

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.

112 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

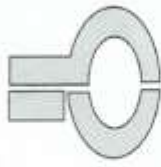
Luciana Fernandes dos Santos

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 *Candida* spp. dividida em quatro etapas: aderência, proliferação, maturação e dispersão **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2.** Estrutura química da Anfotericina B **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3.** Estrutura química dos agentes triazólicos (Fluconazol e Voriconazol)..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4.** Estrutura química da caspofungina **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5.** Estrutura química da micafungina **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6.** Estrutura química da anidulafungina. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 7.** Estrutura química da Polimixina B **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 8.** Distribuição das concentrações finais dos antimicrobianos nos poços da microplaca de 96 poços. CP **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 9.** Cinética da formação dos biofilmes monomicrobianos de *C. albicans* SC5314 e *P. aeruginosa* PAO1 sob agitação orbital a 150 RPM e sem agitação a 37 °C por 96h de incubação..... **Erro! Indicador não definido.**
- 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..... **Erro! Indicador não definido.**
- 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..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 12.** Cinética de formação de biofilmes polimicrobianos de *Candida albicans* SC5314 e *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 utilizando três diferentes estratégias**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 13.** Efeito da caspofungina sobre a viabilidade das células dos biofilmes polimicrobianos formados em 24h pelo isolado *P. aeruginosa* 151 com diferentes espécies de *Candida*.. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 14.** Efeito da Polimixina B sobre a viabilidade das células dos biofilmes polimicrobianos formados em 24h pelo isolado *P. aeruginosa* 151 com diferentes espécies de *Candida* **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cepas de *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas neste trabalho.
..... **Erro! Indicador não definido.**

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)..... **Erro! Indicador não definido.**

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

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

Tabela 5. Perfil de suscetibilidade das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aos antibióticos de uso clínico..... **Erro! Indicador não definido.**

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

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

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

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	Caspofungina
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</i> coagulase negativa
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	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	Erro! Indicador não definido.
2.1 O gênero <i>Candida</i>	Erro! Indicador não definido.
2.1.1 Descrição geral	Erro! Indicador não definido.
2.1.2 Epidemiologia	Erro! Indicador não definido.
2.1.3 Candidíase invasiva	Erro! Indicador não definido.
2.1.6 Agentes antifúngicos	Erro! Indicador não definido.
2.1.6.1 Agentes poliênicos	Erro! Indicador não definido.
2.1.6.2 Agentes azólicos	Erro! Indicador não definido.
2.1.6.3 Equinocandinas	Erro! Indicador não definido.
2.1.6.4 Caspofungina	Erro! Indicador não definido.
2.1.6.5 Micafungina	Erro! Indicador não definido.
2.1.6.6 Anidulafungina	Erro! Indicador não definido.
2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Erro! Indicador não definido.
2.2.1 Epidemiologia	Erro! Indicador não definido.
2.2.2 Fatores de virulência em <i>P. aeruginosa</i>	Erro! Indicador não definido.
2.2.3 Biofilmes de <i>P. aeruginosa</i>	Erro! Indicador não definido.
2.2.4 Agentes antipseudomonas	Erro! Indicador não definido.

2.3	Biofilmes Polimicrobianos.....	Erro! Indicador não definido.
2.3.1	Biofilmes polimicrobianos de <i>Candida</i> spp. e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Erro! Indicador não definido.
2.3.2	Interação entre <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> em biofilmes polimicrobianos	Erro! Indicador não definido.
2.3.2.1	O papel das moléculas de QS de <i>P. aeruginosa</i> em biofilmes polimicrobianos.....	Erro! Indicador não definido.
2.3.2.2	O papel das moléculas de QS de <i>Candida albicans</i> em biofilmes polimicrobianos.....	Erro! Indicador não definido.
2.3.3	É possível uma monoterapia das infecções polimicrobianas por <i>Candida</i> spp. e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ?	Erro! Indicador não definido.
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo geral.....	26
3.2	Objetivos específicos	26
3.2.1	Obter o perfil de suscetibilidade antimicrobiana de células planctônicas de <i>Candida</i> spp. e de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
3.2.2	Padronizar biofilmes monomicrobianos e mistos de <i>Candida</i> spp. e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
3.2.3	Avaliar o efeito das equinocandinas em biofilmes monomicrobianos e mistos de <i>Candida</i> spp. e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
4.1	Micro-organismos	Erro! Indicador não definido.
4.2	Condições de cultivo e estocagem das cepas de <i>Candida</i> spp.	Erro! Indicador não definido.
4.3	Condições de cultivo e estocagem das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Erro! Indicador não definido.
4.4	Teste de suscetibilidade aos antibacterianos pelo método de disco-difusão .	Erro! Indicador não definido.

- 4.5 Determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos sobre células planctônicas (CIM-P) pelo método de microdiluição em caldo . Erro! Indicador não definido.
- 4.6 Determinação da concentração fungicida/bactericida mínima (CFM e CBM) Erro! Indicador não definido.
- 4.7 Padronização dos inóculos de *Candida* spp. para a produção dos biofilmes Erro! Indicador não definido.
- 4.8 Cinética da produção dos biofilmes de *Candida* spp. Erro! Indicador não definido.
- 4.9 Padronização dos inóculos de *Pseudomonas aeruginosa* para a produção dos biofilmes..... Erro! Indicador não definido.
- 4.10 Cinética da produção dos biofilmes monomicrobianos de *P. aeruginosa* . Erro! Indicador não definido.
- 4.11 Padronização dos biofilmes polimicrobianos de *Candida* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* Erro! Indicador não definido.
- 4.12 Testes de suscetibilidade dos biofilmes mono e polimicrobianos de *Candida* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos..... Erro! Indicador não definido.
- 4.13 Quantificação dos biofilmes Erro! Indicador não definido.
- 4.13.1 Avaliação da viabilidade celular nos biofilmes mistos ... Erro! Indicador não definido.
- 4.13.2 Ensaio de coloração com Cristal Violeta (CV) Erro! Indicador não definido.
- 4.14 Classificação da capacidade de formação de biofilme Erro! Indicador não definido.
- 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO Erro! Indicador não definido.
- 5.1 Suscetibilidade das células planctônicas de *Candida* spp. aos antifúngicos.. Erro! Indicador não definido.
- 5.2 Suscetibilidade das células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos Erro! Indicador não definido.
- 5.3 Determinação da CIM dos antimicrobianos frente às células planctônicas de *P. aeruginosa*..... Erro! Indicador não definido.

5.4	Cinética da formação os biofilmes monomicrobianos de <i>Candida</i> spp. e <i>P. aeruginosa</i> em diferentes estratégias de incubação	Erro! Indicador não definido.
5.5	Cinética da formação os biofilmes monomicrobianos de <i>Candida</i> spp. e <i>P. aeruginosa</i> sob agitação.....	Erro! Indicador não definido.
5.6	Cinética da formação os biofilmes polimicrobianos de <i>Candida</i> spp. e <i>P. aeruginosa</i> sob agitação.....	Erro! Indicador não definido.
5.7	Suscetibilidade dos biofilmes monomicrobianos de <i>Candida</i> spp. e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Erro! Indicador não definido.
5.8	Suscetibilidade dos biofilmes polimicrobianos de <i>Candida</i> spp. e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Erro! Indicador não definido.
6	CONCLUSÕES.....	26

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 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 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.

5 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 It's 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, Melphine 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 microcalorimetry. *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 Hernández.,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, Abraira 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.