

GABY SOARES SCHEUNEMANN

**Caspofungina no tratamento de infecção mista por *Candida albicans* e
*Staphylococcus aureus***

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

2020

GABY SOARES SCHEUNEMANN

**Caspofungina no tratamento de infecção mista por *Candida albicans* e
*Staphylococcus aureus***

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 corrigida

São Paulo

São Paulo

2020

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)

Scheunemann, Gaby
Caspofungina no tratamento de infecção mista por
Candida albicans e Staphylococcus aureus / Gaby
Scheunemann; orientadora Kelly Ishida. -- São
Paulo, 2020.
117 p.

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

1. Biofilme. 2. Candida albicans. 3.
Staphylococcus aureus . 4. Caspofungina. 5.
Galleria mellonella. I. Ishida, Kelly, orientador.
II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gaby Soares Scheunemann

Título da Dissertação: Caspofungina no tratamento de infecção mista por
Candida albicans e *Staphylococcus aureus*

Orientador: Prof. Dra. Kelly Ishida

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:



Declaro, para os devidos fins, que

Gaby Scheunemann

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

São Paulo, 22 novembro 2018
(Declaração válida por 5 anos)

Profa. Dra. Katiucia Batista da Silva Paiva
Presidente da Comissão de Resíduos Químicos

Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira
Diretor do ICB

Declaração de participação do curso
Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório do ICB



Declaramos para os devidos fins que

Gaby Scheunemann

participou do Curso "Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório do ICB", realizado pela Comissão Interna de Biossegurança do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com carga horária total de 6 horas.

São Paulo, 22 novembro 2018
Comissão Interna de Biossegurança
ICB USP



**Uso de animais
para experimentação**



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que

Gaby Scheunemann

participou do Curso “Uso de Animais em Experimentação” com carga horária total de 10 horas, em formato ensino a distância, realizado pela Comissão de Biotérios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 22 novembro 2018
Comissão de Biotérios
ICB USP




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


Decl. CEP.09.2020

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado de Isenção CEP nº 912/2017, aprovado em 27/09/2017, e por solicitação da Profa. Dra. *Kelly Ishida*, do Departamento de Microbiologia - ICB USP, informamos que o título do projeto da aluna: *Gaby Soares Scheunemann* foi alterado para: "Caspofungina no tratamento de infecção mista por *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*", para melhor adequação do título ao projeto desenvolvido.

São Paulo, 24 de agosto de 2020.


Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora CEUA ICB/USP


Profa. Dra. Camila Squarzoní Dale
Coordenadora CEP SH ICB/USP





Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB-18 - 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 **912/2017** referente ao projeto intitulado: **"Monoterapia com caspofungina para o controle de infecções associadas a biofilmes polimicrobianos de *Candida albicans*"** sob a responsabilidade de **Gaby Soares Scheunemann** 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, 27 de setembro de 2017.


Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP


Profa. Dra. **Camila Squarzon Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

“Poderia, por gentileza, me dizer para onde devo ir?”
“Isso depende de aonde quer chegar, respondeu o Gato”.
“Tanto faz...”, disse Alice. “Então, qualquer caminho serve”.
“... desde que eu chegue a algum lugar”, explicou Alice.
“Chegará longe, com certeza”, respondeu o Gato, “contanto que caminhe bastante”.

Alice no País das Maravilhas – Lewis Carroll (1864)

Agradecimentos

Início os agradecimentos citando duas pessoas muito especiais e que sem elas este trabalho não seria possível. Meu companheiro Higo Soares que desde o primeiro momento em que decidi começar esta jornada, me apoiou e sempre me incentivou a buscar novos conhecimentos e compartilhou comigo todas as etapas deste projeto, sendo elas boas ou ruins.

A segunda pessoa é minha orientadora Profa. Dra. Kelly Ishida. No primeiro dia em que entrei na sala dela procurando informações sobre o projeto e laboratório, me acolheu, não somente como uma aluna, mas soube olhar para mim e para a pessoa que sou. Mesmo não precisando, escutou minhas angústias, dúvidas sobre o futuro e compartilhou comigo momentos difíceis de minha vida, sempre com muita compreensão e carinho. Muito obrigada por estes momentos, pelos nossos cafés, conversas leves e principalmente pela confiança em mim depositada no desenvolvimento de vários projetos acadêmicos e de divulgação da ciência.

Agradeço os meus pais Edneide Neres Matos e Luiz Scheunemann pelos ensinamentos, preocupação e por sempre com muito amor me mostrarem o caminho certo.

Aos meus irmãos Ana Eloiza e Douglas Scheunemann pelas risadas e momentos bons vividos.

A todos meus amigos do Laboratório de Quimioterapia Antifúngica (LQA) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB): Thayná Barreto, Vinícius de Moraes Barroso, Luciana Fernandes, Lucas Dias, Cristina Spadari, Fernanda Walt, Luiza Capello, Amanda Roberta Paiva, Aline Luiza Duarte de Freitas e Pietro Pisani, por todos os momentos bons, risadas, cafés, e até mesmo por aturarem minhas reclamações. Vocês tornaram esta etapa da minha vida muito mais leve e podem ter certeza que levarei estes momentos sempre comigo. Sentirei saudades!

Às técnicas do Laboratório de Quimioterapia Antifúngica, Zita Maria Gregório e Marcela Gonçalves pela dedicação ao laboratório, contribuindo com a organização e rotina do LQA.

Em especial a minha amiga de vida e “filha” Bruna Nakanishi, que esteve comigo em todos os momentos deste mestrado, sempre me apoiando e rindo dos problemas ao meu lado.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Galhardo e sua aluna Marina Fonseca, por abrirem as portas de seu laboratório e dividirem comigo seu conhecimento.

À Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira pela confiança no desenvolvimento do projeto “Adote um Microrganismo”, gerando muito conhecimento e crescimento pessoal e profissional.

Ao Ariosvaldo Pereira e a Profa. Dra. Aline Maria da Silva pela valiosa parceria.

Aos funcionários Gisele Santana e Renato de Oliveira da Secretaria de Pós-Graduação da Microbiologia (ICB-II, USP).

AGRADECIMENTO À INSTITUIÇÃO DE FOMENTO

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 88882.333035/2019-01; Curso: Ciências Biológicas (Microbiologia); Modalidade: Mestrado-ME; Vigência: de 02/2018 a 02/2020.

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

RESUMO

SCHEUNEMANN, G. Caspofungina no tratamento de infecção mista por *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* 2020, 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Candida albicans e *Staphylococcus aureus* são responsáveis por elevado número de infecções, e a coexistência é frequentemente relatada. As infecções polimicrobianas têm implicações na seleção da terapia especialmente quando estão associadas a formação de biofilmes. Dessa forma, o objetivo principal deste trabalho é avaliar o efeito da caspofungina sobre biofilmes polimicrobianos de *C. albicans* e *S. aureus* e na infecção mista no modelo larvário de *Galleria mellonella*. Para isso, foi estabelecido o perfil de suscetibilidade antimicrobiana sobre forma planctônica de *Candida* spp. (n=3) e *Staphylococcus aureus* (n=5). *Candida albicans* (SC 5314 e IAL-40) e *Candida glabrata* foram sensíveis à anfotericina B (AMB), voriconazol (VRC) e às equinocandinas testadas (caspofungina – CAS e micafungina – MFG); entretanto, *C. albicans* IAL-40 foi considerada resistente ao fluconazol (FLC). Todas as cepas de *S. aureus* foram suscetíveis à vancomicina (VCM), 3 foram considerados multirresistentes aos antibacterianos, e outros 2 suscetíveis. A CAS apresentou atividade inibitória sobre *S. aureus* em concentrações a partir de 8 µg/mL, e apresentou atividade bactericida, enquanto a MFG não inibiu o crescimento bacteriano. Em modelo de *Galleria mellonella*, a virulência de *Candida* spp. e *S. aureus* foi avaliada. *S. aureus* ATCC 29213 foi a mais virulenta, seguida por ATCC 33591, ATCC 43300, ST 5 e ATCC 6538; e para os fungos, *C. albicans* SC5314 e IAL-40 exibiram maior virulência enquanto *C. glabrata* foi pouco virulenta. Todas as cepas de bactérias e fungos conseguiram formar biofilmes em meio RPMI; e a interação de *Candida* spp. e *S. aureus* também levou a formação de um robusto biofilme. Assim, os biofilmes mono- e polimicrobianos de *S. aureus* e *C. albicans*, em formação (após 1,5h de aderência) e pré-formado (após 24 h de formação), foram tratados com os antimicrobianos CAS, MFG, AMB e VCM. Os biofilmes pré-formados foram mais tolerantes aos antimicrobianos quando comparados com os biofilmes em formação. Para os biofilmes monomicrobianos de *S. aureus* a inibição ocorreu a partir de 0,125 até 32 µg/mL, e para *C. albicans* a inibição ocorreu a partir de 0,125 até 4 µg/mL quando tratados com CAS e AMB, ambos no período de 1,5h e 24h. Dentre os antimicrobianos, CAS e MFG foram eficazes para tratamento dos biofilmes polimicrobianos em formação e pré-formados a partir de 16 µg/mL, enquanto AMB inibiu a partir de 32 µg/mL. Embora CAS tenha reduzido drasticamente a biomassa total dos biofilmes mono- e polimicrobianos, a viabilidade celular foi reduzida significativamente a partir de 32 µg/mL e 128 µg/mL, respectivamente. Em modelo de infecção em *G. mellonella*, doses acima de 10 mg/kg de MFG ou de CAS protegeram mais de 80% das larvas infectadas com *C. albicans*, confirmando a eficácia antifúngica das equinocandinas. Contudo, 50 mg/kg de CAS não foi capaz de controlar a infecção monomicrobiana de *S. aureus*. Tratamento de infecções polimicrobianas de *C. albicans* com *S. aureus* com doses de 20 e 50mg/kg de CAS resultaram no aumento significativo da taxa de sobrevivência de larvas coinfetadas com *C. albicans* e ATCC 6538 ou ATCC 33591, além de reduzir significativamente a carga bacteriana e fúngica nos tecidos larvários na dose de 50mg/kg. Adicionalmente, o tratamento com CAS aumentou a formação de granulomas microbianos e reduziu a disseminação da infecção. Nossos resultados indicam que a CAS possa ser uma alternativa no tratamento das infecções mistas de *C. albicans* e *S. aureus* relacionada com biofilmes.

Palavras-chave: Biofilme; *Candida albicans*; Caspofungina; *Galleria mellonella*; Infecção polimicrobiana; Resistência; *Staphylococcus aureus*.

Abstract

SCHEUNEMANN, G. Caspofungin in the treatment of mixed infection by *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. 2020 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) –Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Candida albicans and *Staphylococcus aureus* are responsible for a high number of infections, and coexistence is often reported. Polymicrobial infections have implications for the selection of therapy especially when they are associated with the biofilm formation. Thus, the aim of this work is to evaluate the effect of caspofungin on polymicrobial biofilms of *C. albicans* and *S. aureus* and on mixed infection in the larvae model of *Galleria mellonella*. For this, the antimicrobial susceptibility profile of planktonic cells of *Candida* spp. (n = 3) and *Staphylococcus aureus* (n = 5) was evaluated. *Candida albicans* (SC 5314 and IAL-40) and *Candida glabrata* were susceptible to amphotericin B (AMB), voriconazole (VRC) and the tested echinocandins (caspofungin - CAS and micafungin - MFG); however, *C. albicans* IAL-40 was considered resistant to fluconazole (FLC). All *S. aureus* strains were susceptible to vancomycin (VCM), 3 were considered multidrug-resistant to antibacterials, and 2 others were susceptible. CAS showed inhibitory activity on *S. aureus* at concentrations $\geq 8 \mu\text{g/mL}$, and bactericidal activity, while MFG did not inhibit the bacterial growth. The virulence of *Candida* spp. and *S. aureus* was evaluated using *Galleria mellonella* model. *S. aureus* ATCC 29213 was the most virulent, followed by ATCC 33591, ATCC 43300, ST 5 and ATCC 6538; and for fungi *C. albicans* SC5314 and IAL-40, they exhibited greater virulence while *C. glabrata* was less virulent. All strains of bacteria and fungi were able to form biofilms in RPMI medium; and the interaction of *Candida* spp. and *S. aureus* also led to the formation of a robust biofilm. Thus, the mono- and polymicrobial biofilms of *S. aureus* and *C. albicans*, in formation (after 1.5 h of adhesion) and preformed (after 24 h of formation), were treated with the antimicrobials CAS, MFG, AMB and VCM. Preformed biofilms were more tolerant to antimicrobials when compared to biofilms in formation. For *S. aureus* monomicrobial biofilms, the inhibition occurred from 0.125 to 32 $\mu\text{g/mL}$ and for *C. albicans*, the inhibition occurred from 0.125 to 4 $\mu\text{g/mL}$ when treated with CAS and AMB, both in the period of 1.5h and 24h. Among the antimicrobials, CAS and MFG were effective for treating preformed and in formation polymicrobial biofilms at concentrations $\geq 16 \mu\text{g/mL}$, while AMB inhibited at $\geq 32 \mu\text{g/mL}$. Although CAS has drastically reduced the total biomass of mono- and polymicrobial biofilms, cell viability has been significantly reduced at $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ and 128 $\mu\text{g/mL}$, respectively. In a *G. mellonella* infection model, doses above 10 mg/kg of MFG or CAS protected more than 80% of larvae infected with *C. albicans*, confirming the antifungal efficacy of echinocandins. However, 50 mg/kg of CAS was not able to control *S. aureus* monomicrobial infection. Treatment of polymicrobial infections of *C. albicans* with *S. aureus* with doses of 20 and 50 mg/kg of CAS resulted in a significant increase in the survival rate of larvae coinfecting with *C. albicans* and *S. aureus* (ATCC 6538 or ATCC 33591), in addition to a significant reduction of the bacterial and fungal burden in the larval tissues at a dose of 50 mg/kg. Additionally, treatment with CAS increased the formation of microbial granulomas and reduced the spread of infection. Our results indicate that CAS may be an alternative in the treatment of mixed infections of *C. albicans* and *S. aureus* related to biofilms.

Key words: Biofilm; *Candida albicans*; Caspofungin; *Galleria mellonella*; Polymicrobial infection; Resistance; *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de formação de biofilmes polimicrobianos.....38
- Figura 2.** Esquema de biofilme misto formado por *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.39
- Figura 3.** Representação esquemática da infecção e tratamento do modelo de invertebrado *Galleria mellonella*.61
- Figura 4.** Representação esquemática das etapas experimentais para o desenvolvimento da dissertação de mestrado intitulada “Caspofungina no tratamento de infecção mista por *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*”.....63
- Figura 5.** Curvas de sobrevivência (A) e de morbidade (B) de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com leveduras de *Candida albicans* SC5314 ou *Candida glabrata* ATCC 2001.....70
- Figura 6.** Curvas de sobrevivência (A) e de morbidade (B) de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Staphylococcus aureus*.72
- Figura 7.** Cinética da formação de biofilmes monomicrobianos de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* em meio de cultura RPMI 1640 tamponado com 0,165 M MOPS não suplementado (RPMI, Linha preta) e suplementado com 2% de glicose e 2% de NaCl (RPMI_{sup}, Linha azul) em agitação a 150 rpm a 35 °C.76
- Figura 8.** Biomassa total de biofilmes mono- e polimicrobianos de *Candida albicans* (SC5314), *Candida glabrata* (ATCC 2001) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213, ATCC 6538, ATCC 33591, ATCC 43300 e ST5).....78
- Figura 9.** Biomassa total de biofilmes mono- e polimicrobianos de *Candida albicans* (SC5314 e IAL) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213, ATCC 33591 e ATCC 6538).78
- Figura 10.** Comparação da biomassa total entre os biofilmes mono- e polimicrobianos de *Candida albicans* (SC5314) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213, ATCC 6538 e ATCC 33591) usando diferentes concentrações microbianas.....79
- Figura 11.** Biomassa total (barras pretas) e viabilidade celular (barras cinza) de biofilmes monomicrobianos de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* após o tratamento com diferentes concentrações da caspofungina durante a formação dos biofilmes.89

Figura 12. Biomassa total (barras pretas) e viabilidade celular (barras cinza e brancas) de biofilmes polimicrobianos de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* após o tratamento com diferentes concentrações da caspofungina durante a formação dos biofilmes.90

Figura 13. Curvas de sobrevivência e morbidade de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com leveduras *Candida albicans* SC5314 (5×10^5 UFC/larva) e tratadas após 30 minutos da infecção com caspofungina (CAS) ou micafungina (MFG). 94

Figura 14. Curva de sobrevivência e morbidade de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e ATCC 33591 (1×10^7 UFC/larva) e tratadas após 30 minutos da infecção com caspofungina (CAS).95

Figura 15. Curvas de sobrevivência (A, C e E) e de morbidade (B, D e F) de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com leveduras *Candida albicans* SC5314 (5×10^5 UFC/larva) e *Staphylococcus aureus* (1×10^7 UFC/larva) e tratadas após 30 minutos da infecção com caspofungina (CAS) nas doses de 20 ou 50 mg/kg.96

Figura 16. Avaliação da carga microbiana em larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Candida albicans* (SC5314) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 e ATCC 33591) e tratadas com caspofungina (50mg/kg).99

Figura 17. Cortes histopatológicos de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Candida albicans* SC 5314 sozinho e coinfectadas com *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591 e ATCC 6538) não tratadas e tratadas com caspofungina (CAS). ...102

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Cepas de *Candida* spp. e *Staphylococcus aureus* utilizadas neste trabalho.50
- Tabela 2.** Agrupamento dos agentes antimicrobianos utilizados e que são sugeridos no documento M100-S24 (CLSI, 2015b) para testes e relatórios de rotina sobre microrganismos não fastidiosos em laboratórios de microbiologia clínica.51
- Tabela 3.** Características avaliadas e pontuação atribuída para determinação da morbidade (LOH et al., 2013).54
- Tabela 4.** Análise semi-quantitativa de carga microbiana nos cortes histológicos (baseado em QUINTELLA et al., 2011).62
- Tabela 5.** Suscetibilidade de leveduras de *Candida albicans* (SC 5314 e IAL-40) e *Candida glabrata* ATCC 2001 aos antimicrobianos. Concentração Inibitória Mínima (PCIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) estão expressos em µg/mL.64
- Tabela 6.** Suscetibilidade de *Staphylococcus aureus* aos antibacterianos determinada pelo ensaio de disco-difusão.66
- Tabela 7.** Valores de concentração inibitória mínima de 50% e 90% (PCIM50 e PCIM90, respectivamente) e da concentração bactericida mínima (CBM) das equinocandinas (caspofungina – CAS e micafungina – MFG) e da vancomicina (VCM) sobre o crescimento das células planctônicas de *Staphylococcus aureus*. Resultados obtidos pela técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento M7-A10 (CLSI, 2015) e os valores de concentração estão expressos em µg/mL.67
- Tabela 8.** Inibição da formação dos biofilmes mono- e polimicrobianos das cepas de *Candida albicans* SC 5314 (10^7 e 10^8 UFC/mL) e *Staphylococcus aureus* ($1-2 \times 10^8$ e $1-2 \times 10^6$ UFC/mL) pelos antimicrobianos. Tratamento com diferentes concentrações dos antimicrobianos foi iniciado após a fase de adesão (1,5h de incubação). Os resultados estão expressos em µg/mL.85
- Tabela 9.** Inibição da formação dos biofilmes mono- e polimicrobianos das cepas de *Candida albicans* SC 5314 (10^7 e 10^6 UFC/mL) e *Staphylococcus aureus* ($1-2 \times 10^8$ e $1-2 \times 10^6$ UFC/mL). Tratamento com diferentes concentrações dos antimicrobianos foi iniciado após a fase de formação (24 h de incubação). Os resultados estão expressos em µg/mL.86

Tabela 10. Inibição do biofilme mono e polimicrobianos das cepas de *C. albicans* IAL-40 e *Staphylococcus aureus* formados a partir do inóculo 10^6 UFC/mL para ambos os microrganismos; Tempo de 1,5 e 24 h. Tratamento com diferentes concentrações dos antimicrobianos foi iniciado após a fase de adesão e formação (1,5 e 24 h de incubação respectivamente). Os resultados estão expressos em $\mu\text{g/mL}$87

Tabela 11. Análise semi-quantitativa da presença de carga microbiana e granulomas de *Candida albicans* (SC5314) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591 e ATCC 6538) em larvas de *Galleria mellonella* não tratadas e tratadas com caspofungina (CAS)101

