimicrobianas, bem como a duração do tratamento e formas de administração necessárias para o tratamento das infecções. A terapia combinada, como a associação de equinocandinas com outros antibacterianos como a Polimixina B, poderia ser uma estratégia interessante para o tratamento das infecções associadas a biofilmes mistos. Do mesmo modo, a constante busca por novos antimicrobianos eficazes contra biofilme é necessária para garantir o sucesso do tratamento das infecções polimicrobianas e a redução das taxas de mortalidade.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, Emily K.; ASHCRAFT, Deborah S.; PANKEY, George A. In vitro Synergistic Activity of Caspofungin Plus Polymyxin B Against Fluconazole-Resistant *Candida glabrata*. *The American journal of the medical sciences*, v. 351, n. 3, p. 265-270, 2016.

AL-FATTANI, Mohammed A.; DOUGLAS, L. Julia. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 48, n. 9, p. 3291-3297, 2004

ALMEIDA, R. S. *Micologia. Ciências Farmacêuticas*, Rio de Janeiro, Brazil, 2008.

ALONSO-VALLE, H. et al. Candidemia in tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. *Europ Clin Microbiol Infect Dis*, v. 22, p. 254-7, 2003.

ANDES, D. et al. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infection and immunity*, v. 72, n. 10, p. 6023-6031, 2004.

ANGELETTI, Silvia et al. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial strains: Molecular epidemiology and evolution. *Microbial pathogenesis*, v. 123, p. 233-241, 2018.

Antimicrob. Agents. Chemother., 52: 3783-3785, 2008.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. COMUNICADO DE RISCO Nº 01/2017 – GVIMS/GGTES/ANVISA. Relatos de surtos de *Candida auris* em serviços de saúde da América Latina. Março, 2017.

ARAÚJO, Bibiana Verlindo de. Modelagem farmacocinética-farmacodinâmica do antifúngico voriconazol. 2008.

AWAD, Lyn S. et al. An antibiotic stewardship exercise in the ICU: building a treatment algorithm for the management of ventilator-associated pneumonia based on local epidemiology and the 2016 Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society guidelines. *Infection and drug resistance*, v. 11, p. 17, 2018.

AZOULAY, Elie et al. *Candida* colonization of the respiratory tract and subsequent pseudomonas ventilator-associated pneumonia. *Chest*, v. 129, n. 1, p. 110-117, 2006.

BAILLIE, George S.; DOUGLAS, L. Julia. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 46, n. 3, p. 397-403, 2000.

BAILLIE, GEORGE S.; DOUGLAS, L. JULIA. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *Journal of medical microbiology*, v. 48, n. 7, p. 671-679, 1999.

BANDARA HMHN, Yau JYY, Watt RM, Jin LJ, Samaranayake LP. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits in-vitro *Candida* biofilm development. *BMC Microbiology*, v. 10, n. 4, p. 1, 2010.

BAZZI, W., Sabra, A., Zahreddine, L., Khairallah, M. T., Baroud, M., Hadi, U., & Matar, G. M. The inhibitory effect of micafungin on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*, v. 29, n. 8, p. 909-915, 2013.

BEAUSSART, A. et al. Single-cell force spectroscopy of the medically important *Staphylococcus epidermidis*-*Candida albicans* interaction. *Nanoscale* 5, 10894–10900 (2013).

BEHLAU, Irmgard; GILMORE, Michael S. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. *Archives of Ophthalmology*, v. 126, n. 11, p. 1572-1581, 2008.

BERDICHEVSKI, Roberto Herz. Nefrotoxicidade associada à anfotericina B em pacientes de baixo risco. 2003.

BERGEN, Phillip J. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ‘old’ polymyxins: what is new?. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 74, n. 3, p. 213-223, 2012.

BLANKENSHIP, Jill R.; MITCHELL, Aaron P. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current opinion in microbiology*, v. 9, n. 6, p. 588-594, 2006.

BORMANN, A. M.; MORRISON, V. A. Review of the pharmacology and clinical studies of micafungin. *Drug. Des. Devel. Ther.*, 3: 295–302, 2009.

BORMANN, A. M.; MORRISON, V. A. Review of the pharmacology and clinical studies of micafungin. *Drug. Des. Devel. Ther.*, 3: 295–302, 2009.

BOWMAN, J. C.; HICKS, P. S.; KURTZ, M. B.; ROSEN, H.; SCHMATZ, D. M.; LIBERATOR, P. A.; DOUGLAS, C. M. The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46: 3001-3012, 2002.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. Functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995.