Tabela 12. Resumo do perfil de Suscetibilidade aos antibacterianos, produção de biofilme e virulência de cepas de *Staphylococcus aureus* bem como de Suscetibilidade *in vitro* das células planctônicas e dos biofilmes mistos formados com *Candida albicans* (SC5314) a caspofungina. Destaca-se a eficácia antimicrobiana da caspofungina na coinfeção no modelo larvário de *G. mellonella* com *C. albicans* e *S. aureus*. 103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FC	5-fluorocitosina
ALS	<i>Agglutinin-like sequence</i>
AMB	Anfotericina B desoxicolato
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
ANOVA	Teste de análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASD	Agar Sabouraud dextrose
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
BCIM	Concentração inibitória mínima sobre células de biofilme
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
CA-MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> associadas à comunidade
CAS	Caspofungina
CBM	Concentração bactericida mínima
CF	<i>Fibrose cística</i>
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CMH	Caldo Müller-Hinton
CSD	Caldo Sabouraud dextrose
CV	Cristal violeta
D.O.	Densidade Ótica
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPS	Exopolissacarídeo
FLC	Fluconazol
FPP	Difosfato de farnesil
GEN	Gentamicina
H	Hora
HA-MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> associado à hospital
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
ICS	Infecção da corrente sanguínea
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Segurança

KhZ	QUILO-HERTZ
LB	Luria Bertani
MFG	Micafungina
MFS	<i>Major Facilitator</i>
MDR	<i>Multidrug Resistant</i>
MOPS	Ácido propano sulfônico 3-morfolino
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
MSSA	<i>Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PIA	poli-N-acetilglucosamina polissacarídica
PCIM	Concentração inibitória mínima sobre células planctônicas
PVL	Leucocidina Panton-Valentine
<i>agr</i>	Sistema regulador de gene acessório
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TSA	Ágar Trypticaseína de Soja
TSB	Caldo Trypticaseína de Soja
UDP-glicose	Glicose-uridina-difosfato
UEM	Universidade Estadual de Maringá
VCM	Vancomicina
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária à vancomicina
VRC	Voriconazol
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Infecções hospitalares: a problemática	23
1.2 Epidemiologia e patogênese das candidíasis	25
1.3 Agentes antifúngicos	27
1.3.1 Polienos	28
1.3.2 Azóis	29
1.3.3 Equinocandinas	30
1.4 Epidemiologia e patogênese de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
1.5 Agentes antibacterianos	33
1.6 Interações entre bactérias e fungos	35
1.7 Biofilmes polimicrobianos	36
1.8 Tratamento dos biofilmes	42
1.9 Equinocandinas no tratamento de biofilmes polimicrobianos	43
1.10 Modelo de invertebrado <i>Galleria mellonella</i>	45
2. JUSTIFICATIVA	47
3. OBJETIVOS	48
3.1 Objetivo geral	48
3.2 Objetivos específicos	48
3.2.1 Obter o perfil de suscetibilidade de células planctônicas de <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> e <i>S. aureus</i> aos antimicrobianos;	48
3.2.2 Determinar o perfil de virulência das cepas de <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> e <i>S. aureus</i> em modelo de invertebrado de <i>G. mellonella</i> ;	48
3.2.3 Avaliar os biofilmes mono- e polimicrobianos de <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i> ;	48
3.2.4 Avaliar o efeito da caspofungina e outros antimicrobianos em biofilmes mono- e polimicrobianos de <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i> ;	48
3.2.5 Avaliar o efeito antimicrobiano da caspofungina em infecções mono- e polimicrobianas por <i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i> usando o modelo de invertebrado de <i>G. mellonella</i> .	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Microrganismos	48
4.2 Condições de cultivo e estocagem das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	49
4.3 Condições de cultivo e estocagem das cepas de <i>Candida spp.</i>	49
4.4 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão	50
4.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de microdiluição em caldo sobre células planctônicas (PCIM)	51
4.5 Virulência de <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> em modelo de <i>Galleria mellonella</i>	53
4.6 Padronização do biofilme monomicrobiano de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida glabrata</i>	55
4.7 Padronização do biofilme monomicrobiano de <i>Staphylococcus aureus</i>	55
4.8 Padronização dos biofilmes polimicrobianos de <i>Candida albicans/Candida glabrata</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	56

4.9	Teste de sensibilidade dos biofilmes monomicrobianos e polimicrobianos de <i>Candida albicans</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> aos antimicrobianos	57
4.9.1	Ação dos antimicrobianos sobre a formação dos biofilmes	57
4.9.2	Ação dos antimicrobianos sobre o biofilme pré-formado	57
4.10	Quantificação da biomassa total dos biofilmes	58
4.11	Avaliação da viabilidade celular nos biofilmes mono- e polimicrobianos após a adição de antimicrobianos	58
4.12	Avaliação da eficácia das equinocandinas no controle da infecção mono- e polimicrobiana por <i>Candida albicans</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	59
4.13.	Análise da carga fúngica em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	61
4.14.	Análise histopatológica.....	61
4.15	Criação e manutenção de <i>Galleria mellonella</i>	62
4.16	Análise estatística	62
4.17	Fluxograma.....	62
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1	Suscetibilidade de <i>Candida</i> spp. aos antimicrobianos.....	63
5.2	Suscetibilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> aos antimicrobianos.....	65
5.3	Virulência de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida glabrata</i> em modelo de <i>Galleria mellonella</i>	69
5.4	Virulência de <i>Staphylococcus aureus</i> em modelo de <i>Galleria mellonella</i>	71
5.5	Padronização dos biofilmes monomicrobianos de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Candida albicans</i> em diferentes meios de cultura	73
5.6	Padronização dos biofilmes mistos de <i>Candida albicans</i> / <i>Candida glabrata</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	77
5.7	Teste de Suscetibilidade dos biofilmes monomicrobianos e polimicrobianos de <i>Candida albicans</i> e <i>S. aureus</i> aos antimicrobianos	80
5.7.1	Ação dos antimicrobianos sobre a formação dos biofilmes	80
5.7.2	Ação sobre os biofilmes pré-formados.....	81
5.8	Avaliação do efeito da caspofungina sobre a viabilidade celular e biomassa total durante a formação de biofilmes de <i>Candida albicans</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	88
5.9	Avaliação da eficácia das equinocandinas no tratamento de larvas de <i>Galleria mellonella</i> com infecção monomicrobiana ou mista por <i>Candida albicans</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	92
5.10.	Análise da carga microbiana em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	98
5.11.	Análise histopatológica.....	100
6.	CONCLUSÃO	104
7.	REFERÊNCIAS.....	106

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infecções hospitalares: a problemática

Ao longo dos últimos trinta anos, o desenvolvimento da medicina, dos procedimentos de diagnóstico, cirúrgicos, transplantes e de tratamento, levaram a um aumento drástico no número de indivíduos imunocomprometidos e que passam por períodos prolongados hospitalizados, sendo mais suscetíveis às infecções causadas por bactérias e fungos (REUNES et al., 2011). Dentre as diversas infecções, as adquiridas em ambiente hospitalar, principalmente as Infecções da Corrente Sanguínea (ICS), são importantes causas de morbidade e mortalidade (SANTE et al., 2018). Alguns fatores relacionados aos pacientes são comumente associados com ICS: doença crônica, transplantes de medula óssea e órgãos sólidos, deficiência imunológica (especialmente a neutropenia), desnutrição, administração de nutrição parenteral total, prévia ICS, longevidade e prematuridade e perda da integridade da pele (como queimaduras) (REUNES et al., 2011; SANTE et al., 2018).

As ICS podem ser de origem primária ou secundária. As infecções secundárias estão relacionadas com infecções em outros locais, tais como o trato urinário, pulmões, feridas pós-operatórias, e pele. A maioria das ICS é de origem primária, sendo associadas, em particular, a formação de biofilmes microbianos na superfície do lúmen das sondas e cateteres de acessos venosos (SANTE et al., 2018; WISPLINGHOFF et al., 2004).

Antes da década de 1980, aeróbios Gram-negativos foram os organismos predominantes associados com as ICS. Desde então, aeróbios Gram-positivos (por exemplo, estafilococos coagulase-negativos, *Staphylococcus aureus* e enterococos) e espécies de *Candida* tiveram aumento importante (WISPLINGHOFF et al., 2004). O maior papel dos cocos Gram-positivos como causas de ICS nosocomiais continua sendo um desafio para a comunidade médica mundial. Em um estudo realizado durante 3 anos em 49 hospitais nos Estados Unidos que participam do Projeto de Vigilância e Controle de Patógenos de Importância Epidemiológica de abril de 1995 a abril de 1998, os cocos Gram-positivos foram isolados em 64% dos 10.617 episódios de bacteremia nosocomial, sendo as causas mais comuns de ICS nosocomiais nessas instituições, enquanto os bacilos Gram-negativos foram isolados em 27% (EDMOND et al., 1999; KARCHMER, 2000; MARRA et al., 2011).

O programa Brazilian SCOPE (Vigilância e Controle de Patógenos de Importância Epidemiológica) disponibilizou em 2011 os dados referentes a 3 anos de análise de um estudo que incluiu um total de 2.563 pacientes com infecções nosocomiais da corrente sanguínea. Os patógenos bacterianos mais comuns encontrados foram *S. aureus* (14,0%), estafilococos coagulase-negativos (12,6%), *Klebsiella* spp. (12,0%) e *Acinetobacter* spp. (11,4%), além disso como um dado extremamente relevante os fatores potenciais que predispõem os pacientes à ICS, os cateteres venosos centrais foram os mais frequentes (70,3%) e a resistência à meticilina foi detectada em 157 isolados de *S. aureus* (43,7%) (MARRA et al., 2011).

Dentre os fungos, *Candida* é o principal patógeno causador de micoses profundas e é considerado o quarto microrganismo mais comumente isolado em ICS, sendo *Candida albicans*, a principal espécie (DA MATTA; SOUZA; COLOMBO, 2017). Estima-se que 27 % das ICS por *C. albicans* é polimicrobiana, sendo *S. aureus* um dos microrganismos comumente isolado em conjunto (KLOTZ et al., 2007). Em uma pesquisa com 372 pacientes com candidemia, as três principais espécies bacterianas coisoladas com *C. albicans* foram *S. epidermidis*, *Enterococcus* spp. e *S. aureus* (KLOTZ et al., 2007). *C. albicans* e *S. aureus* são responsáveis por elevado número de infecções de forma independente, mas há cada vez mais evidências de que podem estar comumente associados (BERNARD; GIRARDOT; IMBERT, 2019; CAROLUS; VAN DYCK; VAN DIJCK, 2019; KEAN et al., 2017; YI et al., 2013). Nos Estados Unidos, a taxa de mortalidade de pacientes diagnosticados com ICS polimicrobiana foi de 32% (WISPLINGHOFF et al., 2004); enquanto no Brasil, a mortalidade chega a 45,7% (MARRA et al., 2011). A importância das infecções polimicrobianas causadas por bactérias e fungos é cada vez mais reconhecida em contextos médicos (BERNARD; GIRARDOT; IMBERT, 2019). Estas infecções polimicrobianas, que incluem *C. albicans* e *Staphylococcus*, têm implicações na seleção da terapia antimicrobiana e na resposta prevista para o tratamento especialmente quando envolve a presença de microrganismos multirresistentes e formação de biofilmes polimicrobianos, fatores que estão frequentemente associadas a altas taxas de mortalidade (KONG et al., 2016; PETERS et al., 2010).

1.2 Epidemiologia e patogênese das candidíasis

Candida spp. são microorganismos comensais e podem ser detectados nas , nas mucosas dos tratos gastrointestinal, genitourinário e respiratório de ~ 50-70% dos indivíduos saudáveis (PAPPAS et al., 2018). Porém, podem tornar-se patogênicos quando ocorre algum desequilíbrio da microbiota local, fisiológico e imunológico do hospedeiro (PAPPAS et al., 2018). Por exemplo, quando ocorrem fissuras nas barreiras intestinais, após cirurgia gastrointestinal, comprometimento da resposta imune, ou até mesmo pelo tratamento com antibióticos de largo espectro, *Candida* spp. pode se proliferar e se disseminar diretamente para a cavidade abdominal e invadir a corrente sanguínea causando candidemia e infecções em órgãos profundos (PAPPAS et al., 2018; ROMO; KUMAMOTO, 2020).

As infecções por *Candida* podem ser classificadas como infecção superficial, podendo ser cutânea ou mucocutânea, e sistêmica (ou invasiva). Nas infecções superficiais, *Candida* spp. pode infectar a cavidade oral, pele, genitália, olhos, aparelho respiratório e o trato gastrointestinal. Já na candidíase invasiva a infecção é caracterizada por condições extremamente graves, como candidemia, meningite e endocardite (De Rosa et al., 2009). Em pacientes hospitalizados e com sistema imunológico debilitado, a infecção invasiva é uma causa significativa de morbidade e mortalidade com altas taxas de incidência e prevalência (MBA & NWEZE, 2020).

O programa SENTRY de Vigilância Antifúngica está em andamento há 20 anos (1997–2016), e tem avaliado as tendências geográficas no isolamento de várias espécies de *Candida* de amostras clínicas (PFALLER et al., 2019). Neste estudo foram avaliados 20.788 isolados invasivos de espécies de *Candida*, em 135 centros médicos, em 39 países. De acordo com os dados apresentados, as 5 espécies mais comuns variaram pouco ao longo do tempo, embora *C. albicans* fosse a espécie predominante a cada ano, seguida por *Candida glabrata* (18,7%), *Candida parapsilosis* (15,9%), *Candida tropicalis* (9,3%) e *Candida krusei* (2,8%) (PFALLER et al., 2019). Notavelmente, a frequência de *C. albicans* diminuiu constantemente de 57,4% em 1997–2001 para 46,4% em 2015–2016. Interessantemente um aumento no isolamento de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* foi observado ao longo do tempo, sendo *C. glabrata* a espécie mais comum detectada em todas as regiões geográficas, exceto na América Latina, onde *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram mais comuns, corroborando com os dados previamente observados (COLOMBO et al., 2006; DA MATTA; SOUZA;

COLOMBO, 2017; LAMOTH et al., 2018; MARRA et al., 2011). Além disso, em certas partes do mundo, um organismo anteriormente raro, *Candida auris*, emergiu como um dos principais patógenos fúngicos e representa uma ameaça global devido a sua capacidade de permanecer no ambiente hospitalar e de apresentar resistência aos antifúngicos convencionais (LAMOTH et al., 2018; PFALLER et al., 2019). É importante ressaltar que, embora *C. auris* tenha sido isolada em diversos surtos de infecção hospitalar em vários países do mundo (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2020), o Brasil reportou, em dezembro de 2020, o primeiro caso de *C. auris* na ponta de um cateter de um paciente hospitalizado na cidade de Salvador/BA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA; 2020).

A incidência de candidemia no Brasil é elevada, sendo cerca de 2 a 15 vezes superior a países como Estados Unidos, Canadá e países europeus, representando importante causa de morbidade e mortalidade além de altos custos associados (COLOMBO et al., 2006). Do ano de 2007 a 2010, *Candida* spp. foi considerada a sétima causa de ICS no Brasil (DOI et al., 2016). Assim como em outros países da América Latina, *C. albicans* (~40%) é a espécie mais frequente, seguida por *C. parapsilosis* e *tropicalis*. Entretanto, outras espécies de *Candida* não-*albicans*, vem ganhando notoriedade nestes últimos anos 20 anos como é o caso de *C. glabrata* (COLOMBO et al., 2006; DOI et al., 2016; NUCCI et al., 2013).

Além das características relacionadas com o hospedeiro, vários fatores de virulência de *Candida* spp. contribuem para o desenvolvimento das candidíases. A adesão a células epiteliais através do reconhecimento de biomoléculas (adesinas), hidrofobicidade de superfície celular, morfogênese (transição reversível da forma de levedura e filamentosa), produção de enzimas extracelulares (aspartil proteases, fosfolipases, hemolisinas e outras) contribuem para a colonização, proliferação e a disseminação do fungo (CALDERONE; FONZI, 2001; SILVA et al., 2011). Recentemente descrito pela primeira vez, uma toxina chamada candidalisina tem sido bem estudada, esta toxina secretada por *C. albicans* danifica diretamente as membranas epiteliais e lisa as células do hospedeiro, desencadeando uma via de sinalização de resposta que ativa a imunidade epitelial (DA SILVA DANTAS et al., 2016; MOYES et al., 2016).

A patogenicidade de *C. albicans* está relacionada à sua mudança entre a forma de levedura comensal e a forma filamentosa (pseudohifa/hifa) invasiva (MBA; NWEZE,

2020). As hifas são mais hábeis em aderir e penetrar no tecido do hospedeiro e, portanto, são responsáveis por infecções nas mucosas sendo mais comumente associadas a candidíase oral (ORSI et al., 2014; SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004). Além disso as hifas também expressam fatores de virulência específicos, como enzimas degradativas (proteínases, fosfolipases, esterases e outros), adesinas de superfície celular (por exemplo, Als3, Hwp1 e Hyr1) e a toxina candidalisina, que permitem a invasão tecidual (WITCHLEY et al., 2019). Dessa forma, o patógeno fúngico na forma de levedura (ou blastoconídio), consegue ganhar a corrente sanguínea e de se disseminar resultando em um candidíase invasiva (MBA; NWEZE, 2020).

Candida spp. desenvolveram estratégias para escapar dos mecanismos imunológicos do hospedeiro, como evitar o reconhecimento dos Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR) do hospedeiro, protegendo os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) que são reconhecidos pelo PRRS (GANTNER; SIMMONS; UNDERHILL, 2005; HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016). Foi demonstrado por Gantner et al., (2005) que o β -glucano (PAMP) pode ser detectado via dectina-1 (PRR) de fagócitos, e que é protegido pela camada externa de manoproteína da parede celular, sendo exposto em um número limitado de locais, tais como as cicatrizes de brotamento das células de levedura (GANTNER; SIMMONS; UNDERHILL, 2005). Além disso, *Candida* spp. dispõem de mecanismos de resistência contra os peptídeos antimicrobianos (AMPs), para superar as atividades antifúngicas (GANTNER; SIMMONS; UNDERHILL, 2005; HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016). Esses mecanismos incluem a secreção de efetores de peptídeo, bombas de efluxo de AMPs e regulação de vias de sinalização (SWIDERGALL; ERNST, 2014).

1.3 Agentes antifúngicos

As células fúngicas possuem certa similaridade com as células humanas em termos estruturais e moleculares; entretanto, a presença de parede celular e de uma membrana celular fúngica contendo ergosterol são diferenciais quando comparado com as células humanas, sendo importantes alvos terapêuticos dos principais antifúngicos utilizados na prática clínica. Como resultado desta similaridade, muitos antifúngicos podem ser utilizados apenas em aplicações tópicas, mas alguns têm toxicidade

seletiva para fungos, uma vez que são dirigidos contra estruturas ou processos metabólicos específicos dos fungos, como a síntese do ergosterol e da parede celular (DOI et al., 2016; MADIGAN; et al., 2016).

Atualmente, o arsenal de medicamentos para o tratamento da candidíase compreende três classes principais: os polienos, os azóis e as equinocandinas, sendo as equinocandinas os medicamentos de primeira linha para tratamento das candidíases sistêmicas (BASSETTI et al., 2018; PFALLER et al., 2019). Reboli et al., avaliaram através de ensaio clínico randomizado, a eficácia superior da anidulafungina sobre o fluconazol em pacientes com candidemia (REBOLI et al., 2007). Já a caspofungina e a micafungina demonstraram melhor tolerabilidade do que as formulações de desoxicolato e anfotericina B lipossomal (KUSE et al., 2007; MORA-DUARTE et al., 2002). Em conclusão, todas as três equinocandinas são escolhas válidas para ICS por *Candida* (CORNELLY et al., 2012; PAPPAS et al., 2018). A duração do tratamento na candidemia deve ser até 14 dias após a cessação da ICS; desta forma, a repetição das hemoculturas é essencial para evitar o tratamento insuficiente ou excessivo (CORNELLY et al., 2012).

1.3.1 Polienos

Os polienos são a classe mais antiga de medicamentos antifúngicos e incluem anfotericina B e nistatina. Os polienos atuam se complexando ao ergosterol localizado na membrana plasmática das células fúngicas, formando poros que causam a desestabilização da membrana e o extravasamento de componentes citoplasmáticos resultando na morte celular (DOI et al., 2016; PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

A anfotericina B desoxicolato (AMB) pode ser indicada para uma variedade de infecções fúngicas invasivas, tais como aspergilose invasiva, criptococose, blastomicose, candidemia, coccidioidomicose, histoplasmoses e mucormicose; entretanto, devido a sua toxicidade sistêmica atualmente é considerada terapia de segunda linha dependendo da forma clínica da doença. Devido a toxicidade inerente ao tratamento, algumas formulações lipídicas foram desenvolvidas a fim de reduzir os efeitos colaterais, incluindo o complexo lipídico da anfotericina B (ABLC), a anfotericina B lipossomal (L-AMB) e a dispersão coloidal da anfotericina B (ABCD). A composição lipídica de todas essas três preparações difere consideravelmente e

contribui para parâmetros farmacocinéticos substancialmente diferentes (HAMILL, 2013). Embora as formulações lipídicas de anfotericina B tenham toxicidade menor que a formulação original, seu alto custo impede seu uso mais amplo, principalmente em países em desenvolvimento (BEN-AMI, 2018; MORA-DUARTE et al., 2002).

Assim como a AMB, a nistatina exibe toxicidade, porém é considerada mais tóxica que a AMB desoxicolato quando administrados pela via intravenosa. Portanto, a nistatina é recomendada somente como um antifúngico tópico, não sendo uma opção para o tratamento das micoses sistêmicas (LYU et al., 2016).

Devido a natureza fungicida dos agentes poliênicos, o isolamento de fungos com resistência a estes compostos é raro (HAMILL, 2013). Os principais mecanismos de resistência envolvem adiminuição da quantidade de ergosterol, acúmulo de outro esterol diferente de ergosterol com baixa finidade pelos poliênicos, e alterações na via biosintética do ergosterol envolvendo mutações nos genes ERG2, ERG3, ERG11 e ERG5 (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

1.3.2. Azóis

Os azóis compreendem um grupo de antifúngicos sintéticos contendo anel imidazol (ex. cetoconazol, miconazol e outros) ou triazol (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol). Estes compostos inibem a síntese do ergosterol tendo como alvo a enzima C14- α -lanosterol demetilase dependente do citocromo P450 (conhecida como Erg11, em leveduras) (MADIGAN; et al., 2016). A interrupção da síntese do ergosterol permite o acúmulo de 14 α -metil esteróis, que alteram a estabilidade da membrana, a permeabilidade e a ação de enzimas ligadas à membrana (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010; PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017). Apesar da eficácia, segurança e amplo espectro, os azóis apresentam efeitos colaterais como náuseas, vômito, dor, distensão abdominal e diarreia. Os efeitos adversos dos compostos azólicos devem-se ao fato de estes bloquearem a biossíntese das mesmas enzimas do complexo P450 nas células do fígado dos mamíferos, importantes na metabolização de compostos, resultando em alta hepatotoxicidade e interações medidamentosas (JOHNSON; KAUFFMAN, 2003).

A resistência aos azóis em *Candida* spp. envolve vários mecanismos bem definidos que frequentemente podem atuar em conjunto em um único isolado (MORIO et al., 2013), tais como: mutação do gene ERG 11 (C14- α -lanosterol demetilase), aumento da expressão de ERG 11 e o acúmulo intracelular reduzido dos agentes azólicos por meio do efluxo (MORIO et al., 2013). As principais famílias de bombas de efluxo envolvidos na resistência aos azóis são dos tipos ABC (*ATP binding cassette*) e MFS (*Major Facilitator*) (MORIO et al., 2017). Em *C. glabrata* e *C. krusei* são conhecidas altas taxas de resistência aos azóis, como o fluconazol, pois a primeira tem suscetibilidade reduzida e a segunda possui resistência intrínseca (JOHNSON; KAUFFMAN, 2003; MORIO et al., 2017). O Programa de Vigilância Antifúngica ARTEMIS relatou um aumento de *C. glabrata* como causa de candidíase invasiva, de 18% em 1992–2001 para 25% em 2001–2007, e um aumento na resistência ao fluconazol, de 9% para 14%, sobre o mesmo período (PFALLER et al., 2009). Em 2013, entre 1846 isolados clínicos de 31 países, 11,9% de *C. glabrata* e 11,6 % de *C. tropicalis* eram resistentes ao fluconazol (CASTANHEIRA et al., 2016). As infecções causadas por *C. albicans* estão associadas a níveis variáveis de resistência ao fluconazol, e dependem da origem da infecção. Pacientes com candidemia possuem a menor incidência de resistência ao azóis (PFALLER et al., 2019), já em pacientes com candidíase orofaríngea, é maior e depende de tratamento prévio com fluconazol (ENWURU et al., 2008).

1.3.3. Equinocandinas

As equinocandinas representam uma classe de antifúngicos semi-sintéticos composta por caspofungina, micafungina e anidulafungina, e a mais recente, porém ainda em desenvolvimento, a rezafungina (HELLEBERG et al., 2020). Esses lipopeptídeos cíclicos possuem atividade fungicida contra a maioria das espécies de *Candida*, incluindo as resistentes aos polienos e aos azóis (LAMOTH et al., 2018; PFALLER et al., 2019). O mecanismo de ação destes compostos na célula fúngica é a inibição não competitiva da enzima β -1,3-D-glucano sintetase, que catalisa a polimerização da glicose-uridina-difosfato (UDP-glicose) em polímero de β (1,3)D-glucano, principal componente da parede celular de fungos e da matriz extracelular dos biofilmes de *Candida* spp. (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010). O rompimento da síntese de 1,3- β -D-glucano danifica a integridade da parede celular e leva à ruptura e morte celular (BEN-AMI, 2018).

Dados disponibilizados em 2019 pelo programa SENTRY referentes ao período de 2006 – 2016, demonstraram que a resistência a 1 ou mais equinocandinas era distintamente incomum entre isolados de *C. albicans* (0,0%–0,1%), *C. parapsilosis* (0,0% –0,1%), *C. tropicalis* (0,5% –0,7%) e *C. krusei* (0,0% -1,7%), além disso, não foi observado nenhuma tendência de aumento da resistência ao longo do tempo para nenhuma destas espécies, entretanto, segundo os autores *C. tropicalis* exibiu um aumento na resistência em 2015–2016 em comparação com os anos anteriores, entretanto para *C. glabrata*, apesar de não haver variabilidade ao longo do tempo, as maiores taxas de resistência foram observadas, dentre os 2860 isolados 210 (7,34%) foram considerados resistente a pelo menos 1 equinocandina (PFALLER et al., 2019). Os mecanismos de resistência em *Candida* envolvem mutações no gene *FKS1*, que codifica a enzimática β -1,3-D-glucano-sintase (PERLIN, 2015).

1.4 Epidemiologia e patogênese de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus também é encontrado com relativa frequência na microbiota normal, e pode colonizar até 30% das pessoas saudáveis e até 70% das que se encontram hospitalizadas (THWAITES; GANT, 2011), sendo que as maiores taxas são encontradas entre algumas populações específicas como: usuário de drogas endovenosas, portadores de diabetes insulino dependente, indivíduos apresentando enfermidades dermatológicas, portadores do vírus da imunodeficiência adquirida, pacientes com uso de cateteres venosos de longa permanência e em trabalhadores da área da saúde (NICKERSON et al., 2009). Algumas infecções por *S. aureus* são agudas e podem se disseminar para diferentes tecidos e provocar focos metastáticos. Episódios mais graves, como bacteremia, pneumonia necrotizante, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite e meningite, infecções osteoarticulares, da pele e dos tecidos moles, pleuropulmonares e relacionadas a dispositivos médicos implantados também podem ocorrer (TONG et al., 2015). Além disso, a colonização por *S. aureus* tem um impacto negativo em algumas dermatoses inflamatórias crônicas, como dermatite atópica, uma doença complexa multifatorial que causa disfunção da barreira cutânea (SCUDIERO et al., 2020).

A bacteremia causada por *S. aureus* é uma das infecções bacterianas mais comuns e graves em todo o mundo. Em um estudo de ICS, onde 59 hospitais nos Estados Unidos foram avaliados, *S. aureus* foi o isolado bacteriano mais comum,

presente em até 23% de todos os episódios (1.540 de 6.697), conseqüentemente *S. aureus* esteve mais associado ao óbito destes pacientes do que qualquer outro patógeno bacteriano encontrado (SHORR et al., 2006).

O programa SENTRY de vigilância antimicrobiana disponibilizou os dados de 20 anos de avaliação (1997-2016), e dos 191.460 isolados de *S. aureus*, 77.146 (40,3%) eram MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), sendo a maior parte encontrada em pacientes com mais de 80 anos; quando avaliamos os dados da América Latina, os resultados são semelhantes com um total de 38,7% dos isolados de *S. aureus* sendo MRSA (DIEKEMA et al., 2019). Já no Brasil, ao analisarmos os dados disponíveis no período de 2012-2016, 42% dos isolados foram considerados MRSA (PATERNINA-DE LA OSSA et al., 2018).

Além disso, relatórios recentes da Fundação CF (Cystic Fibrosis Foundation, Annual Data Report 2018) indicam que em 70,3% (N= 30.775) dos pacientes com fibrose cística, *S. aureus* foi isolado, sendo 25% MRSA. Essas condições pré-existentes representam fatores de risco para infecções por fungos e outras infecções oportunistas (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2018).

S. aureus é um importante patógeno que expressa múltiplos fatores de virulência como adesinas, toxinas, enzimas extracelulares, formação de biofilmes e mecanismos de evasão do sistema imunológico do hospedeiro (ŁYSKOWSKI; LEO; GOLDMAN, 2011). Geralmente conhecidas como MSCRAMMs (componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz adesiva), as adesinas tem como principal função a adesão às superfícies, que podem ser bióticas como tecidos e mucosas, ou abióticas, como cateteres, facilitando a formação de biofilmes (ŁYSKOWSKI; LEO; GOLDMAN, 2011). Dentre as principais toxinas expressas por *S. aureus* as de maior relevância e estudo são as toxinas citolíticas, tais como hemolisinas e leucotoxinas, que tem por função lisar os glóbulos vermelhos e brancos, respectivamente (ŁYSKOWSKI; LEO; GOLDMAN, 2011; OTTO, 2014).

Recentemente, Vila et al. (2019) avaliaram o papel de um carotenóide triterpeno produzido exclusivamente por *S. aureus* chamado estafiloxantina (STXN) (VILA et al., 2019). Estudos revelam que a estafiloxantina é importante por diminuir a fluidez da membrana ao influenciar em sua permeabilidade, suscetibilidade ao estresse oxidativo e morte de neutrófilos (CLAUDITZ et al., 2006). Liu et al. (2005) descreveram uma

frequência de sobrevivência aproximadamente 10 vezes maior de cepas de *S. aureus* (cepa selvagem) em comparação com o mutante não produtor de *crtM* em neutrófilos humanos, indicando que STXN pode estar associado com a evasão do sistema imune. Além disso, a biossíntese de STXN tem sido explorada como um potencial alvo de antimicrobianos (LIU et al., 2005).

Interessantemente, Thwaites et al. (2011), propuseram que os fagócitos, especificamente os neutrófilos, tem um papel privilegiado na infecção por *S. aureus* na corrente sanguínea, e podem fornecer um compartimento que permite o transporte da bactéria, e com isso uma infecção metastática bem-sucedida, viabilizando uma forma pela qual a bactéria pode viajar e infectar locais distantes. Segundo Thwaites et al. (2011) quando *S. aureus* é fagocitado por um neutrófilo, ele reside em um fagossomo, onde é exposto a uma variedade de substâncias microbidas potentes, incluindo intermediários de oxigênio e nitrogênio reativos, juntamente com peptídeos e proteínas antimicrobianas, como lisozima, α -defensinas, catepsinas e proteinase de leucócitos, que são liberadas quando os grânulos citoplasmáticos se fundem com o fagossomo (THWAITES; GANT, 2011). Já a resistência aos AMPs é mediada pela secreção de estafilocinase e aureolisina, que se ligam aos peptídeos catiônicos, por bombas de efluxo que removem os peptídeos da célula e por modificações na parede celular que aumentam sua carga positiva, diminuindo assim a afinidade dos peptídeos antimicrobianos com carga positiva para a bactéria, permitindo a sobrevivência bacteriana (ANWAR et al., 2009; FOSTER, 2009). A morte dos neutrófilos infectados após a disseminação pode levar à liberação de bactérias e toxinas nos tecidos e, portanto, pode causar inflamação e infecção local (FOSTER, 2009).

Conforme citado anteriormente *S. aureus* é encontrado com relativa frequência na microbiota normal do corpo humano, porém atualmente sua importância clínica está no aumento da ocorrência de infecções hospitalares graves causadas por amostras multirresistentes e com altas taxas de mortalidade (BAUER et al., 2013; KONG et al., 2016).

1.5 Agentes antibacterianos

O tratamento de infecções por *S. aureus* depende muito do tipo de infecção, bem como da presença ou ausência de cepas resistentes aos medicamentos. Quando a terapia antimicrobiana é necessária, a duração e o modo de terapia dependem muito

do tipo de infecção, bem como de outros fatores (TONG et al., 2015). De modo geral a penicilina continua sendo o antibacteriano de primeira escolha para isolados MSSA e se for uma cepa produtora de β -lactamase, uma penicilina semissintética (nafcilina ou oxacilina) é recomendada. Caso o paciente tenha alergia à penicilina, uma cefalosporina é uma alternativa aceitável (DAVID; DAUM, 2017). A vancomicina é a opção de tratamento de primeira linha recomendada para bacteremias por MRSA ou quando o tratamento com β -lactâmicos não é indicado e tem uma longa história de uso; também é, muitas vezes, um comparador aos agentes antibacterianos mais novos para o tratamento de infecções por *S. aureus* (MCMULLAN; HONS; CAMPBELL, 2020). Contudo, em alternativa à vancomicina, daptomicina ou linezolida por via intravenosa podem ser usadas para infecções graves. A terapia oral, via de regra, deve ser evitada no tratamento inicial de infecções graves. Clindamicina, sulfametoxazol-trimetoprima e doxiciclina são escolhas alternativas para o tratamento de infecções leves a moderadas, dependendo do teste de sensibilidade aos antibióticos. Para abscessos cutâneos não complicados, o uso de clindamicina ou sulfametoxazol-trimetoprima em conjunto com incisão e drenagem demonstrou melhorar as taxas de cura clínica no departamento de emergência e outros ambientes ambulatoriais (LEWIS et al., 2018).

A resistência de *S. aureus* a quase todas as classes iniciais de antibióticos é mediada quase que exclusivamente por transferência horizontal de DNA (LIMBAGO et al., 2014). A transferência horizontal de genes é responsável pelas características de resistência mais preocupantes em *S. aureus* como a resistência à meticilina e à vancomicina (PANTOSTI; SANCHINI; MONACO, 2007). Além disso, sabe-se que a resistência adquirida através do processo de mutação e seleção aleatória sob pressão de antibióticos desempenha um papel importante no cenário clínico, fornecendo uma importante via de resistência aos antibióticos, como fluoroquinolonas, vancomicina (por nível intermediário de resistência), daptomicina, linezolida, entre outros (CHAMBERS; DELEO, 2009)

Nos anos 60 a meticilina foi lançada como alternativa terapêutica para cepas produtoras β -lactamases, porém, já em 1961, cepas também resistentes à meticilina passaram a ser descritas e foram denominadas *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (DAVIES, 1996; MEDIAVILLA et al., 2012). Tal mecanismo de resistência está relacionado à alteração de proteínas ligadoras de penicilina (PBP), codificada pelo gene *mecA* e sem relação com a produção de beta-lactamases. No entanto, nos anos 90, relatos de novas infecções por MRSA associadas à comunidade

(CA-MRSA) entre indivíduos saudáveis começaram a aparecer na literatura e logo se mostraram associadas a linhagens geneticamente distintas de MRSA, aparentemente não relacionadas às cepas existentes de MRSA (HA-MRSA) associadas á infecções nosocomiais (MEDIAVILLA et al., 2012). As doenças infecciosas causadas por *S. aureus* resistente a múltiplos antibióticos β -bactâmicos como meticilina, penicilina, oxacilina e amoxicilina (MRSA) continuam a ser uma das principais preocupações em todo o mundo. Os dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) relataram aproximadamente 80.000 infecções invasivas por MRSA e 11.285 mortes associadas a este patógeno em 2017 (WIJESIRI et al., 2017).

Atualmente, o MRSA encontra-se amplamente difundido e se tornou um importante patógeno adquirido na comunidade, com características aprimoradas de virulência e transmissão. Geralmente, as cepas típicas de CA-MRSA exibem diferenças importantes em relação às cepas de HA-MRSA, incluindo a produção de leucocidina Panton-Valentine (PVL), suscetibilidade de baixo nível aos antibióticos não β -lactâmicos (FIGUEIREDO, 2017); a presença de PVL em isolados de *S. aureus* está associada à necrose tecidual e destruição de leucócitos, através da formação de poros na membrana celular (DUFOUR et al., 2002).

1.6 Interações entre bactérias e fungos

As interações entre fungos e bactérias bem como a interação com o hospedeiro e o sistema imunológico tem sido amplamente estudada ao longo dos anos e são altamente dinâmicas e dependem de uma infinidade de fatores incluindo interações físicas por contato direto célula-célula, suprimento de nutrientes, alterações de pH, níveis de oxigênio além de interações químicas por meio de secreção moléculas frequentemente envolvidas no *quorum sensing* quando os microrganismos estão coexistindo na forma de biofilme (KRÜGER et al., 2017). Nos biofilmes microbianos, e particularmente nos biofilmes de espécies mistas, o *quorum sensing* (QS) ou a comunicação célula a célula é um processo crucial mediado por pequenos produtos químicos secretados. Essas moléculas de sinalização liberadas no ambiente do biofilme permitem que uma espécie detecte e responda à presença da outra, permitindo um comportamento direcionado em resposta às mudanças de condições. Portanto, esses mediadores secretados podem afetar a fisiologia celular e podem assumir importância vital, particularmente dentro de um ambiente

polimicrobiano, o que facilita a exposição cruzada a essas moléculas (CAROLUS; VAN DYCK; VAN DIJCK, 2019; VILA et al., 2019).

De modo amplo, as infecções polimicrobianas podem ser consideradas sinérgicas ou antagônicas. Na primeira, um microrganismo gera um nicho favorável à infecção e colonização de outros microrganismos sendo frequentemente patogênicos, e ambos se beneficiam desta coinfecção; como por exemplo *C. albicans* e *S. aureus*, onde ambos fornecem um ambiente propício a dupla colonização (BERNARD; GIRARDOT; IMBERT, 2019). Por outro lado, quando microrganismos são antagônicos, a presença de um microrganismo gera um nicho no hospedeiro que suprime a colonização de outros microrganismos, como visto na interação entre *Pseudomonas aeruginosa* e *Aspergillus fumigatus*, onde pesquisas recentes mostraram que a pioverdina produzida por *P. aeruginosa* pode suprimir o crescimento e a formação de biofilme pela quelação de ferro, reduzindo sua disponibilidade para *A. fumigatus* (SASS et al., 2018; ZHAO; YU, 2018). Recentemente, Camarillo-Márquez et al. (2018) demonstraram antagonismo na interação de *C. glabrata* e *S. aureus* durante a formação de biofilmes mistos, em que a bactéria consegue eliminar o fungo induzindo morte celular por apoptose (CAMARILLO-MÁRQUEZ et al., 2018).

Desvendar os mecanismos que os microrganismos usam em um ambiente competitivo e polimicrobiano, tanto na forma planctônica quanto em biofilmes, não apenas aprofundará a compreensão da patogênese microbiana, mas também fornecerá informações importantes sobre novas vias favoráveis ao desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos (PELEG; HOGAN; MYLONAKIS, 2010).

1.7 Biofilmes polimicrobianos

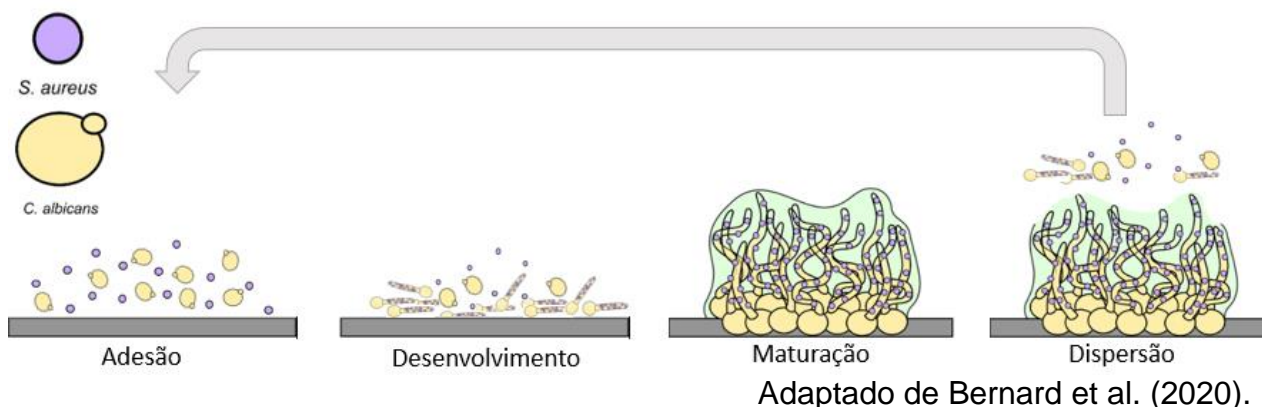
C. albicans e *S. aureus*, frequentemente, coexistem em biofilmes polimicrobianos sobre superfícies dos tecidos do hospedeiro ou no ambiente. Biofilmes polimicrobianos representam um problema de saúde clinicamente relevante com potencial para servir como reservatório infeccioso para uma variedade de microrganismos como bactérias e fungos. As infecções polimicrobianas também estão associadas a taxas de mortalidade mais altas quando comparadas com infecções causadas por uma espécie microbiana (FAIX e KOVARIK, 1989; HARRIOTT; NOVERR, 2009, 2011). Nos biofilmes polimicrobianos, a presença de patógenos eucarióticos e procarióticos é um evento importante, o que dificulta tanto o diagnóstico

quanto o tratamento, o que requer estratégias mais complexas. O aumento da resistência aos agentes antibacterianos e antifúngicos em células de bactérias e fungos, respectivamente, é a alteração comportamental de maior relevância médica (SUN et al., 2013).