BUSH, Karen. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1277, n. 1, p. 84-90, 2013.

CAÇADOR, Natália Candido. Epidemiologia molecular e características genéticas de adaptação de *Pseudomonas aeruginosa* causando infecção crônica em pacientes com Fibrose Cística e sua correlação com dados clínicos. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2016.

CALDERONE, Richard A.; FONZI, William A. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, v. 9, n. 7, p. 327-335, 2001.

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. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CHANDRA, Jyotsna et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of bacteriology*, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, 2001.

CHANG, M.R., et al. Surveillance of pediatric infections in a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Braz J Infect Dis*, v.7(2), p.140-60, 2003.

CHAVES, G.M.; CAVALVANTI, M. A. Q.; PORTO, A. L. F. Pathogenicity characteristics of stocked and fresh yeast strains. *Braz. J. Microbiol.*, 34: 197-202, 2003.

CHOI, Yongsoon et al. Clinical Predictors of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia in Emergency Department. *Emergency Medicine International*, v. 2018, 2018.

class of antifungal agents. *Drug. Resist. Update.*, 6: 197-218, 2003.

CLEVELAND, Angela Ahlquist et al. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008–2013: results from population-based surveillance. *PLoS One*, v. 10, n. 3, p. e0120452, 2015.

COLEMAN, D. C. et al. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Medical mycology*, v. 36, p. 156-165, 1997

COLOMBO, Arnaldo L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO, Arnaldo Lopes et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 34, n. 4, p. 281-286, 1999.

COLOMBO, Arnaldo Lopes; GUIMARÃES, Thaís. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2003.

COSTA-ORLANDI, Caroline et al. Fungal biofilms and polymicrobial diseases. *Journal of Fungi*, v. 3, n. 2, p. 22, 2017.

Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999, 284, 1318–1322. DAVIES et al., 2003

COTTER G, DOYLE S, KAVANAGH K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeast. *Immunology and Medical Microbiology*, v. 27, p. 163-167, 2000.

DE ARAÚJO LIMA, Alane Torres et al. O IMPACTO DA CANDIDÍASE ORAL EM PORTADORES DE SÍNDROME DE DOWN. *Anais do Seminário Científico da FACIG*, n. 2, 2017.

DE PÁDUA, RA Falleiros et al. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* to urinary catheters. *Rev Iberoam Micol*, v. 25, n. 3, 2008

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

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

DEVEAU, Aurélie et al. Bacterial–fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges. *FEMS microbiology reviews*, v. 42, n. 3, p. 335-352, 2018.

DHAMGAYE, Sanjiveeni; QU, Yue; PELEG, Anton Y. Polymicrobial infections involving clinically relevant Gram-negative bacteria and fungi. *Cellular microbiology*, v. 18, n. 12, p. 1716-1722, 2016.

DOI, André Mario et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. *PloS one*, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.

DUPONT, Bertrand. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 49, n. 1, p. 31-36, 2002.

EDMISTON, Charles E. et al. Clinical and microbiological aspects of biofilm-associated surgical site infections. In: *Biofilm-Based Healthcare-Associated Infections*. Springer, Cham, 2015. p. 47-67.

EGGIMANN, Philippe; GARBINO, Jorge; PITTET, Didier. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet infectious diseases*, v. 3, n. 11, p. 685-702, 2003.

EKREN, Pervin Korkmaz et al. Evaluation of the 2016 Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Guideline Criteria for Risk of Multidrug-Resistant

Pathogens in Patients with Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia in the ICU. *American journal of respiratory and critical care medicine*, v. 197, n. 6, p. 826-830, 2018.

FILIPPIN, Fabíola Branco; SOUZA, Liliete Canes. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI Broth Microdilution, and Etest method. *J Clin Microbiol*, 2015.

FOURIE, Ruan et al. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interaction, with focus on the role of eicosanoids. *Frontiers in physiology*, v. 7, p. 64, 2016.

GAUFIN, Thaidra; TOBIN, Nicole H.; ALDROVANDI, Grace M. The importance of the microbiome in pediatrics and pediatric infectious diseases. *Current opinion in pediatrics*, v. 30, n. 1, p. 117-124, 2018.

GIAMARELLOU, Helen; ANTONIADOU, Anastasia. Antipseudomonal antibiotics. *Medical Clinics of North America*, v. 85, n. 1, p. 19-42, 2001.

GIL, Natalia F. et al. Vaginal lactobacilli as potential probiotics against *Candida* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, n. 1, p. 6-14, 2010.