Biofilmes são comunidades microbianas heterogêneas aderidas a superfícies bióticas ou abióticas e envolvidas em uma matriz extracelular polimérica; composta principalmente de exopolissacarídeos, DNA e RNA extracelulares, proteínas e lipídeos; formando uma estrutura tridimensional complexa que protege as células contra ambientes hostis. Além disso, as células em biofilmes apresentam um fenótipo alterado que diferem das células planctônicas (em suspensão) na expressão de genes, taxa de crescimento e, principalmente, na suscetibilidade aos agentes antimicrobianos. A transição de células planctônicas a biofilmes é regulada por uma variedade de fatores como densidade celular, disponibilidade de nutrientes e estresse celular (LANDINI et al., 2010; WILLIAM COSTERTON et al., 1995). A organização e diferenciação celular dentro dos biofilmes são regidos por moléculas secretadas, chamadas auto-indutoras, pelas células dos biofilmes capazes de regular a expressão de genes e eventos bioquímicos dependentes da densidade celular, e este mecanismo de comunicação celular é chamado de *quorum sensing* (JABRA-RIZK et al., 2006).

Biofilmes de *C. albicans* e *S. aureus* compartilham de algumas características gerais. As fases de formação do biofilme são a adesão, desenvolvimento, maturação e dispersão. Primeiramente, a célula deve aderir-se a uma superfície, esta ligação inicial é mediada por fatores como hidrofobicidade da superfície celular, forças eletrostáticas e por adesinas. Seguem no desenvolvimento e a maturação do biofilme, nos quais, ocorrem proliferação celular com alongação de hifas ou pseudohifas em *C. albicans* ou proliferação celular no caso de *S. aureus* e produção de matriz extracelular formando uma rede densa de células e numa estrutura tridimensional complexa (HARRIOTT; NOVERR, 2009; YI et al., 2013). Após atingir a maturidade, as células-filhas dos biofilmes podem se desprender e chegar a novos sítios através da corrente sanguínea, podendo disseminar a infecção na fase de dispersão (BERNARD; GIRARDOT; IMBERT, 2019) (Figura 1).

Figura 1. Esquema de formação de biofilmes polimicrobianos.

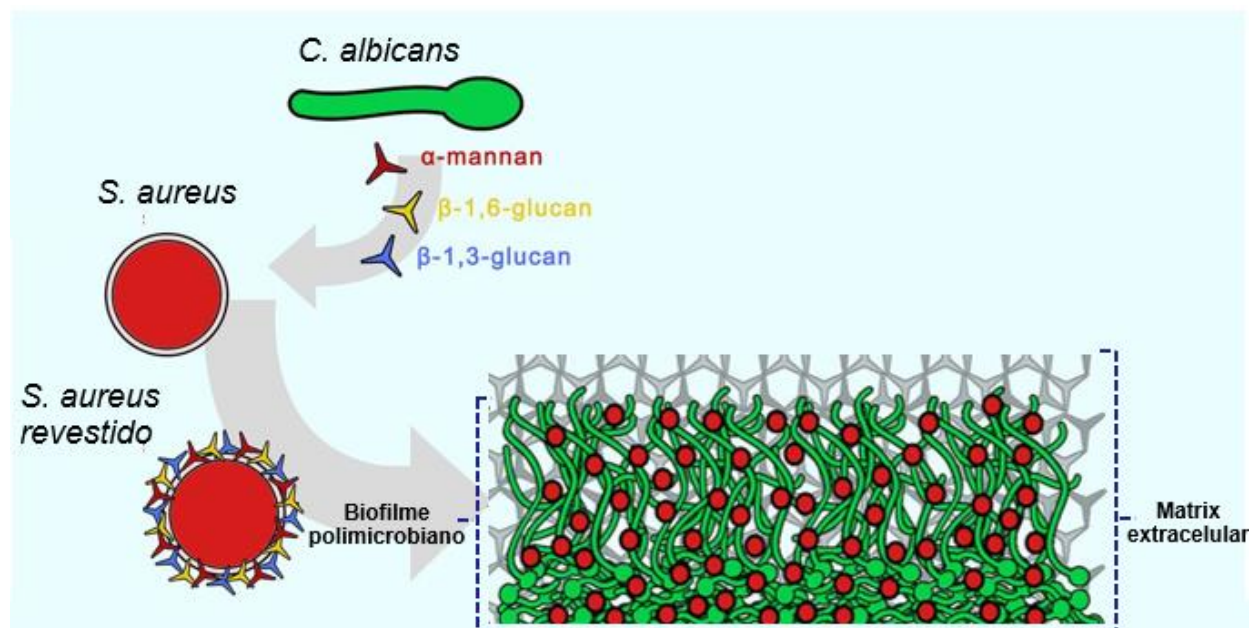


Um dos primeiros ensaios evidenciando a interação entre *S. aureus* e *C. albicans* foi baseada em um estudo onde as bactérias e fungos foram injetados em diferentes locais do mesmo camundongo. Foi observado que *S. aureus* se disseminava para o local da infecção fúngica e se aderiu às hifas de *C. albicans*, porém o mesmo não ocorria no local da injeção bacteriana (CARLSON; JOHNSON, 1985). Ensaio de microscopia revelam que o biofilme polimicrobiano é composto por uma camada basal de células fúngicas, uma camada superior, onde as bactérias são intercaladas dentro da rede de hifas/pseudohifas e, na superfície, a matriz extracelular, envolvendo células fúngicas e bacterianas. Também foi observado a presença de microcolônias na superfície do biofilme (CARLSON; JOHNSON, 1985; HARRIOTT; NOVERR, 2009; YI et al., 2013).

A transição de levedura para hifas/pseudohifas de *C. albicans* é importante para o estabelecimento da interação com *S. aureus* devido à associação física entre estas duas espécies (PETERS et al., 2012; SCHLECHT et al., 2015). Imagens de microscopia revelaram uma associação preferencial de *S. aureus* às hifas de *C. albicans*, através de uma adesina específica, a Als3p. O gene *ALS3* é um membro da família de genes *ALS* de *C. albicans* (sequência semelhante à aglutinina), que codifica oito glicoproteínas da superfície celular com um domínio N-terminal da função adesiva. As proteínas Als cobrem difusamente a superfície da célula fúngica e, portanto, estão envolvidas na adesão às superfícies abióticas e do hospedeiro (SCHLECHT et al., 2015). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que *S. aureus* pode usar a adesão às hifas de *C. albicans* para se tornar invasivo. Usando um modelo de língua murina *ex vivo*, foi demonstrado que a colonização oral por *C. albicans* e *S. aureus* levou à penetração do tecido da língua por hifas, estando as

bactérias aderidas as hifas de *C. albicans*. Entretanto, Peters et al. (2012) observaram que, mesmo na cepa mutante de *C. albicans als3*, as células de *S. aureus* se ligam às hifas fúngicas, sugerindo que moléculas adicionais da superfície celular, interações hidrofóbicas e eletrostáticas inespecíficas, bem como revestimento da bactéria pelo material proveniente da matriz extracelular de *C. albicans*, mais especificamente α -manana, β -1,3-glucana e β -1,6-glucana, podem desempenhar um papel na agregação interespecies (PETERS et al., 2012) (Figura 2).

Figura 2. Esquema de biofilme misto formado por *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.



Adaptado de Kong et al. 2016.

Antes de formar o biofilme maduro, os microrganismos, num processo denominado *quorum-sensing*, secretam pequenas moléculas sinalizadoras que atuam como auto-indutores para iniciar/reprimir a expressão gênica (JABRA-RIZK et al., 2006). Quando certa concentração dessas moléculas é atingida, as células ligam-se à superfície biótica ou abiótica, regulam as fases da formação do biofilme e produzem os fatores de virulência. O *quorum-sensing* é um fator importante na formação e, mesmo na manutenção do biofilme, mas isso depende das condições do meio onde estão as células e pode variar conforme a espécie (CAMILLI A., 2009; KRUPPA, 2009).

A detecção de *quorum*, isto é, sinalização intercelular dependente da densidade através de pequenas moléculas segregadas, foi encontrada tanto nas espécies *Staphylococcus*, quanto nas espécies de *Candida* (ALBUQUERQUE;

CASADEVALL, 2012; LE; OTTO, 2015). Uma das moléculas mais bem caracterizadas é o farnesol, um derivado chave na via de biossíntese de esteróis em células eucarióticas. O farnesol é gerado endogenamente em *C. albicans* por desfosforilação enzimática de difosfato de farnesil (FPP) e secretada no ambiente (KRUPPA, 2009). Além disso esta molécula inibe a morfogênese de leveduras para hifas de *C. albicans* e, conseqüentemente, controla a taxa de crescimento celular quando o biofilme de *C. albicans* contém um grande número de células (CAROLUS; VAN DYCK; VAN DIJCK, 2019). Numerosos estágios do desenvolvimento do biofilme são influenciados pelo farnesol, incluindo adesão celular a substratos, arquitetura madura do biofilme e dispersão celular do biofilme devida a alta densidade populacional (SEBAA; BOUCHERIT-OTMANI; COURTOIS, 2019).

Prévios estudos demonstraram que o farnesol, em altas concentrações, inibem o crescimento microbiano como *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cryptococcus*, entre outras espécies, além de induzir a morte celular (CORDEIRO et al., 2012; LIU et al., 2010; MACHIDA et al., 1999; WANG et al., 2014). Jabra-Rizk et al. (2006) observaram que o farnesol reduziu a viabilidade de *S. aureus* e impediu o desenvolvimento de seu biofilme quando presente em altas concentrações (JABRA-RIZK et al., 2006). Kong et al., (2017) demonstraram que, na presença de farnesol suplementado ou secretado por *C. albicans* no biofilme, em concentrações intermediárias ou baixas, *S. aureus* exibiu tolerância significativamente aumentada à vancomicina. Estes pesquisadores concluíram, que o mecanismo para o aumento da tolerância é atribuído à regulação positiva das bombas de efluxo de drogas, em decorrência do aumento na acumulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em concentrações crescentes de farnesol, sendo um potente indutor de expressão de bombas de efluxo em *S. aureus* (KONG et al., 2017; VILA et al., 2019).

Para superar os efeitos do estresse oxidativo, os estafilococos desenvolveram várias estratégias de defesa que são controladas por uma complexa rede de reguladores, portanto, é provável que o estresse oxidativo exercido pelo farnesol, ative uma resposta protetora ao estresse na célula bacteriana, que de modo indireto confere tolerância aos antibacterianos (JABRA-RIZK et al., 2006; KONG et al., 2017). Recentemente foi observado por Vila et al. (2019) que quando *S. aureus* é exposto repetidamente ao farnesol, perde seu pigmento tipicamente amarelo, a estafiloxantina, sendo este um importante fator de virulência; entretanto o mesmo não ocorre quando

cultivado com uma cepa de *C. albicans* deficiente em farnesol (VILA et al., 2019). Além disso, a exposição ao farnesol induziu um acúmulo de ROS e aumento na expressão de sensores redox, sendo estes os principais reguladores de virulência (KONG et al., 2017).

Dentre os mecanismos regulatórios que garantem a adaptação oportuna da fisiologia estafilocócica ao ambiente, o *quorum sensing* se destaca como um dos mecanismos mais intensamente estudados e provavelmente mais importantes para o controle da patogênese (LE; OTTO, 2015). O *quorum sensing* é a regulação gênica dependente da densidade populacional e do ambiente que ocorre por meio da comunicação célula-célula, nos estafilococcus o sistema regulador de gene acessório (*agr*) é necessário para a progressão da doença em vários modelos animais de infecção aguda, incluindo endocardite infecciosa, infecções de pele e tecidos moles, pneumonia, artrite séptica e osteomielite, sendo relacionado fortemente com a produção de alfa-toxinas estafilócicas (KONG et al., 2017; LE; OTTO, 2015). Interessantemente, Todd et al. (2019) relacionaram o aumento da secreção de toxinas de *S. aureus* com um aumento na expressão de *agr* durante a coinfeção com *C. albicans*. *agr* é sensível a vários estímulos ambientais, incluindo pH. O pH da cavidade abdominal durante a infecção por *C. albicans* é ligeiramente alcalino. Assim, é possível que a alteração no pH dentro do abdômen, tamponem os produtos finais ácidos do metabolismo estafilocócico, mantendo assim níveis de pH neutro que são ideias para ativação sustentada de *agr* (TODD et al., 2019).

Quanto a formação de biofilme, o sistema *agr* parece influenciar a formação de biofilmes em muitos estágios. A não funcionalidade do sistema *agr* facilita a fixação inicial de estafilococos a uma superfície de poliestireno, presumivelmente devido à regulação negativa das moléculas de desprendimento (KONG; VUONG; OTTO, 2006). Depois de aderidas à superfície as bactérias começam a se acumular, formando uma densa rede, sendo a adesão célula-célula um fator determinante que envolve o exopolissacarídeo chamado polissacarídeo poli-N-acetilglucosamina polissacarídica (PIA) que não é regulada pelo sistema *agr* (VUONG et al., 2000).

Os mecanismos moleculares das células do biofilme são ativados durante a formação do biofilme contribuindo para os níveis elevados da resistência aos agentes antimicrobianos que, em geral, é multifatorial, incluindo produção de enzimas que degradam o antimicrobiano, redução do influxo do antimicrobiano, aumento da

produção de bombas de efluxo, alteração do alvo molecular, redução da taxa de crescimento pela limitação de nutrientes, presença de células persistentes e subpopulações com diferentes níveis fenotípicos de resistência (PARAJE, 2011; RAMAGE et al., 2012). Adicionalmente, a matriz extracelular do biofilme pode se apresentar como uma barreira física, impedindo o acesso de agentes antimicrobianos às células incorporadas na comunidade do biofilme e, então, colaborar para o aumento da resistência ao antimicrobiano. Este obstáculo parece depender da quantidade e natureza da matriz, assim como das propriedades físico-químicas do fármaco. Em geral, a resistência do biofilme é um fenótipo indutível, que faz parte de uma série de vias moleculares que regulam o desenvolvimento do biofilme (PARAJE, 2011; RAMAGE et al., 2012).

1.8 Tratamento dos biofilmes

No tratamento de infecções relacionadas a biofilmes formados na superfície de dispositivo médico, geralmente recomenda-se a remoção; entretanto, em alguns casos isso não é praticável e, muitas vezes, o biofilme já pode ter invadido a mucosa e tecidos contíguos (PAPPAS et al., 2016). Em geral, tais ICS relacionadas a biofilmes esbarram em dificuldades no diagnóstico e no tratamento com os antimicrobianos disponíveis (NETT; ANDES, 2020).

Para o tratamento de ICS associadas a biofilmes de *Candida*, as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina, micafungina) e formulações lipossomais de anfotericina B são atualmente recomendados (PAPPAS et al., 2016; PRESS; SHIELDS; CLANCY, 2014; RAMAGE; ROBERTSON; WILLIAMS, 2014). Para infecções estafilocócicas, vancomicina, linezolida, daptomicina, rifampicina em associação com outros antimicrobianos são utilizados (HOGAN et al., 2016; KIEDROWSKI; HORSWILL, 2011).

Sabe-se que as 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 (KONG et al., 2016). Encontrar uma estratégia de tratamento eficiente para infecções polimicrobianas é um grande desafio, uma vez que as terapias tradicionais costumam atingir apenas agentes causadores individuais em reinos específicos (BROGDEN; GUTHMILLER; TAYLOR, 2005). Entretanto, há ainda poucos estudos sobre medidas

efetivas contra biofilmes polimicrobianos de *C. albicans* e *S. aureus*; portanto o combate a biofilmes é um desafio considerável tanto para pesquisadores quanto para clínicos.

Processos celulares de formação, manutenção e dispersão de biofilmes microbianos podem ser alvos para a descoberta de novos inibidores antimicrobianos. Tais inibidores poderiam ser utilizados sozinhos ou em combinação com agentes antimicrobianos convencionais nas terapias anti-infecciosas. E, mesmo se agentes antibiofilmes por si só não puderem matar os microrganismos, eles podem torná-los mais suscetíveis aos antimicrobianos convencionais bem como à ação do sistema imune do hospedeiro (LANDINI et al., 2010).

Atualmente alguns trabalhos científicos evidenciaram a combinação de agentes antifúngicos e antibacterianos convencionais ou a combinação de agentes antimicrobianos convencionais com novos inibidores no controle dos biofilmes mono- e polimicrobianos de *Candida* spp. e *S. aureus* como uma alternativa possível para superar esse desafio.

Qu et al. (2016) avaliaram a atividade dos polimetacrilatos guanilados que são imitações estruturais sintéticas de peptídeos antimicrobianos (AMPs) constituindo uma nova classe de agentes antimicrobianos que, segundo os autores, estes AMPs demonstraram excelente eficácia quando avaliados em biofilmes polimicrobianos *in vitro* de *C. albicans* e *S. aureus* (QU et al., 2016). Recentemente, verificou-se que o ácido cólico derivado do dipeptídeo valina-glicina, ou CAP3, exibia atividade antimicrobiana de amplo espectro contra *C. albicans* isolados e mistos com *S. aureus* em biofilmes *in vitro* e *in vivo*. Seu efeito foi atribuído à ruptura da estrutura do biofilme e à permeabilização da membrana (GUPTA et al., 2019).

1.9 Equinocandinas no tratamento de biofilmes polimicrobianos

Esses antifúngicos são eficientes no controle de infecções causadas por *Candida* e *Aspergillus*, sendo fortemente recomendados no tratamento de ICS associada a biofilmes de *Candida* spp. (PAPPAS et al., 2016). Esta recomendação é baseada em dados experimentais *in vitro* e *in vivo* mostrando a eficiência das equinocandinas, em baixas concentrações, no controle de biofilmes de *Candida* spp. por reduzir a carga

fúngica e a síntese do principal componente da matriz extracelular polimérica (GHANNOUM et al., 2015).

Alguns trabalhos têm mostrado a atividade antibacteriana das equinocandinas sobre células de biofilmes de bactérias. 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 mostraram que a micafungina pode inibir a glicosiltransferase (produto do gene *ndvB*) por meio de uma inibição não-competitiva (BAZZI et al., 2013). Em um estudo *in vivo* utilizando modelo murino, KISSOYAN et al. (2016), avaliaram a eficácia da micafungina combinada com ceftazidima ou levofloxacina para o tratamento de infecções intraperitoneais de *P. aeruginosa*. Os ensaios indicaram que quando combinados, micafungina e levofloxacina (fluoroquinolona) protegeram 60% dos camundongos infectados, e para somente levofloxacina não houve sobrevivência, e 20% de sobrevivência para o tratamento com ceftazidima (beta-lactâmico) combinada com micafungina (KISSOYAN et al., 2016).

Sobre os biofilmes de *S. aureus*, SIALA et al. (2016) mostraram o sinergismo *in vitro* e *in vivo* entre a caspofungina e fluoroquinolonas (moxifloxacina e delafloxacina). Os ensaios mostram que a caspofungina é capaz de aumentar a atividade das fluoroquinolonas por inibir a enzima transmembrana N-acetil-glucosamina transferase (*icaA*) responsável pela síntese do polímero de N-acetil-glucosamina, um dos principais componentes da parede celular e da matriz extracelular do biofilme. Interessantemente, N-acetil-glucosamina transferase compartilha homologia com a enzima β -1,3-D-glucano sintetase de fungos como *Candida* spp. (SIALA et al., 2016). Rogiers et al., (2018) usando modelo *in vitro* e murino de infecção intraperitoneal demonstraram que o antifúngico anidulafungina age sinergicamente com o antibiótico tigeciclina contra biofilmes polimicrobianos formados por *C. albicans* e *S. aureus*. Além disso, foi observado que a anidulafungina, assim como a caspofungina, reduz a produção de N-acetil-glucosamina de *S. aureus*. Essa combinação sinérgica pode ser explicada pela redução de polissacarídeos da matriz extracelular dos biofilmes permitindo a difusão anidulafungina e a tigeciclina pelo biofilme e, conseqüentemente, o encontro com os respectivos alvos microbianos em camadas mais profundas (ROGIERS et al., 2018).

Kong et al. (2016) investigaram a influência de polissacarídeos da parede celular secretados por *C. albicans* na resposta de *S. aureus* aos agentes antibacterianos no biofilme. Os resultados demonstraram tolerância significativamente aumentada para *S. aureus* à VCM, na presença de *C. albicans* ou polissacarídeos secretados, com base nos resultados apresentados neste estudo, os autores propõem que o mecanismo para a tolerância aumentada de *S. aureus* à VCM envolve o impedimento da difusão de antimicrobianos através da matriz de biofilme mista que consiste em hifas *C. albicans* e polissacarídeos secretados da parede celular, tais como α -manana, β -1,3-glucana e β -1,6-glucana secretadas no ambiente do biofilme misto. Desta forma, este material secretado se adere a superfície celular de *S. aureus*, revestindo a camada externa. Então, à medida que o biofilme amadurece, além de fornecer estrutura e suporte, os polissacarídeos da matriz secretada, impedem a difusão dos antimicrobianos para o seu interior. Efetivamente, a matriz polissacarídica atua como barreira, mantendo a VCM na periferia e evitando que ela atinja seu alvo. É importante ressaltar que, através de seu efeito na matriz do biofilme fúngico ao inibir a produção dos polissacarídeos, a caspofungina sensibilizou as bactérias para VCM. Essas novas descobertas são importantes, pois podem indicar que, além de dificultar a difusão de antimicrobianos em um biofilme, o revestimento da célula bacteriana por polissacarídeos secretados por fungos fornece proteção adicional às bactérias, impedindo que a droga atinja seu alvo celular, conforme podemos ver na figura 2 (KONG et al., 2016).

1.10 Modelo de invertebrado *Galleria mellonella*

O modelo de invertebrado *Galleria mellonella* tem atraído cada vez mais notoriedade como um método alternativo ao uso de animais vertebrados não só por questões éticas, mas também econômicas, logísticas, além de ser de fácil manipulação e não necessitar de equipamentos especiais no laboratório para a manutenção da colônia (AMORIM-VAZ et al., 2015; TSAI; LOH; PROFT, 2016). Este invertebrado que pertence a ordem *Lepidoptera*, família *Pyralidae*, oferece várias vantagens atraentes, incluindo possibilidade de incubar a 37 °C, tem vida útil curta e tamanho conveniente para manuseio, o que facilita a injeção e coleta de hemolinfa para análises adicionais (VERTYPOROKH; WOJDA, 2020). Sua popularidade aumentou notavelmente na última década, com um número substancial de estudos publicados que fornecem

evidências de que a *G. mellonella* é um modelo confiável para testar a patogenicidade de bactérias, fungos e vírus, além de testar a eficácia e toxicidade de compostos antimicrobianos, bem como ferramenta em triagem de estudos de antifúngicos (BURGWYN et al., 2016; CUTULI et al., 2019; JØNSSON et al., 2017; TSAI; LOH; PROFT, 2016).

Como um quesito interessante, os resultados dos experimentos são fáceis de serem observados através da morbidade das larvas (índice de saúde), mortalidade (curvas de sobrevivência), carga microbiana, além de análise histopatológica (JEMEL et al., 2020; TSAI; LOH; PROFT, 2016). Em contraste com os mamíferos, os insetos possuem apenas imunidade inata, que compartilha muitas características comuns com a defesa inata em vertebrados. A ausência de uma resposta adaptativa pode ser uma vantagem, pois permite ao pesquisador estudar em detalhes as interações do patógeno e a resposta imune inata sem interferência da resposta adaptativa (COOPER; ELEFTHERIANOS, 2017; VERTYPOROKH; WOJDA, 2020).

A cobertura do corpo do inseto é composta por uma única camada de epitélio (epiderme), que repousa sobre a membrana basal. O epitélio está envolvido na estrutura da cutícula, impregnada com quitina sendo este, protegido por um tegumento. Os órgãos internos de origem ectodérmica, como a traquéia, o intestino anterior e o intestino posterior, são cobertos por cutícula, protegendo os insetos dos patógenos. Se essas barreiras forem quebradas, os plasmatócitos e os granulócitos de *G. mellonella* são capazes de fagocitar os microrganismos invasores, enquanto corpos estranhos e alguns grupos de microrganismos maiores ficam presos em cápsulas e nódulos isolando os patógenos do resto do corpo do inseto (WOJDA, 2017). Além da resposta inata, os insetos também podem disparar cascatas enzimáticas complexas que regulam a melanização da hemolinfa que é sintetizada durante o processo de coagulação da hemolinfa no local da lesão além da produção de peptídeos antimicrobianos (KAVANAGH; SHEEHAN, 2018).

A resposta das larvas de *G. mellonella* à infecção por *C. albicans* e *A. fumigatus* demonstram uma forte correlação com os resultados obtidos com camundongos (SLATER et al., 2011). *G. mellonella*, tem demonstrado ser um excelente modelo para estudar a virulência de espécies de *Candida*, além disso, larvas também foram utilizadas para desenvolver modelos de infecção por *Cryptococcus*

neoformans (BRENNAN et al., 2002; COTTER; DOYLE; KAVANAGH, 2000; JACOBSEN, 2014; KAVANAGH; SHEEHAN, 2018).

No que tange às equinocandinas elas são consideradas antifúngicos muito potentes e representam a terapia de primeira linha para candidíase invasiva. Foi demonstrado que, além de sua atividade antifúngica direta, as equinocandinas também possuem efeitos imunomoduladores em *G. mellonella*. Dois estudos demonstram esse efeito (BURGWYN et al., 2016; KELLY; KAVANAGH, 2011). No estudo de Kelly e Kavanagh (2011), a caspofungina foi capaz de aumentar a sobrevivência em larvas infectadas por *C. albicans*, bem como estimular a resposta imune inata. Essa ação inespecífica protegeu as larvas de outros microrganismos não-fúngicos, como *S. aureus*. Da mesma forma, em um estudo semelhante, Burgwyn et al., (2016) demonstraram que a micafungina tem um efeito imunomodulador em *G. mellonella*, sendo que sua administração prévia foi capaz de proteger as larvas da infecção bacteriana (BURGWYN et al., 2016; KELLY; KAVANAGH, 2011).

2. JUSTIFICATIVA

As ICS constituem um dos tipos de infecção mais graves com altas taxas de morbimortalidade, principalmente quando associadas a dispositivos médicos implantados, e em especial, quando envolve a formação de biofilmes (CAROLUS; VAN DYCK; VAN DIJCK, 2019).

Biofilmes mono- e polimicrobianos exibem algumas diferenças quando comparados com as células planctônicas de mesma espécie, sendo a característica mais relevante a tolerância aumentada aos antimicrobianos, podendo ser até 1000 vezes mais resistentes, devido a certos fatores como a presença de uma matriz extracelular densa, mudanças no metabolismo celular e a regulação positiva das bombas de efluxo. Conseqüentemente, poucos antimicrobianos capazes de tratar infecções relacionadas ao biofilme estão disponíveis hoje (CAROLUS; VAN DYCK; VAN DIJCK, 2019). Desta forma, torna-se crucial o desenvolvimento de novas terapias, que atuem não somente nas células, como também na matrix extracelular.

Baseando-se nos trabalhos previamente publicados sobre a eficiência das equinocandinas no controle das infecções fúngicas por *Candida* e, também, na

atividade inibitória de enzimas bacterianas homólogas a β -1,3-glucana sintetase, este projeto visa avaliar a caspofungina para tratar infecções polimicrobianas de *C. albicans* e *S. aureus*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de antimicrobianos sobre células planctônicas e de biofilmes mono- e polimicrobianos de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Staphylococcus aureus*, bem como na infecção mista em *Galleria mellonella*.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Obter o perfil de suscetibilidade de células planctônicas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. aureus* aos antimicrobianos;
- 3.2.2 Determinar o perfil de virulência das cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. aureus* em modelo de invertebrado de *G. mellonella*;
- 3.2.3 Avaliar os biofilmes mono- e polimicrobianos de *C. albicans* e *S. aureus*;
- 3.2.4 Avaliar o efeito da caspofungina e outros antimicrobianos em biofilmes mono- e polimicrobianos de *C. albicans* e *S. aureus*;
- 3.2.5 Avaliar o efeito antimicrobiano da caspofungina em infecções mono- e polimicrobianas por *C. albicans* e *S. aureus* usando o modelo de invertebrado de *G. mellonella*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

As cepas de *Candida albicans* SC 5314 e *Candida albicans* IAL-40 foram cedidas gentilmente pela Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil), e *Candida glabrata* ATCC 2001, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e ATCC 6538 (ambas MSSA – *Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*) foram cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Segurança (INCQS, Fiocruz, Rio de Janeiro/RJ, Brasil). *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 e ATCC 33591 (ambas MRSA – *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) foram gentilmente

cedidas pela Dra. Eliana Harue Endo da Universidade Estadual de Maringá (UEM, Maringá, Paraná) e o isolado clínico de *Staphylococcus aureus* ST5 foi cedido pelo Prof. Dr. Nilton Lincopan do departamento de Microbiologia (ICB/USP) (Tabela 1).

4.2 Condições de cultivo e estocagem das cepas de *Staphylococcus aureus*

As cepas de *Staphylococcus aureus* estão estocadas em caldo de soja tripticaseína (TSB, Difco) com 20% de glicerol em freezer a -80°C e recuperadas em agar de soja tripticaseína (TSA, Difco). Durante os ensaios as cepas foram mantidas em TSA a 4°C e subcultivadas em TSB pelo menos 2 vezes a 35°C durante 18h para obtenção de um ótimo crescimento bacteriano (Tabela 1).

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

As leveduras foram estocadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco) com 20% de glicerol em freezer a - 80°C e recuperadas em meio Sabouraud dextrose. Durante os ensaios, as amostras foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose (ASD, Difco) a 4°C e subcultivadas no mesmo meio pelo menos 2 vezes a 35°C por 24 - 48 h para obtenção de um ótimo crescimento fúngico (Tabela 1).

Tabela 1. Cepas de *Candida* spp. e *Staphylococcus aureus* utilizadas neste trabalho.

Cepas	Origem	Estocagem durante os	Condições de Crescimento
<i>C. albicans</i> SC5314	IAL	ASD a 4 °C	CSD, 24h a 35°C
<i>C. albicans</i> IAL-40	IAL	ASD a 4 °C	CSD, 24h a 35°C
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	INCQS, Fiocruz	ASD a 4 °C	CSD, 24h a 35°C
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	INCQS, Fiocruz	TSA a 4 °C	TSB, 18h a 35°C
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	INCQS, Fiocruz	TSA a 4 °C	TSB, 18h a 35°C
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	Dra. Eliana Harue Endo (UEM)	TSA a 4 °C	TSB, 18h a 35°C
<i>S. aureus</i> ATCC 33591	Dra. Eliana Harue Endo (UEM)	TSA a 4 °C	TSB, 18h a 35°C
<i>S. aureus</i> ST 5	Prof. Nilton Lincopan (ICB/USP)	TSA a 4 °C	TSB, 18h a 35°C

IAL: Instituto Adolfo Lutz; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Segurança (INCQS, Fiocruz, Rio de Janeiro/RJ, Brasil); ICB: Instituto de Ciências Biomédicas; UEM: Universidade Estadual de Maringá; ASD: Ágar Sabouraud Dextrose; CSD: Caldo Sabouraud Dextrose; TSA: Ágar de soja tripticaseína; TSB: Caldo de Soja tripticaseína.

4.4 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão

Para a determinação do perfil suscetibilidade de células planctônicas de *S. aureus* aos antibacterianos foi realizado o ensaio de disco-difusão, seguindo as normas descritas pelo documento M7-A10 (CLSI, 2015a). Os critérios de interpretação foram utilizados de acordo com o estabelecido pelo documento M100S25 (CLSI, 2015b). Foram testados discos de oito diferentes classes de antibacterianos que se encontram listados em cinco grupos de antimicrobianos indicados para testes de rotina nos laboratórios clínicos de acordo com o CLSI (2015b): Cefoxitina (30µg), Eritromicina (15µg), Clindamicina (2µg), Tetraciclina (30µg), Ciprofloxacina (5µg), Cloranfenicol (30µg), Gentamicina (10µg), Amicacina (30µg), Sulfanamida (300µg), Trimetoprim (5µg). Todos os discos usados foram adquiridos da Sensifar- Cefar, Diagnóstica, São Paulo, Brasil (Tabela 2) e estavam estocados a 4°C. O experimento foi realizado em duplicata e repetido em dois dias diferentes.

Tabela 2. Antibacterianos e critérios de interpretação usados para o teste de disco-difusão sobre microrganismos não fastidiosos (documento M100-S24 - CLSI, 2015b).

Grupo	Antimicrobiano (classe química)	Conteúdo do disco	Critério interpretativo do halo de inibição (mm)		
			S	I	R
A	Cefoxitina (Cefalosporina)	30 µg	≥22	-	≤21
A	Eritromicina (Macrolídeo)	15 µg	≥23	14-22	≤13
A	Clindamicina (Lincosamida)	2 µg	≥21	15-20	≤14
B	Tetraciclina (Tetraciclina)	30 µg	≥19	15-18	≤14
C	Ciprofloxacina (Fluoroquinolona)	5 µg	≥21	16-20	≤15
C	Cloranfenicol (Fenicol)	30 µg	≥18	13-17	≤12
C	Gentamicina (Aminoglicosídeo)	10 µg	≥15	13-14	≤12
O	Amicacina (Aminoglicosídeo)	30 µg	≥17	15-16	≤14
U	Sulfanamida (Antifolato)	300 µg	≥17	13-16	≤12
U	Trimetoprim (Antifolato)	5 µg	≥16	11-15	≤10

Nota: Grupo A, Teste e relatório primários; Grupo B, Teste primário e relatório seletivo; Grupo C, agentes antimicrobianos alternativos ou suplementares que podem exigir testes nas instituições que abrigam cepas endêmicas ou epidêmicas resistentes a várias drogas principais; Grupo O ("outros"), possuem indicação clínica específica para alguns grupos de organismos, mas não são candidatos a testes e relatórios rotineiros pelo CLSI; Grupo U, agentes antimicrobianos administrados apenas ou principalmente para o tratamento de infecções do trato urinário. Critério de interpretação – R, Resistente; I, Intermediário; S, Sensível.

Para realização do ensaio foi preparado uma suspensão bacteriana em PBS (*Phosphate buffered saline*) contendo $1-2 \times 10^8$ UFC/mL e espalhada em toda a superfície da placa de Petri contendo ágar Müller-Hinton com 4 mm de espessura. Posteriormente, os discos foram adicionados e incubados a 35°C por 18h. A leitura foi realizada utilizando paquímetro digital (Socinter Sul[®]), onde a medida do halo de inibição foi definida como o diâmetro da ausência de crescimento microbiano em volta do disco. Os antibacterianos usados e os critérios de interpretação dos resultados estão descritos na Tabela 2.

4.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de microdiluição em caldo sobre células planctônicas (PCIM)

Para a determinação da concentração inibitória mínima (PCIM) dos antimicrobianos foi realizado o ensaio de microdiluição em caldo conforme metodologia

preconizada no documento M27-4ed. (CLSI, 2017) para *Candida* spp. e M7-A10 (CLSI, 2015) para *S. aureus*.

Preparo dos antimicrobianos: Anfotericina B (AMB), Caspofungina, (CAS), Micafungina (MFG), Voriconazol (VRC), Fluconazol (FLC) e Vancomicina (VCM) (todos da Sigma Aldrich Co., MO, USA) foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) ou água destilada estéril (para FLC), para obter soluções estoque 100 x concentrado e armazenados a -20°C para serem utilizados nos ensaios.

Preparo dos inóculos: Leveduras de *Candida* spp. previamente cultivadas em CSD foram centrifugadas a 5.500 rpm durante 10 min, o sobrenadante foi descartado as células foram ressuspensas em PBS, e o inóculo foi ajustado para a concentração de 1×10^6 UFC/mL usando a contagem em câmara de Neubauer. Posteriormente diluições foram realizadas, a fim de obter a concentração de $1-5 \times 10^3$ UFC/mL em meio RPMI 1640 tamponado com 0,165 M de ácido 3-morfolinopropano-1-sulfônico (MOPS) (=RPMI).

S. aureus foi cultivado em TSB e após crescimento, centrifugado a 5.500 rpm durante 10 min e ressuspensado em PBS, posteriormente o ajuste da suspensão foi realizado utilizando espectrofotômetro (Epoch microplate reader, Biotek) em comprimento de onda de 625 nm acrescentando-se PBS até se obter densidade ótica de 0,08 a 0,10, ($1 - 2 \times 10^8$ UFC/mL) que é equivalente a turbidez da escala 0,5 McFarland.

O ensaio: Diluições seriadas dos antimicrobianos a fim de obter concentrações finais de 0,03 a 16 µg/mL para AMB, CAS, MFG, VRC, de 0,125 a 64 µg/mL para FLC e de 1 a 512 µg/mL para VCM foram realizados em meio RPMI em microplacas de 96 poços de poliestireno e de fundo chato. Em seguida, um volume de 100 µL da suspensão de *Candida* spp. ($1-5 \times 10^3$ UFC/mL) foi dispensado em cada poço para obtenção do inóculo final de $0,5-2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

Para o ensaio de sensibilidade de *S. aureus*, foram utilizados os meios de cultura RPMI, RPMI suplementado com 2% de NaCl e 2% glicose (=RPMI sup) e Caldo Müller-Hinton (meio de cultura preconizado pelo CLSI, 2012). Os antimicrobianos MFG, CAS e VCM foram diluídos nestes meios de cultura para obtenção das concentrações finais de 1 a 512 µg/mL para as equinocandinas e 0,5 a 256 µg/mL para VCM. Em

seguida, uma suspensão bacteriana previamente padronizada ($1-2 \times 10^6$ UFC/mL) foi dispensada em cada poço para obtenção do inóculo final de $0,5-1 \times 10^6$ UFC/mL. As microplacas de 96 poços foram incubadas a 35°C por 24 h para *Candida* spp. e 18 h para *S. aureus*.

Interpretação dos resultados: Os critérios de interpretação dos resultados foram de acordo com o estabelecido pelo documento M100S25 (CLSI, 2015) para *S. aureus* e M27-4ed. (CLSI, 2017) para *Candida* spp. A concentração inibitória mínima (CIM) de cada antimicrobiano foi definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir 90% (para AMB; PCIM₉₀) e 50% do crescimento microbiano (para CAS, MFG, FLC, VRC e VCM; PCIM₅₀). Os dados de PCIM, para *Candida* spp., foram obtidos após a leitura visual e confirmados determinando a densidade ótica no espectrofotômetro a 492 nm (Epoch microplaca reader, Biotek). O ensaio foi realizado em duplicata e em dois dias distintos. O valor final de PCIM foi atribuído à média modal para cada antimicrobiano.

Determinação da concentração fungicida/bactericida mínima: Subsequente ao teste de microdiluição em caldo, uma alíquota de 10 μ L de cada concentração que foi capaz de inibir o crescimento microbiano foi cultivada em ASD para fungo ou TSA para bactéria, ambos livres de antimicrobianos, por 24-48 h a 35°C para determinar a menor concentração que não houve crescimento microbiano (redução de >99,9% da viabilidade), definindo a concentração fungicida mínima (CFM) ou concentração bactericida mínima (CBM). Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos em dias diferentes.

4.5 Virulência de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Staphylococcus aureus* em modelo de *Galleria mellonella*

Previamente aos primeiros experimentos realizados com *G. mellonella*, o cultivo e manutenção das larvas foi padronizado pelo nosso grupo de pesquisa (DE BASTIANI, 2018). Inicialmente, as mariposas foram incubadas dentro de recipiente plástico com papel filtro em uma câmara incubadora a 30°C . Os ovos foram retirados e acondicionados em novos recipientes, onde foi adicionada cera e pólen. Após a eclosão das larvas, estas foram inspecionadas periodicamente até atingir o peso e o tamanho ideal para os ensaios. Durante este período, os recipientes foram limpos e a cera e o pólen foram repostos, além dos resíduos (fezes) serem retirados do recipiente.

Com a finalidade avaliar a virulência de todas as cepas de *S. aureus* e *Candida* spp., utilizamos o modelo de invertebrado *Galleria mellonella*. As lagartas foram selecionadas no último estágio larval (7ª. instar), com tamanho variando de 2,0 a 2,5 cm de comprimento e peso corporal de 150 a 200 mg (FRENKEL et al., 2016).

Previamente a infecção, as lagartas foram submetidas a assepsia com álcool 70° GL e foram inoculados 10µL do inóculo padronizado em PBS (1-2 10⁹ UFC/mL para *S. aureus* e 1-2 x 10⁷ UFC/mL para *Candida* spp.) na última *pro-leg* com o auxílio de microseringa Hamilton[®] (Hamilton Company, Nevada, USA). Para o grupo controle não infectado, foi injetado 10 µL de PBS estéril como controle do veículo dos microrganismos e da injúria mecânica (grupo PBS). Após infecção as lagartas foram mantidas em placa de Petri de poliestireno descartáveis de 140x15mm e foram adicionados pólen e cera de abelha. Todos os grupos de *G. mellonella* (n = 20 larvas/grupo) foram monitorados a cada 24 h após a inoculação para a contagem de larvas sobreviventes e a avaliação da saúde das larvas, durante 5 dias. A taxa de morbidade foi avaliada usando o *score* de pontuação proposto por Loh e colaboradores (2013), que avalia o estado de saúde das larvas, atribuindo pontuações de acordo com 4 características principais: mobilidade das larvas, formação de casulos, melanização e sobrevivência (tabela 3) (LOH et al., 2013).