GIOLO, Muriel Padovani; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GOEMAERE, Berdieke et al. Clonal spread in *Candida glabrata* bloodstream isolates and fluconazole resistance affected by prolonged exposure: a 12-year single-center study in Belgium. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. AAC. 00591-18, 2018.

GOMPELMAN, Michelle; VAN ASTEN, Suzanne AV; PETERS, Edgar JG. Update on the Role of Infection and Biofilms in Wound Healing: Pathophysiology and Treatment. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 138, n. 3S, p. 61S-70S, 2016.

GULATI, Megha; NOBILE, Clarissa J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, v. 18, n. 5, p. 310-321, 2016.

GUPTA, A. K.; KOHU, Y.; BATRA, R. In vitro activities of posaconazole, ravuconazole, terbinafine, itraconazole and fluconazole against dermatophyte, yeast and non-dermatophyte species. *Med. Mycology*, 43: 179–185, 2005.

HARRIOTT, Melpine M.; NOVERR, Mairi C. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends in microbiology*, v. 19, n. 11, p. 557-563, 2011.

HUYNH, H. T. et al. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. *Clinical Infectious Diseases*, v. 66, n. 7, p. iii-iv, 2018.

HUYNH, H. T. et al. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. *Clinical Infectious Diseases*, v. 66, n. 7, p. iii-iv, 2018.

IBRAHIM, Omer et al. Filler nodules: inflammatory or infectious? A review of biofilms and their implications on clinical practice. *Dermatologic Surgery*, v. 44, n. 1, p. 53-60, 2018.

JACOBSEN, Ilse D. et al. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert review of anti-infective therapy*, v. 10, n. 1, p. 85-93, 2012.

JANUS, M. M. et al. *Candida albicans* alters the bacterial microbiome of early in vitro oral biofilms. *Journal of oral microbiology*, v. 9, n. 1, p. 1270613, 2017.

KARKOWSKA-KULETA, Justyna et al. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*, v. 56, n. 2, p. 211, 2009

KARTSONIS, Nicholas A.; NIELSEN, Jennifer; DOUGLAS, Cameron M. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. *Drug Resistance Updates*, v. 6, n. 4, p. 197-218, 2003.

KATHURIA, Shallu et al. Multidrug-resistant *Candida auris* misidentified as *Candida haemulonii*: characterization by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI broth microdilution, and Etest method. *Journal of clinical microbiology*, v. 53, n. 6, p. 1823-1830, 2015.

KAUFFMAN, Carol A. et al. (Ed.). *Essentials of clinical mycology*. New York: Springer, 2011.

KELLER, Laurent; SURETTE, Michael G. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, n. 4, p. 249, 2006.

KHAN, Mohd Sajjad Ahmad et al. Virulence and pathogenicity of fungal pathogens with special reference to *Candida albicans*. In: *Combating Fungal Infections*. Springer Berlin Heidelberg, p. 21-45, 2010

KHAN, Mohd Sajjad Ahmad; AHMAD, Iqbal; CAMEOTRA, Swaranjit Singh. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. *Amb Express*, v. 3, n. 1, p. 54, 2013.

KHAN, Zia U. et al. Outbreak of fungemia among neonates caused by *Candida haemulonii* resistant to amphotericin B, itraconazole, and fluconazole. *Journal of clinical microbiology*, v. 45, n. 6, p. 2025-2027, 2007.

KLOTZ, Stephen A. et al. Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 59, n. 4, p. 401-406, 2007.

KUHN, D. M. et al. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 46, n. 6, p. 1773-1780, 2002.

KUMAR, Anuj. A fungus among us: The emerging opportunistic pathogen *Candida tropicalis* and PKA signaling. *Virulence*, v. 9, n. 1, p. 659-661, 2018.

KWA, Andrea LH et al. Pharmacokinetics of polymyxin B1 in patients with multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 60, n. 2, p. 163-167, 2008.

LEWIS, J. S.; PATTERSON, T. F. Development of caspofungin resistance following

LIU, Tao et al. A polymyxin B–silver nanoparticle colloidal system and the application of lipopolysaccharide analysis. *Analyst*, v. 143, n. 5, p. 1053-1058, 2018.

LOHSE, Matthew B. et al. Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 1, p. 19, 2018.

MAERTENS, J.A. History of the development of azole derivatives. *Clin. Microbiol. Infect.*, 10: 1-10, 2004.

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.

MARCOS-ZAMBRANO, Laura Judith et al. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 304, n. 8, p. 1192-1198, 2014.