Tabela 3. Características avaliadas e pontuação atribuída para determinação do índice de saúde das larvas (LOH et al., 2013).

Categoria	Descrição	Pontuação
Mobilidade	Sem movimento	0
	Mínimo movimento quando estimulada	1
	Movimento quando estimulada	2
	Movimento sem estímulo	3
Formação de casulo	Sem formação	0
	Formação parcial	0,5
	Casulo completo	1
Melanização	Larvas pretas	0
	Larva preta com pontos marrons	1
	≥3 pontos pretos em larva bege	2
	<3 pontos pretos em larva bege	3
	Sem melanização	4
Sobrevivência	Viva	2
	Morta	0

Após as observações diárias das larvas, curvas de sobrevivência e de morbidade foram construídas e os dados analisados estatisticamente.

4.6 Padronização do biofilme monomicrobiano de *Candida albicans* e *Candida glabrata*

Para padronizar a formação de biofilmes por *C. albicans* SC 5314 e *C. glabrata* ATCC 2001 foram utilizadas duas estratégias:

- (1) Suspensão fúngica a $1-2 \times 10^7$ UFC/mL em meio RPMI e RPMI suplementado com 2% de glicose e 2% de NaCl (=RPMI sup) para *C. albicans* e *C. glabrata* e;
- (2) Suspensão fúngica a $1-2 \times 10^6$ UFC/mL em meio RPMI para *C. albicans*.

Após a padronização do inóculo fúngico uma alíquota de 100 μ L foi dispensada nos poços da microplaca de 96 poços de fundo chato e de poliestireno. As placas foram incubadas por 96 h a 35°C sob agitação de 150 rpm (PIERCE et al., 2008). Após cada período de 24 h de incubação por até 96 h, o sobrenadante foi retirado e os biofilmes foram lavados com PBS para remoção das células não aderentes, em seguida, a biomassa total dos biofilmes foi quantificada pela técnica de coloração com cristal violeta (Ver item 4.10). Esse ensaio foi realizado em quadruplicata e repetido em três momentos diferentes.

De acordo com os valores pré-estabelecidos Marcos Zambrano et al., (2014) as cepas de *Candida* spp. foram classificadas através da técnica de cristal violeta e leitura em espectrofotômetro de acordo com sua produção de biomassa total como alta ($\geq 1,17$), intermediária (0,44 – 1,17) e baixa ($>0,44$) formadoras de biofilme (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014).

4.7 Padronização do biofilme monomicrobiano de *Staphylococcus aureus*

Para padronizar a formação de biofilmes de *S. aureus* foram utilizadas duas estratégias:

- (1) A suspensão foi padronizada a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL utilizando meio RPMI e RPMI sup;
- (2) A suspensão foi padronizada a $1-2 \times 10^6$ UFC/mL utilizando meio RPMI.

A padronização da suspensão bacteriana foi realizada utilizando espectrofotômetro para obter o inóculo de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL posteriormente foi realizada uma diluição de 1:100 para obter uma suspensão bacteriana de $1-2 \times 10^6$ UFC/mL. Uma alíquota de 100 μ L do inóculo bacteriano foi dispensada nos poços da microplaca de 96 poços de fundo chato e de poliestireno, incubadas a 35 °C, sob agitação a 150 rpm, por 96 h (KEAN et al., 2017). A biomassa total do biofilme foi quantificada a cada 24 h pela técnica de coloração com cristal violeta (Ver item 4.10). Esse ensaio foi realizado em quadruplicata e repetido em três momentos diferentes.

As cepas de *S. aureus* foram classificadas de acordo com sua produção de biomassa total através da técnica de cristal violeta com posterior avaliação por espectrofotômetro. De acordo com os critérios observados por Xu et al., as cepas foram classificadas como alta ($\geq 0,408$), intermediária ($\geq 0,204$ e $< 0,408$) e baixa ($< 0,204$) formadoras de biofilmes (XU et al., 2016; YOUSEFI et al., 2016).

4.8 Padronização dos biofilmes polimicrobianos de *Candida albicans/Candida glabrata* e *Staphylococcus aureus*

Os biofilmes polimicrobianos foram formados utilizando as seguintes estratégias:

- (1) Incubou-se ao mesmo tempo 100 μ L da suspensão de *C. albicans* SC5314 ou *C. glabrata* ATCC 2001 ($1-2 \times 10^7$ UFC/mL) com 100 μ L da suspensão de *S. aureus* ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL) em meio RPMI ou RPMI sup;
- (2) Incubou-se ao mesmo tempo 100 μ L da suspensão de *C. albicans* SC5314 com 100 μ L da suspensão de *S. aureus* ambos padronizados a $1-2 \times 10^6$ UFC/mL em meio RPMI.

As microplacas foram incubadas por um período total de 96 h a 35 °C, sob agitação a 150 rpm e as leituras realizadas após cada período de 24 h. Para isso, o sobrenadante foi retirado e os biofilmes lavados com PBS para remoção das células não aderidas. A quantificação da biomassa total dos biofilmes mistos foi realizada pelo ensaio de coloração com cristal violeta (Ver item 4.10). Os experimentos foram realizados em quadruplicata e repetidos três vezes, em dias diferentes.

As cepas de *Candida* spp. e de *S. aureus* assim como o meio de cultura e o tamanho do inóculo foram escolhidos para os próximos experimentos após a análise

dos dados obtidos dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, virulência em modelo de *G. mellonella* e da padronização dos biofilmes mono- e polimicrobianos.

4.9 Teste de sensibilidade dos biofilmes monomicrobianos e polimicrobianos de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos

Para a determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos sobre os biofilmes (BCIM) foi realizado o ensaio de microdiluição, utilizando as cepas de *C. albicans* (SC5314 e IAL-40) e de *S. aureus* ATCC 29213, ATCC 6538 e ATCC 33591. Os inóculos microbianos foram padronizados seguindo duas estratégias:

- (1) A suspensão de *S. aureus* foi padronizada a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL e *C. albicans* foi padronizada a $1-2 \times 10^7$ UFC/mL utilizando meio RPMI;
- (2) Ambas as suspensões foram padronizadas a $1-2 \times 10^6$ UFC/mL em meio RPMI.

Após a padronização do inóculo microbiano uma alíquota de 100 μ L foi dispensada na microplaca de 96 poços de fundo chato de poliestireno; para os biofilmes polimicrobianos 200 μ L foram dispensados, sendo 100 μ L de cada microrganismo. A microplaca foi incubada a 35 °C, sob agitação a 150 RPM para formação dos biofilmes.

4.9.1 Ação dos antimicrobianos sobre a formação dos biofilmes

A fim de avaliar também o biofilme logo após a fase de adesão, definimos o tempo de tratamento após 1,5h de incubação (fase de aderência), para isso sobrenadante foi retirado, e o fundo de cada poço lavado com 100 μ L de PBS para remoção das células não aderidas. Subsequentemente as células foram tratadas com os antimicrobianos AMB, MFG, CAS ou VCM nas concentrações de 0,125 a 256 μ g/mL diluídos em meio de cultura RPMI e incubados por 24 h, 35 °C, sob agitação a 150 rpm. Após o tratamento os biofilmes foram lavados com PBS e quantificados pela técnica de cristal violeta (Ver item 4.10).

4.9.2 Ação dos antimicrobianos sobre o biofilme pré-formado

Após 24 h de incubação (biofilme maduro), o sobrenadante foi retirado e os biofilmes foram lavados com 100 μ L de PBS, para remoção das células não aderidas,

em seguida foram tratados com AMB, MFG, CAS ou VCM nas concentrações de 0,125 a 256 µg/mL diluídos em RPMI e incubados por 24 h a 35 °C, sob agitação a 150 rpm e, posteriormente quantificados pela técnica de cristal violeta (Ver item 4.10).

Para a realização de ambos os ensaios (biofilme maduro e em formação) foram utilizados dois controles: apenas meio RPMI (controle negativo de crescimento) e o controle positivo (biofilme sem tratamento antimicrobiano), para avaliar o crescimento e compará-lo com os biofilmes tratados. Os ensaios foram realizados em quadruplicata e em pelo menos 3 momentos distintos.

4.10 Quantificação da biomassa total dos biofilmes

A biomassa total dos biofilmes bacterianos, fúngicos e mistos foi quantificada pela técnica de coloração com cristal violeta (CV) (O'TOOLE, 2011). Após o período de incubação (1,5; 24; 48; 72 e 96 h) os biofilmes foram lavados com 100 µL de PBS e fixados com 100 µL de metanol durante 15 min. Em seguida, o metanol foi retirado e as placas foram deixadas abertas por 2 min para evaporar o fixador. Posteriormente, 100 µL de uma solução 0,1% (v/v) de CV foi adicionada a cada poço. Após 20 min, o excesso de CV foi removido e as placas foram lavadas uma vez com 200 µL de água destilada. Por fim, a descoloração do CV do biofilme foi feita pela adição de 100 µL de ácido acético 33% (v/v) (Sigma Aldrich). Após 5 min alíquotas de 80 µL de cada poço foram transferidas para uma nova microplaca e a absorbância da fase aquosa foi medida em 590 nm (LUIZ et al., 2015).

Após a coleta dos dados de absorbância foi calculado as concentrações que inibem 50% e 90% do biofilme (BCIM₅₀ e BCIM₉₀, respectivamente) comparando com o biofilme sem tratamento, seguindo a fórmula: $100 - \left[\frac{\text{absorbância tratado} \times 100}{\text{absorbância não tratado}} \right]$. Os valores finais de BCIM₅₀ e BCIM₉₀ foram atribuídos média modal de cada antimicrobiano.

4.11 Avaliação da viabilidade celular nos biofilmes mono- e polimicrobianos após a adição de antimicrobianos

Para avaliar a viabilidade celular do biofilme após a fase de adesão (1,5h) mono- e polimicrobiano de *C. albicans* SC5314 e *S. aureus* (ATCC 29213, ATCC 6538 e ATCC 33591), ambos os inóculos foram padronizados para a concentração de $1-2 \times 10^6$ UFC/mL em meio RPMI, e 100 µL dispensados em uma microplaca de poliestireno

de 96 poços e incubados a 35 °C sob agitação de 150 rpm durante 1,5h. Posteriormente, foi adicionado 100 µL de PBS e retirado em seguida para remoção das células não aderidas. O antifúngico CAS previamente padronizado nas concentrações de 2, 8, 32 ou 128 µg/mL em meio RPMI foi adicionado na microplaca contendo as células aderidas, e a microplaca foi incubada por 24 h a 35 °C sob agitação de 150 rpm. Cada grupo (tratado e não tratado) foi realizado em quadruplicata e em 3 dias distintos.

Após este período de 24h os biofilmes foram lavados, e 100 µL de PBS foi adicionado e o biofilme retirado por raspagem com o auxílio de uma ponteira estéril e transferido para um microtubo de 1,5 mL e sonicado em banho ultrasônico a 42 Khz por 5 min. Diluições seriadas de 1:10 em PBS foram realizadas e uma lícota de 10µL de cada diluição foi plaqueada na superfície de ágar Sabouraud dextrose agar contendo 50 µg/mL de cloranfenicol ou em ágar Sal Manitol para quantificar as células viáveis de *C. albicans* e *S. aureus*, respectivamente, incubada a 35°C durante 24 h. Para cada grupo (tratado e não tratado) e cada diluição, o plaqueamento foi realizado em duplicata para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) para o cálculo de UFC/mL. Por fim, os resultados de UFC/mL foram expressos na função logarítmica de base 10 (Log UFC/mL).

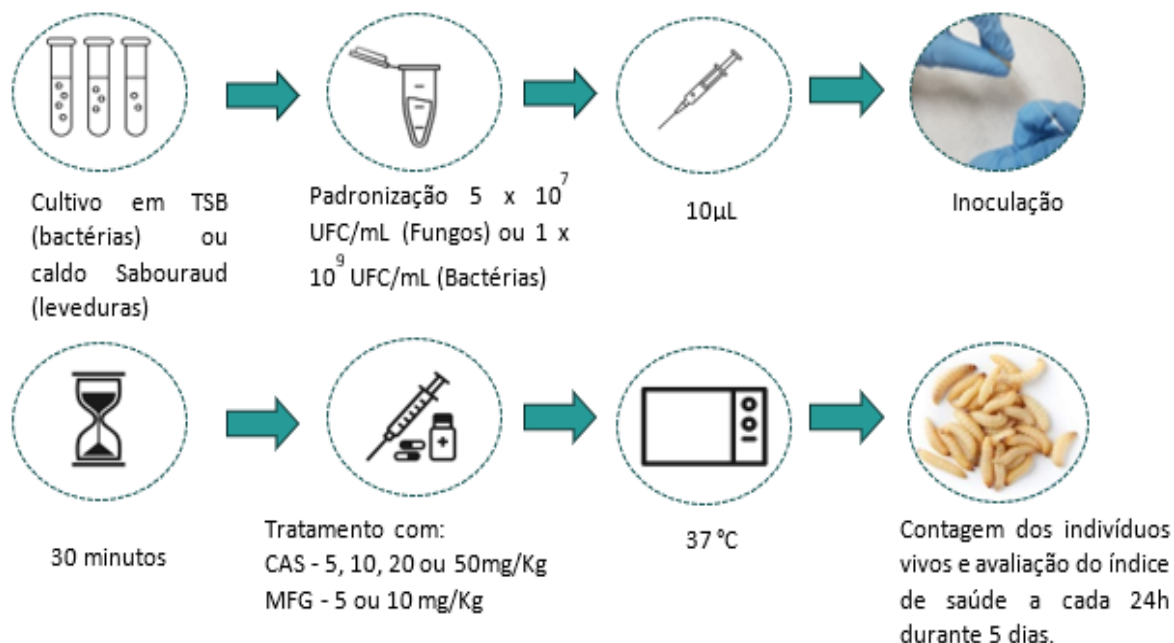
4.12 Avaliação da eficácia das equinocandinas no controle da infecção mono- e polimicrobiana por *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* em larvas de *Galleria mellonella*

Para a realização deste ensaio foram selecionadas larvas no final do estágio do desenvolvimento larval (2,0 cm a 2,5 cm de comprimento e 150 mg a 200 mg de peso corporal). *Candida albicans* SC 5314 previamente cultivada em CSD por 24 h a 35 °C foi padronizada utilizando PBS na concentração de 5×10^7 UFC/mL. As cepas de *S. aureus* ATCC 29213, ATCC 33591 e ATCC 6538 foram previamente cultivadas em TSB por 18h a 35 °C e padronizadas em PBS na concentração de 1×10^9 UFC/mL. Para as suspensões mistas, foi preparado um inóculo em PBS na concentração 1×10^8 UFC/mL para *C. albicans* e 2×10^9 UFC/mL e *S. aureus* e transferido 200µL de cada suspensão para um tubo. Desta forma a concentração das suspensões utilizadas foram as mesmas da infecção monomicrobiana.

Posteriormente à padronização dos inóculos, 10 µL das suspensões mono- ou polimicrobianas foram inoculadas na última pro-leg da larva com o auxílio de seringa Hamilton (KAVANAGH; SHEEHAN, 2018; MARCOS-ZAMBRANO et al., 2020). Após 30 min da infecção foi iniciado o tratamento com a administração de MFG (5 e 10mg/kg) ou CAS (5, 10, 20 e 50 mg/kg) para a infecção monomicrobiana de *C. albicans*; e CAS 20 e 50 mg/kg para o tratamento das infecções monomicrobianas por *S. aureus* e polimicrobianas de *C. albicans* e *S. aureus*. Larvas infectadas e não tratadas (grupo não tratado) e larvas não infectadas e que receberam PBS (grupo PBS), também foram inoculadas PBS após 30 min, sendo consideradas grupos controles do ensaio. Para cada grupo foi utilizado um total de 20 larvas e incubadas a 37 °C. O esquema de infecção e tratamento pode ser verificado na figura 3.

A sobrevivência das larvas foi monitorada a cada 24 h por até 5 dias após a infecção e tratamentos para a construção da curva de sobrevida. Paralelamente, as larvas sobreviventes foram avaliadas quanto a sua movimentação, formação de casulo e a melanização; e a curva de morbidade foi construída seguindo o modelo de notas em que o índice de saúde das larvas é calculado como a somatória dos critérios avaliados como mostrado na Tabela 3. Quanto maior o índice de saúde (nota máxima de 10) mais saudável está a larva (LOH et al., 2013).

Figura 3. Representação esquemática da infecção e tratamento usando o modelo de invertebrado *Galleria mellonella*.



4.13. Análise da carga fúngica em larvas de *Galleria mellonella*

A análise da carga microbiana foi realizada após 24h do início do tratamento das larvas. Para isso, 4 larvas de cada grupo foram pesadas e o tecido foi macerado e homogeneizado em 1 mL de PBS estéril seguido por diluições seriadas 1:10 dos homogenatos e em seguida, plaqueadas em ágar Sabouraud dextrose contendo cloranfenicol (50 μ g/mL) para detecção de *C. albicans* e em Ágar Salt Manitol para detecção de *S. aureus*, posteriormente as placas foram incubadas a 37°C por 24 h para obtenção do número de unidades formadoras de colônia por grama de larva (UFC/g).

4.14. Análise histopatológica

No 1º dia após o início do tratamento, 2 larvas de cada grupo foram escolhidas de forma aleatória, e acondicionadas em um tudo contendo formaldeído 4% em PBS para a preparação do corte histológico e coloração com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico no aumento de 400x (DM750, Leica, São Paulo), e a carga microbiana foi observada e semi-quantificada de acordo com a escala: 0) nenhum; +) limitado; ++) médio; +++)) alto e ++++)) muito alto (Tabela 4)(QUINTELLA et al., 2011).

Tabela 4. Análise semi-quantitativa de carga microbiana nos cortes histológicos (baseado em QUINTELLA et al., 2011).

Carga microbiana	Crítérios
0	Sem microrganismos
+	Até cinco elementos por secção
++	De seis elementos por secção a cinco por campo com alta ampliação (x400)
+++	De 6 a 50 por campo com alta ampliação (x400)
++++	Mais de 50 por campo em alta ampliação (x400)

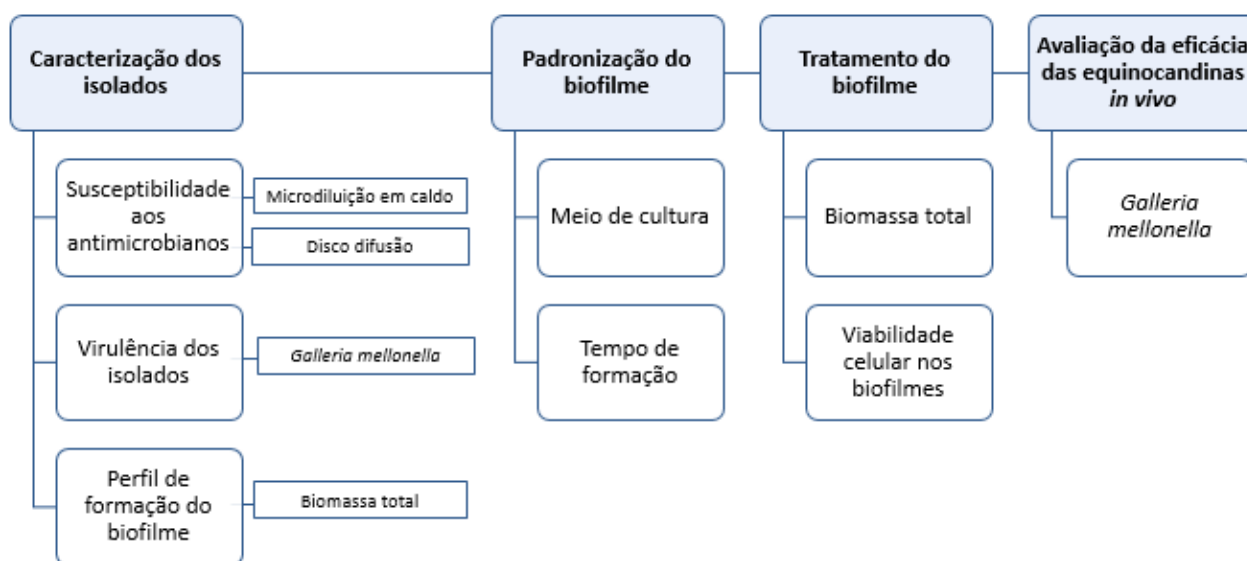
4.15 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Graphpad Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA). As curvas da cinética de formação dos biofilmes foram analisadas pelo método Anova one-way (*Tukey's Multiple Comparison Test*). As curvas de sobrevivência de *G. mellonella* foram analisadas pelo método *Survival analysis* Log-rank (Mantel-Cox) Test, e as curvas de morbilidade foi analisada por Two-way Anova. Os dados de viabilidade celular e formação de biomassa total dos biofilmes foram analisados por Anova one-way seguido por *Dunnett's multiple comparisons test*. Os dados de avaliação da carga fúngica foram analisados pelo método Anova Two-way.

4.16 Fluxograma

O fluxograma de trabalho pode ser apreciado na figura 4, que mostra as principais etapas do trabalho bem como as estratégias utilizadas para cumprí-las.

Figura 4. Representação esquemática das etapas experimentais para o desenvolvimento da dissertação de mestrado intitulada “Caspofungina no tratamento de infecção mista por *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*”.



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Suscetibilidade de *Candida* spp. aos antimicrobianos

Nesse trabalho foram definidas as menores concentrações que inibem 50% e 90% (PCIM₅₀ e PCIM₉₀, respectivamente) do crescimento das células planctônicas de *C. albicans* (SC5314 e IAL-40) e *C. glabrata* ATCC 2001 pelos antifúngicos AMB, FLC, VRC, CAS e MFG. Ambas as cepas foram susceptíveis a todos os antifúngicos testados, exceto *C. albicans* IAL-40 e *C. glabrata* ATCC 2001, considerados resistente e suscetível dose-dependente ao FLC, respectivamente (Tabela 5).

Os dados apresentados corroboram com outros estudos publicados recentemente pelo nosso grupo de pesquisa tanto para AMB quanto para FLC (DE FREITAS et al., 2018; MUÑOZ et al., 2017). Vila et al. (2016) avaliaram a ação da CAS frente os isolados de *C. albicans* SC5314 e *C. glabrata* ATCC 2001, e os resultados apresentados foram semelhantes aos observados neste estudo.

O antibacteriano VCM não apresentou atividade inibitória sobre o crescimento de *C. albicans* e *C. glabrata*, mesmo na maior concentração testada (512 µg/mL) (Tabela 5) corroborando com dados previamente publicados, onde VCM não apresentou atividade contra *C. albicans* (HARRIOTT; NOVERR, 2009).

Tabela 5. Suscetibilidade de leveduras de *Candida albicans* (SC 5314 e IAL-40) e *Candida glabrata* ATCC 2001 aos antimicrobianos. Concentração Inibitória Mínima (PCIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) estão expressos em µg/mL.

Antimicrobianos	<i>C. albicans</i> SC5314			<i>C. albicans</i> IAL-40			<i>C. glabrata</i> ATCC 2001		
	PCIM ₅₀	PCIM ₉₀	CFM	PCIM ₅₀	PCIM ₉₀	CFM	PCIM ₅₀	PCIM ₉₀	CFM
Anfotericina B	0,06	0,125	<0,25	0,5	0,5	1	0,06	0,12	0,25
Micafungina	<0,03	0,03	0,06	0,25	0,25	0,25	<0,03	<0,03	0,25
Caspofungina	0,06	0,25	16	0,125	0,125	2	0,25	1	1
Voriconazol	0,125	<0,125	0,25	0,25	0,25	16	0,5	2	128
Fluconazol	0,06	0,25	0,5	64 ^R	64	>64	0,5 ^{SDD}	2	16
Vancomicina	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512

PCIM₅₀: menor concentração que inibe 50% do crescimento microbiano; PCIM₉₀: menor concentração que inibe 90% do crescimento microbiano; R: resistente; SDD: suscetível dose-dependente.

Em um estudo prévio comparando CAS e AMB através de uma análise duplo-cego com 224 pacientes incluindo pacientes com neutropenia para determinar a eficácia de CAS no tratamento candidíase invasiva e, mais especificamente, da candidemia (MORA-DUARTE et al., 2002). Os resultados sugerem que a CAS foi superior à AMB, e a porcentagem de pacientes com desfecho favorável foi maior neste grupo, sendo a CAS alternativa eficaz, além de menos tóxica, quando comparado a AMB para o tratamento da candidíase invasiva (MORA-DUARTE et al., 2002). Kuse e colaboradores (2007), demonstraram através de testes randomizados que MFG e AMB lipossomal, tem eficácia semelhante para o tratamento de candidemia e candidíase invasiva, entretanto MFG tem um perfil de segurança melhor em termos de função renal, eventos relacionados à infusão e distúrbios eletrolíticos, e assim como o tratamento com CAS, apresentou menos efeitos adversos (BEN-AMI, 2018; KUSE et al., 2007). E por essa atividade demonstrada as equinocandinas são consideradas atualmente os antifúngicos de primeira escolha no tratamento de candidemias, candidíase disseminada e infecções relacionadas a formação de biofilmes (PAPPAS et al., 2016; PFALLER et al., 2019).

5.2 Suscetibilidade de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos

Staphylococcus aureus MRSA ATCC 33591 e MRSA ATCC 43300 foram consideradas multirresistentes (MDR, *multi drug resistance*) (Tabela 6), ou seja, cepas que apresentam resistência a três ou mais classes de antimicrobianos ou ainda quando ocorre a resistência a um antibacteriano chave (MAGIORAKOS et al, 2011). Tais isolados bacterianos possuem relevância para a saúde pública, por frequentemente demonstrar resistência cruzada a diversas classes de antimicrobianos. Um exemplo utilizado neste estudo é a sigla MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) para caracterizar isolados de *S. aureus* resistentes a meticilina, tal sigla remete imediatamente ao seu significado epidemiológico, tornando seu perfil de resistência facilmente identificável. As cepas de *S. aureus* MSSA ATCC 29213 e MSSA ATCC 6538 foram sensíveis a todos os antibacterianos testados e a cepa ST 5 demonstrou resistência apenas para cefoxitina sendo considerada uma cepa MRSA (Tabela 6).

Para avaliar a concentração inibitória mínima (PCIM) dos antifúngicos CAS e MFG e do antibiótico VCM sobre células planctônicas de *S. aureus*, foram utilizados diferentes meios de cultura no ensaio de microdiluição em caldo, usando Caldo Müller-Hinton, meio RPMI e RPMI suplementado com 2% de NaCl e 2% de glicose (RPMIsup). A concentração bactericida mínima (CBM) também foi avaliada (Tabela 7).

De modo geral não houve diferença entre os valores de PCIMs de CAS e VCM determinados nestes 3 meios de cultura; para CAS foi observado menores valores de PCIM em meio CMH, por outro lado, valores de PCIM foram similares em meio RPMI e RPMIsup (Tabela 7).

VCM demonstrou ação inibitória contra *S. aureus* de 0,5 até 2 µg/mL (PCIM₉₀). Segundo o CLSI (2015b) o ponto de corte para caracterização dos isolados de *S. aureus* é ≤ 2 µg/mL para cepas sensíveis, a faixa intermediária é de 4 a 8 µg/mL, e a faixa de resistência é ≥ 16 µg/mL, desta forma todas as cepas utilizadas neste projeto foram caracterizadas como sensíveis para VCM. VCM foi bactericida a partir da concentração de 0,5 a 32 µg/mL para todas as cepas de *S. aureus* (Tabela 7).

Tabela 6. Suscetibilidade de *Staphylococcus aureus* aos antibacterianos determinada pelo ensaio de disco-difusão.

Antibacterianos	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
	MRSA	MRSA	MRSA	MSSA	MSSA
	ATCC 33591	ATCC 43300	ST5	ATCC 29213	ATCC 6538
Oxacilina	R	R	R	S	S
Cefoxitina	R	R	R	S	S
Clindamicina	R	R	I	S	S
Sulfanamida	R	S	S	S	S
Trimetoprim	S	R	S	S	S
Gentamicina	R	R	S	S	S
Amicacina	R	S	S	S	S
Tetraciclina	R	S	S	S	S
Eritromicina	R	R	S	S	S
Cloranfenicol	R	S	S	S	S
Ciprofloxacina	I	S	S	S	S

Critério de interpretação – R, Resistente; I, Intermediário; S, Sensível.

Tabela 7. Valores de concentração inibitória mínima de 50% e 90% (PCIM50 e PCIM90, respectivamente) e da concentração bactericida mínima (CBM) das equinocandinas (caspofungina – CAS e micafungina – MFG) e da vancomicina (VCM) sobre células planctônicas de *Staphylococcus aureus*. Resultados obtidos pela técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento M7-A10 (CLSI, 2015) e os valores de concentração estão expressos em µg/mL.

		ATCC 29213			ATCC 6538			ATCC 33591			ATCCC 43300			ST5		
Meios		PCIM ₅₀	PCIM ₉₀	CBM	PCIM ₅₀	PCIM ₉₀	CBM	PCIM ₅₀	PCIM ₉₀	CBM	PCIM ₅₀	PCIM ₉₀	CBM	PCIM ₅₀	PCIM ₉₀	CBM
CAS	CMH	16	32	64	8	16	32	16	16	64	16	16	64	32	32	128
	RPMI Sup	64	64	256	32	32	128	64	128	512	32	64	512	128	128	>512
	RPMI	16	32	256	16	16	64	32	64	256	32	64	512	32	64	512
MFG	CMH	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
	RPMI Sup	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
	RPMI	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
VCM	CMH	1	1	1	0,5	0,5	1	1	1	2	1	1	2	1	1	16
	RPMI Sup	2	2	8	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	32
	RPMI	1	1	8	0,5	0,5	2	1	1	2	1	1	2	2	2	16

CMH: caldo Müller-Hinton; RPMI: meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16 M; RPMIsup: meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16 M e suplementado com 2% de NaCl e 2% de glicose

Apesar da disponibilidade de vários agentes antibacterianos estruturalmente diferentes, a terapia mais frequentemente usada para o tratamento de infecções por MRSA continua sendo os antibióticos glicopeptídicos, em especial a VCM (GARDETE; TOMASZ, 2014). A VCM é um inibidor da síntese do peptidoglicano, ligando-se com forte afinidade e alta especificidade aos precursores de peptidoglicano expostos à face externa, impedindo o acesso das transpeptidases e transglicosilases responsáveis pela reticulação desses precursores, contudo, seu espectro de ação é limitado aos organismos Gram-positivos e alguns anaeróbios, de modo que suas principais indicações são infecções causadas por *S. aureus* produtoras de β -lactamase, e colite causada por *Clostridium difficile* (BAMBEKE, 2004; BLAIR et al., 2015; REYNOLDS, 1989).

Todas as cepas *S. aureus* mostraram-se susceptíveis a CAS de 8 $\mu\text{g/mL}$ até 128 $\mu\text{g/mL}$ (PCIM₅₀), e 32 a 128 $\mu\text{g/mL}$ (PCIM₉₀) para ambos os meios testados (RPMI e RPMIsup). Interessantemente, CAS demonstrou ação bactericida para *S. aureus*, de 64 a 512 $\mu\text{g/mL}$ (CBM), exceto para a cepa ST 5 em que foi observado recrescimento mesma na maior concentração testada para o meio RPMIsup, entretanto, para os demais meios, ST 5 não apresentou recrescimento em 128 a 512 $\mu\text{g/mL}$. Por outro lado, MFG não demonstrou ação antibacteriana contra nenhuma das cepas testadas de *S. aureus*, mesmo na maior concentração (512 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 7).

Siala et al. (2016), descreveram a ação inibitória da CAS em células planctônicas de cepas de *S. aureus*, incluindo a MRSA ATCC 33591, utilizada em nossos ensaios; os resultados indicaram que houve 50% de inibição do crescimento na concentração de 80 até 160 $\mu\text{g/mL}$, corroborando com os resultados encontrados neste estudo.

Os autores ainda evidenciaram que a CAS inibe a ação da enzima N-acetilglucosamina transferase bacteriana que é codificada pela operon *ica* formado por quatro genes (*icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*). Mais especificamente, N-acetilglucosamina transferase é codificada por *icaA* e sua função é catalisar a adição de novos monômeros de N-acetilglucosamina ao polímero em crescimento na parede celular de *S. aureus*, estando presente também na matriz dos biofilmes

formados (GERKE et al., 1998; LITTLE et al., 2014; SIALA et al., 2016). Portanto, embora inesperada, a inibição da *IcaA* bacteriano pela CAS pode ser determinada pelo fato de ser um homólogo da β -1-3-glucano sintetase, o alvo fúngico das equinocandinas (SIALA et al., 2016).

Similarmente, Rogiers et al. (2018) observaram a inibição da produção de N-acetil-glucosamina por *S. aureus* em biofilmes quando tratados por anidulafungina, entretanto para as células planctônicas, os autores deste estudo não observaram redução, mesmo na maior concentração testada de 16 μ g/mL (ROGIERS et al., 2018).

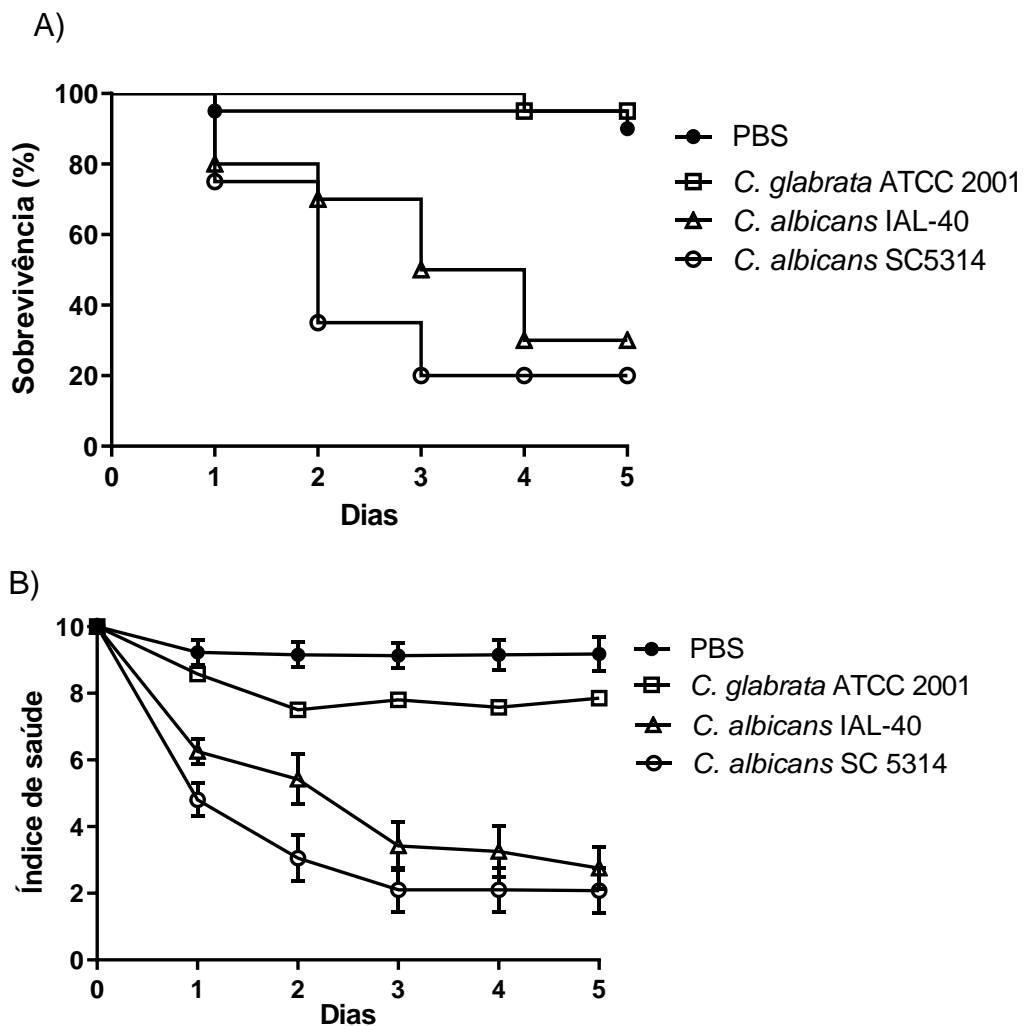
5.3 Virulência de *Candida albicans* e *Candida glabrata* em modelo de *Galleria mellonella*

A virulência de *Candida* spp. foi avaliada utilizando o modelo experimental de invertebrado *G. mellonella* e de acordo com os resultados obtidos, as larvas infectadas com *C. albicans* SC5314 tiveram taxa de sobrevivência de apenas 20% após 5 dias de observação, corroborando com os resultados obtidos no ensaio de morbidade (Figura 5). Por outro lado, a infecção por *C. glabrata* ATCC 2001 levou a uma taxa de sobrevivência de 90%, não apresentando diferença significativa quando comparado ao grupo controle não infectado (PBS) (Figura 5). Os dados de virulência destas duas cepas corroboraram com os resultados anteriormente (DE BASTIANI, 2018; SPADARI et al., 2019). A virulência de *C. albicans* IAL-40 foi avaliada previamente pelo nosso grupo de pesquisa apresentando perfil de mortalidade e de morbidade semelhante às aquelas causadas pela cepa SC5314 (DE BASTIANI, 2018; SPADARI et al., 2019).

Cotter, Doyle e Kavanagh (2000) avaliaram se seria possível usar o modelo de invertebrado de *G. mellonella* para avaliar a patogenicidade de diversas espécies de *Candida*. Para este estudo uma variedade de espécies de *Candida*, comumente associadas a doenças em humanos foram selecionadas (COTTER; DOYLE; KAVANAGH, 2000). Os resultados foram obtidos após 72h da inoculação das larvas na concentração de 2×10^7 UFC/mL, onde foi observado a mortalidade de 90% de *G. mellonella* infectada com *C. albicans*; para as outras espécies de *Candida* foi observado mortalidades de 70% para *C. tropicalis*, 45 % para *C. parapsilosis* e *C.*

pseudotropicalis, 20% para *C. krusei* e nenhuma mortalidade para *C. glabrata* (COTTER; DOYLE; KAVANAGH, 2000). Em um segundo ensaio, Cotter, Doyle e Kavanagh (2000) inocularam *C. albicans*, 2×10^7 UFC/mL, entretanto as leveduras foram previamente inativadas por calor e de acordo com os dados obtidos as taxas de mortalidade foram de 20%. Estes achados sugerem que a mortalidade das larvas ocorreu devido a patogenicidade de *C. albicans*, e não devido ao início de uma reação alérgica à presença de um grande número de células de levedura na hemolinfa (COTTER; DOYLE; KAVANAGH, 2000).

Figura 5. Curvas de sobrevivência (A) e de morbidade (B) de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com leveduras de *Candida albicans* SC5314 ou *Candida glabrata* ATCC 2001.



As larvas foram infectadas com 1×10^5 UFC/larva e incubadas a 37 °C durante 5 dias e observadas a cada período de 24 h. Houve diferença estatística entre as larvas infectadas com leveduras de *C. albicans* quando comparadas com as larvas

não infectadas (grupo PBS). *** $p < 0,001$ (Log-rank, Mantel-Cox Test para sobrevivência e *two-way* ANOVA para a mortalidade).

Brennan et al. (2002), demonstraram a equivalência de *G. mellonella* e modelo de infecção sistêmico em murinos por *C. albicans*; o estudo apresentado demonstra que ambos os modelos corroboram, pois as diferenças na virulência entre as cepas utilizadas (N= 13) foram semelhantes em ambos os modelos, desta forma, é cada vez mais interessante a possibilidade de reduzir a utilização de mamíferos para testar a virulência de fungos ao utilizar *G. mellonella* como mecanismo primário de triagem (BRENNAN et al., 2002). Assim como reportado para outros modelos de infecção fúngica como a criptococose, aspergilose, esporotricose e outros (TREVIJANO-CONTADOR; ZARAGOZA, 2019).