MARIO, Débora Alves Nunes et al. Atividade Das Equinocandinas, Anfotericina Be Voriconazol Frente A Isolados De *Candida Glabrata* Sensíveis E Resistentes Ao Fluconazol. 2012.

MARRA, Alexandre R. et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Journal of clinical microbiology*, v. 49, n. 5, p. 1866-1871, 2011

MARTINS, Willames MBS et al. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 clone recovered from microbiota of migratory birds. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 90, n. 3, p. 221-227, 2018.

MATILDE, Filipa Alexandra Veiga. *Candida glabrata* um patógeno emergente? Tese de Doutorado, 2014.

MISTRO, Sóstenes et al. Cost-effectiveness of caspofungin versus liposomal amphotericin B in the treatment of systemic fungal infections: a systematic review of economic analyses. *Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research*, v. 16, n. 4, p. 465-473, 2016.

MOREIRA, MIMCG. *Azóis: farmacologia e interações medicamentosas*. Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2010.

MORETTI, Maria Luiza et al. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. *Medical mycology*, v. 51, n. 3, p. 225-230, 2013.

MOYES, David L. et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*, v. 532, n. 7597, p. 64, 2016.

NATION, Roger L. et al. Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. *The Lancet infectious diseases*, v. 15, n. 2, p. 225-234, 2015.

NAVES, Plínio Lázaro Faleiro et al. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 12, n. 2, p. 229-233, 2013.

NETT, Jeniel E. et al. Rat indwelling urinary catheter model of *Candida albicans* biofilm infection. *Infection and immunity*, v. 82, n. 12, p. 4931-4940, 2014.

NSEIR, Saad et al. Impact of antifungal treatment on *Candida*–*Pseudomonas* interaction: a preliminary retrospective case–control study. *Intensive care medicine*, v. 33, n. 1, p. 137-142, 2007.

NUCCI, Marcio et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PloS one*, v. 8, n. 3, p. e59373, 2013.

O'BRIEN, Siobhán; FOTHERGILL, Joanne L. The role of multispecies social interactions in shaping *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in the cystic fibrosis lung. *FEMS microbiology letters*, v. 364, n. 15, p. fnx128, 2017.

OGITA, Akira et al. Synergistic fungicidal activities of polymyxin B and ionophores, and their dependence on direct disruptive action of polymyxin B on fungal vacuole. *The Journal of antibiotics*, v. 62, n. 2, p. 81, 2009.

PAPPAS, Peter G. et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, p. civ933, 2015.

PASQUALOTTO, A. C.; DENNING, D. W. New and emerging treatments for fungal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, n. suppl_1, p. i19-i30, 2008.

PELEG, Anton Y.; HOGAN, Deborah A.; MYLONAKIS, Eleftherios. Medically important bacterial–fungal interactions. *Nature reviews microbiology*, v. 8, n. 5, p. 340, 2010.

PEREIRA, Graziella H. et al. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans* *Candida* species. *Sabouraudia*, v. 48, n. 6, p. 839-842, 2010.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, Gael et al. Agent-based model of diffusion of N-acyl homoserine lactones in a multicellular environment of *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *Biofouling*, v. 34, n. 3, p. 335-345, 2018.

PERLIN, David S. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. *Annals of the new York Academy of Sciences*, v. 1354, n. 1, p. 1-11, 2015.

PERLIN, David S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina; ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 12, p. e383-e392, 2017.

PETERS, B. M. et al. *Staphylococcus aureus* adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. *Microbiology* 158, 2975–2986 (2012).

PFALLER, Michael A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American journal of medicine*, v. 125, n. 1, p. S3-S13, 2012.

PICÃO, RENATA CRISTINA. Estudo das β -lactamases envolvidas na resistência às cefalosporinas de amplo espectro em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. 2009. Tese de Doutorado. Tese, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo 122 pp.

PIGATTO, Maiara Cássia; UCHOA, F. T.; COSTA, T. D. Farmacocinética dos novos antifúngicos de uso sistêmico utilizados em pacientes imunocomprometidos. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 90, p. 86-94, 2009.

RAMAGE G, RAJENDRAN R, SHERRY L, WILLIAMS C. Fungal biofilm resistance. *International Journal of Microbiology*, v. 2012, p. 14, 2012.

REX, John H. et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clinical microbiology reviews*, v. 14, n. 4, p. 643-658, 2001.

RODRIGUES, Maria E. et al. Polymicrobial ventilator-associated pneumonia: fighting in vitro *Candida albicans*-*Pseudomonas aeruginosa* biofilms with antifungal-antibacterial combination therapy. *PloS one*, v. 12, n. 1, p. e0170433, 2017.

ROEDER, Beate et al. Photodynamic Inhibition of Biofilm Forming Microorganisms on Surfaces. In: Meeting Abstracts. The Electrochemical Society, 2018. p. 1008-1008.

RYBTKE, Morten et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. *Journal of molecular biology*, v. 427, n. 23, p. 3628-3645, 2015

SABO, J.A.; ABDEL-RAHMAN, S.M. Voriconazole: a new triazole antifungal. *Ann. Pharmacother.*, v.34, p. 1032-1043, 2000.

SABOL, K. & GUMBO, T. Anidulafungin in the treatment of invasive fungal infections. *Ther. Clin. Risk. Manag.*, 4(1): 71-78, 2008.

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, n. 1, p. 10-24, 2013.

SCHLECHT, L. M. et al. Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. *Microbiology* 161, 168–181 (2015).

SHCHEPIN, Roman et al. Quorum sensing in *Candida albicans*: probing farnesol's mode of action with 40 natural and synthetic farnesol analogs. *Chemistry & biology*, v. 10, n. 8, p. 743-750, 2003.

SIDRIM, José Júlio Costa; ROCHA, Marcos Fábio Gadelha. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Guanabara Koogan, 2004.

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.

STAN, Catalina Daniela; TUCHILUS, Cristina; STAN, C. I. Echinocandins-new antifungal agents. *The Medical-Surgical Journal*, v. 118, n. 2, p. 528-536, 2014.

STRUS, Magdalena et al. The in vitro activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, v. 13, n. 2, p. 69-75, 2005.

SUN, Fengjun et al. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. *Future microbiology*, v. 8, n. 7, p. 877-886, 2013.

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

THOMPSON, G. R.; WIEDERHOLD, N. P.; VALLOR, A. C.; VILLAREAL, N. C.;

TRAN, Thien B. et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and polymyxin B: are we there yet?. *International journal of antimicrobial agents*, v. 48, n. 6, p. 592-597, 2016.

TREJO-HERNANDEZ, Abigail., Andre's Andrade-Domínguez¹., Magdalena Herna'ndez.,Sergio Encarnación. Interspecies competition triggers virulence and mutability in *Candida albicans*–*Pseudomonas aeruginosa* mixed biofilms. *The ISME Journal*, v. 8, p. 1974–1988, 2014.

TURNER SA, BUTLER G. The *Candida* Pathogenic Species Complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 4, p. 1-18, 2014.

UPPULURI, Priya et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS pathogens*, v. 6, n. 3, p. e1000828, 2010.

VALES EC, Abaira V, et al (2002) A predictive model for mortality of bloodstream infections. Bedside analysis with the Weibull function. *J Clin Epidemiol* 55:563–572.

VALLABHANENI, Snigdha et al. Epidemiology and risk factors for echinocandin nonsusceptible *Candida glabrata* bloodstream infections: data from a large multisite population-based candidemia surveillance program, 2008–2014. In: *Open forum infectious diseases*. Oxford University Press, 2015.

VAZQUEZ, J.A. & SOBEL, J.D. Anidulafungin: A Novel Echinocandin. *Clin. Infect. Dis.*, 43(2): 215-222, 2006.

WATERS, Braden; MUSCEDERE, John. A 2015 update on ventilator-associated pneumonia: new insights on its prevention, diagnosis, and treatment. *Current infectious disease reports*, v. 17, n. 8, p. 41, 2015.

WISPLINGHOFF, Hilmar et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical infectious diseases*, v. 39, n. 3, p. 309-317, 2004.

ZABAWA, Thomas P. et al. Treatment of Gram-negative bacterial infections by potentiation of antibiotics. *Current opinion in microbiology*, v. 33, p. 7-12, 2016.

ZAVASCKI, Alexandre P. et al. Pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients. *Clinical infectious diseases*, v. 47, n. 10, p. 1298-1304, 2008.

ZAVASCKI, Alexandre Prehn et al. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 60, n. 6, p. 1206-1215, 2007.

ZEIDLER, Ute et al. Synergy of the antibiotic colistin with echinocandin antifungals in *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, n. 6, p. 1285-1296, 2013.

ZHAI, Bing et al. Polymyxin B, in combination with fluconazole, exerts a potent fungicidal effect. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, n. 5, p. 931-938, 2010.

ZHAO, Kelei et al. *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-sensing and Type VI Secretion System Can Direct Interspecific Coexistence during Evolution. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 2287, 2018.