5.4 Virulência de *Staphylococcus aureus* em modelo de *Galleria mellonella*

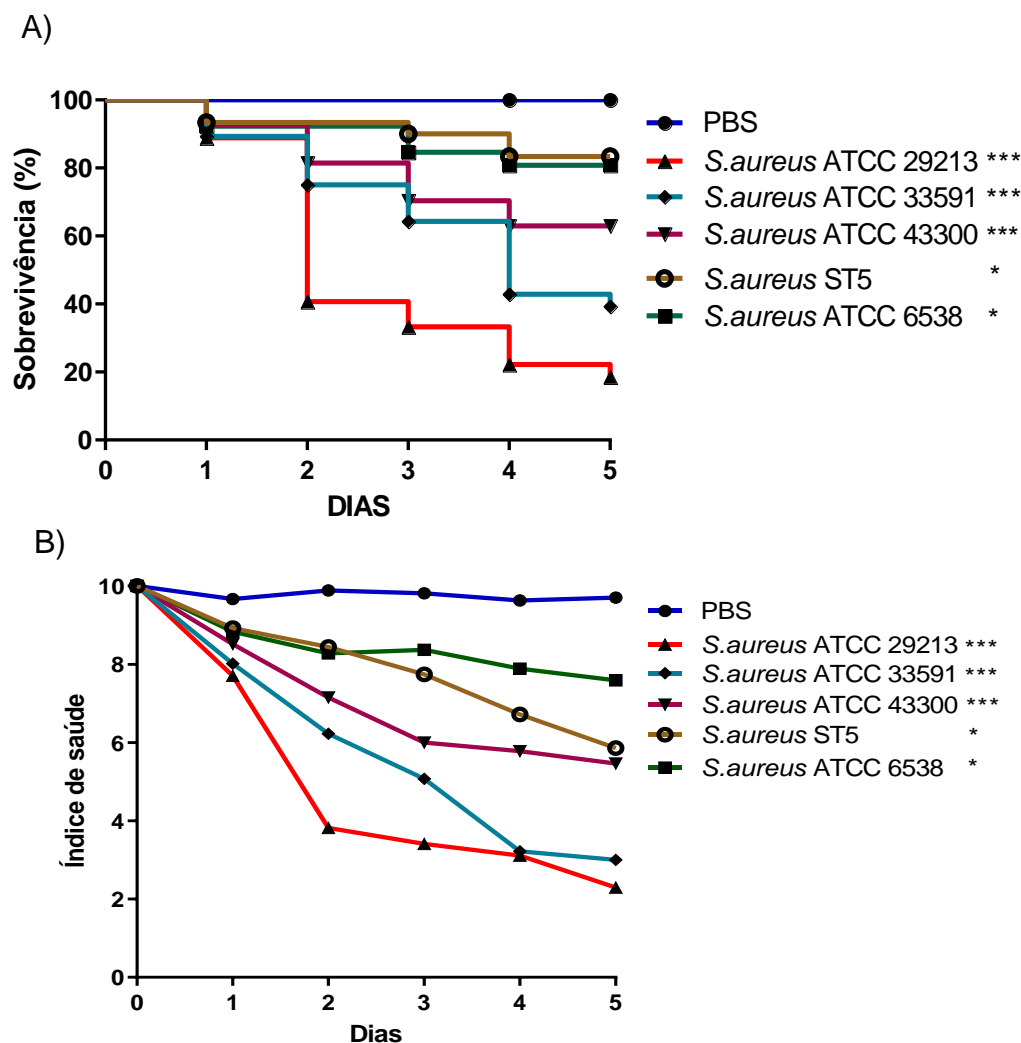
S. aureus ATCC 29213 mostrou-se mais virulenta, causando mortalidade em 82% das larvas ($p < 0,001$) após 5 dias da infecção, corroborando com os resultados obtidos por Peleg et al. (2009) onde as larvas de *G. mellonella* apresentaram mortalidade similar com o mesmo inóculo utilizado; seguida por ATCC 33591 e ATCC 43300 onde a taxa de mortalidade foi de 61% e 38% ($p < 0,001$), respectivamente, apresentando virulência intermediária. As cepas de *S. aureus* ATCC 6538 e ST5 foram consideradas as menos virulentas (Figura 6A); corroborando com os dados de morbidade (Figura 6B).

Estudos prévios relataram correlações entre os resultados de virulência obtidos com o modelo de *G. mellonella* e aqueles obtidos com camundongos (BRENNAN et al., 2002; COTTER; DOYLE; KAVANAGH, 2000; DONG et al., 2017). Estes resultados mostram que *G. mellonella* pode ser efetivamente usada para facilitar o estudo *in vivo* da virulência de *S. aureus* e, mais especificamente, a relação entre a resistência a antibióticos e a patogênese da infecção (PELEG et al., 2009).

De acordo com os resultados obtidos não foi possível estabelecer uma relação direta entre a virulência dos isolados e a susceptibilidade aos antimicrobianos, a cepa considerada mais virulenta foi cepa *S. aureus* ATCC 29213

que é MSSA, seguida por *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA), ATCC 43300 (MRSA) e as menos virulentas ATCC 6538 (MSSA) e ST 5 (MRSA). O mesmo foi observado por Desbois e Coote (2011), onde em seu estudo utilizaram duas cepas: *S. aureus* Newman (MSSA) e *S. aureus* BB270 (MRSA), sendo que as taxas de sobrevivência da larvas de *G. mellonella* foram semelhantes em ambas as cepas, confirmando que, apesar de mais resistente, não é possível estabelecer uma correlação entre a virulência e suscetibilidade aos antimicrobianos (DESBOIS; COOTE, 2011).

Figura 6. Curvas de sobrevivência (A) e de morbidade (B) de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Staphylococcus aureus*.



As larvas de *G. mellonella* foram infectadas com $1-2 \times 10^7$ UFC/larva e incubadas a 37°C durante 5 dias. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ comparados individualmente com o grupo não infectado PBS (Log-rank, Mantel-Cox Test para sobrevivência e *two-way* ANOVA para a mortalidade).

Estes estudos anteriormente publicados sugerem que o modelo murino possa ser substituído pelo modelo de *G. mellonella* para avaliar não só a virulência das cepas e fungos e bactérias, mas também para estudar os mecanismos de patogênese da doença infecciosa bem como realizar triagem de novos compostos para o tratamento (AMORIM-VAZ et al., 2015) seguindo os princípios dos 3 R's como previamente sugerido por Russell-Burch (1959) de “redução, substituição e refinamento” (do inglês: *Reduction, Replacement and Refinement*) no uso de animais de laboratório (RUSSELL; BURCH, 1959).

5.5 Padronização dos biofilmes monomicrobianos de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* em diferentes meios de cultura

Os biofilmes monomicrobianos foram formados em meio de cultura RPMI e RPMIsup por um período de 96h a 35°C, sob agitação a 150 rpm, sendo avaliados a cada 24 h pela técnica de cristal violeta.

Biofilmes de *C. albicans* monomicrobianos atingiram a maturidade após 24 h de incubação permanecendo constante até o período de 96 h. A biomassa do biofilme apresentou densidade ótica (D.O) variando entre 3,3 e 3,7; além disso, não foi observado diferença estatística entre a formação do biofilme em RPMI e em RPMIsup, demonstrando que a suplementação do meio de cultura é irrelevante para *C. albicans* (Figura 7A).

Ao avaliar a formação de biofilmes de *S. aureus* nos meios RPMI e RPMIsup, nos períodos de 24, 48, 72 e 96 h, definimos o tempo de leitura dos biofilmes para posterior tratamento em 24 h, pois trata-se de biofilme maduro. Avaliamos também se a suplementação do meio de cultura seria relevante para promover a formação de biofilmes por *S. aureus* e de acordo com os dados obtidos não houve diferença estatística significativa entre os meios suplementado e não suplementado, exceto para a cepa ATCC 6538, em que o meio suplementado promoveu maior formação do biofilme quando comparado ao meio não suplementado ($p < 0,05$) (Figuras 7B-F).

Trabalhos prévios estudaram o papel da suplementação com glucose e/ou cloreto de sódio no meio de cultura para formação do biofilme, por induzir a produção de um dos principais componentes da matriz extracelular do biofilme de *S.*

aureus: o polissacarídeo poli-N-acetilglucosamina também conhecida como poli-N-acetil- β - (1-6) -glucosamina (PIA/PNAG) e é um componente importante dos biofilmes de *S. aureus* (BROOKS; JEFFERSON, 2014; SIALA et al., 2016). As enzimas relacionadas a síntese de PIA/PNAG são codificadas por genes contidos no operon de *Ica*, que em contrapartida é controlado por fatores ambientais e nutricionais (BROOKS; JEFFERSON, 2014). Entretanto, segundo Croes S. et al. (2009), a indução da formação de biofilmes está mais relacionada ao genótipo da cepa de *S. aureus* do que com a presença de nutrientes no meio externo. Desta forma, a suplementação do meio tem papel irrelevante para o ensaio de CIM e CBM (CROES et al., 2009).

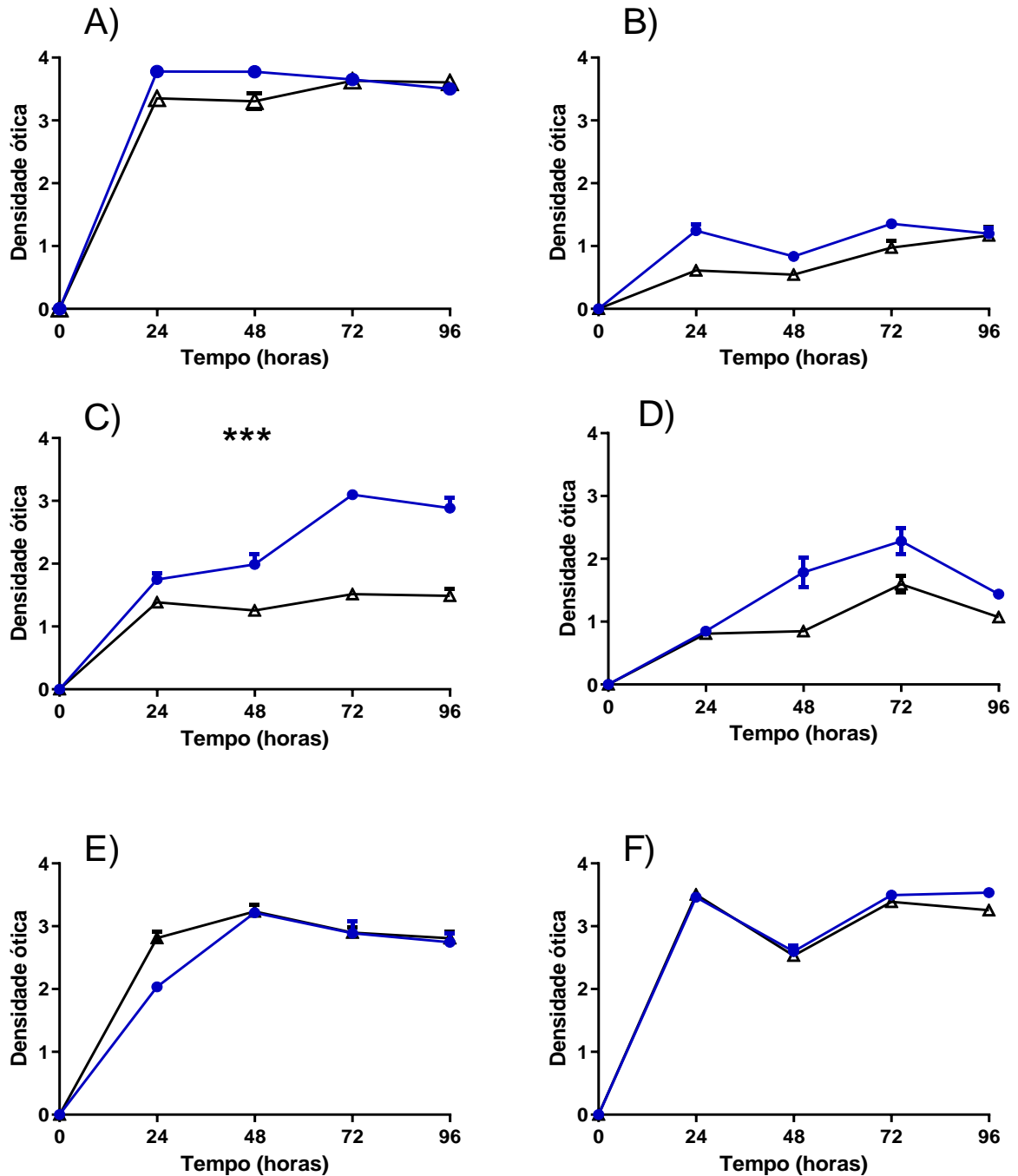
A importância do operon *ica* para a produção de biofilmes de *S. aureus* também parece ser controverso na literatura. Beenken et al. (2004) demonstraram que a deleção do locus *ica* em um isolado clínico humano UAMS-1 de *S. aureus* não teve impacto sobre o desenvolvimento do seu biofilme. Em contraste, a mutação do gene *sarA* em *S. aureus* UAMS-1 resultou em capacidade prejudicada de formação de biofilme (BEENKEN et al., 2004). Em um ensaio semelhante, Gara (2007) observou que a formação de biofilme independente de *ica* foi possível em todos os isolados clínicos testados (N=4) de *S. aureus* MRSA mutantes para o operon *ica*, quando comparados com a mesma cepa não mutante. A expressão do operon *ica* é dependente da proteína SarA, um dos principais reguladores globais de diversos fatores determinantes de virulência em *S. aureus*, que se liga ao promotor do operon *ica* com alta afinidade e regula positivamente a sua expressão (GARA, 2007).

Em um estudo recente Flannery et al. (2020), avaliaram a produção e qual seria o principal constituinte do biofilme de uma cepa de *S. aureus* (BH 1CC Δ *ica*) mutante para o operon *ica*, em comparação com a mesma cepa sem mutação (*wild type*-WT), usando diferentes meios de cultura. Os autores observaram que, houve uma leve diminuição da formação de biofilme, em aproximadamente 16%, 13% e 2% quando cultivado em BHI, BHI com glicose e BHI com NaCl, respectivamente, mas essas diferenças não foram significativas, quando comparado com o *S. aureus* WT. Conforme esperado, o principal constituinte do biofilme de *S. aureus* BH1CC Δ *ica*, era composto de DNA extracelular e proteínas (FLANNERY et al., 2020).

Em estudo recente Neopane et al. (2018), analisaram 43 isolados clínicos de *S. aureus* quanto a formação de biofilmes e a incidência de resistência aos antimicrobianos. 69% dos isolados apresentaram capacidade de formar biofilmes, sendo que dentre essas, 86% eram multirresistente e 43% foram identificadas como MRSA. Dentre as cepas que não produziam biofilmes a presença de multirresistência não foi observada, confirmando a relação entre a produção de biofilmes e a incidência de resistência (NEOPANE et al., 2018). Dados semelhantes foram observados com os isolados usados neste projeto, classificando-os em ordem decrescente, as cepas de *S. aureus* que mais produziram biofilmes no período de 24h foram: ST 5, ATCC 43300, ATCC 33591, ATCC 6538 e ATCC 29213, sendo as 3 melhores produtoras consideradas MRSA e as demais, consideradas MSSA (Figura 7B-F).

A partir dos dados obtidos neste ensaio é possível concluir também, que a suplementação do meio de cultura com glicose/NaCl não possui papel muito relevante no perfil de suscetibilidade de *S. aureus* aos antimicrobianos avaliados (Tabela 7) bem como na produção de biofilmes (Figura 7). Desta forma, RPMI não suplementado foi o meio escolhido para os experimentos seguintes.

Figura 7. Cinética da formação de biofilmes monomicrobianos de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* em meio de cultura RPMI 1640 tamponado com 0,165 M MOPS não suplementado (RPMI, Linha preta) e suplementado com 2% de glicose e 2% de NaCl (RPMIsup, Linha azul) em agitação a 150 rpm a 35 °C.



A) *C. albicans* SC5314; **B)** *S. aureus* ATTC 29213; **C)** *S. aureus* ATTC 33591; **D)** *S. aureus* ATTC 6538; **E)** *S. aureus* ATTC 43300; **F)** *S. aureus* ST5.

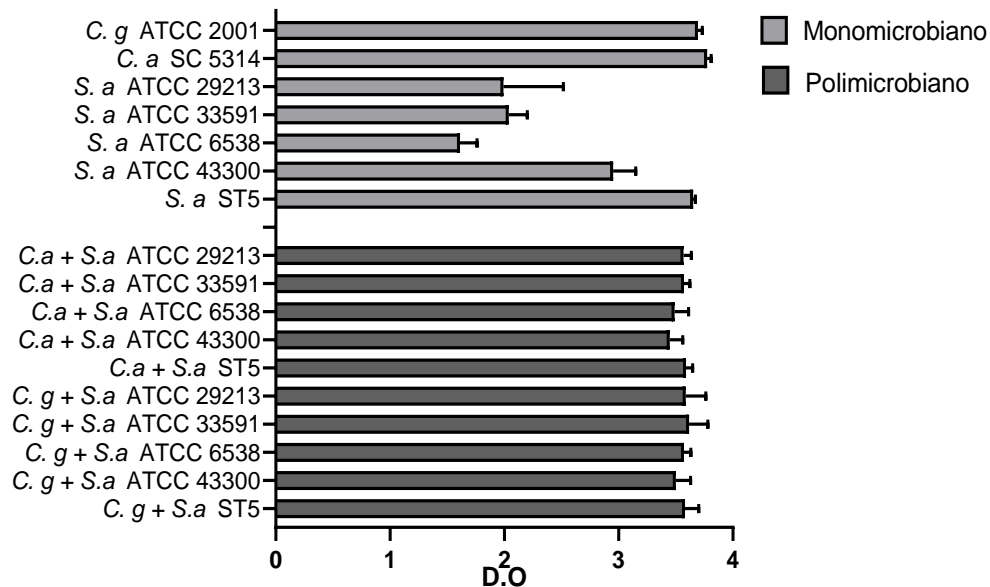
5.6 Padronização dos biofilmes mistos de *Candida albicans* / *Candida glabrata* e *Staphylococcus aureus*

Após a padronização dos biofilmes monomicrobianos, avaliamos a formação do biofilme polimicrobiano das cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, ATCC 6538, ATCC 33591, ATCC 43300 ou ST5 com *Candida albicans* SC5314 ou com *Candida glabrata* ATCC 2001. Os biofilmes monomicrobianos e polimicrobianos foram produzidos em meio RPMI sem suplementação a 35°C por 24 h e sob agitação a 150 rpm. Os maiores formadores de biofilme foram *C. albicans* e *C. glabrata* e foram considerados de alta formação segundo Marcos-Zambrano et al. 2014 (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014). Dentre *S. aureus*, no período de 24h, as cepas ST 5 e ATCC 43300 produziram maior biomassa total do biofilme, seguidas pelas cepas ATCC 33591, ATCC 6538 e ATCC 29213. Mas segundo os critérios sugeridos por Xu et al. (2016), todas as cepas de *S. aureus* podem ser consideradas de alta formação de biofilmes (XU et al., 2016). Enquanto os biofilmes polimicrobianos formados por *C. albicans* e *S. aureus* e os biofilmes produzidos por *C. glabrata* e *S. aureus* foram semelhantes aos biofilmes monomicrobianos de *C. albicans* e *C. glabrata*, respectivamente (Figura 8).

Após a padronização dos biofilmes mono- e polimicrobianos escolhemos para os ensaios posteriores as cepas de *S. aureus* ATCC 29213, ATCC 33591 e ATCC 6538 de acordo com os seguintes critérios: suscetibilidade aos antimicrobianos e perfil de virulência em *G. mellonella*. As 3 cepas foram boas formadores de biofilmes, entretanto a cepa ATCC 29213 é MSSA e de alta virulência, ATCC 33591 é MRSA e possui virulência intermediária, enquanto a cepa ATCC 6538 é MSSA e possui baixa virulência.

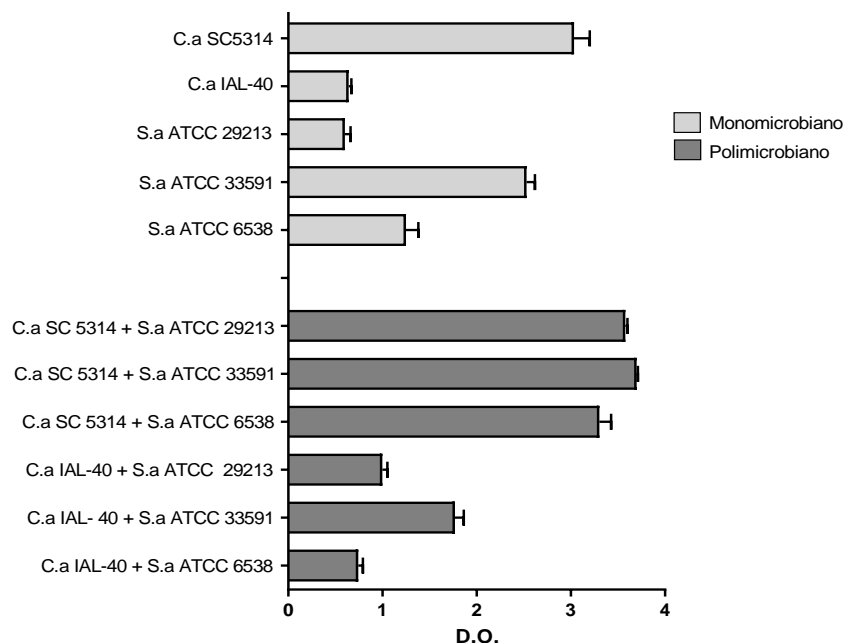
A partir disso avaliamos, também, a formação do biofilme mono- e polimicrobiano usando suspensão de 10^6 UFC/mL para *Candida albicans* (SC 5314 e IAL-40) e para *S. aureus* por 24 h, sob as mesmas condições de incubação anteriores. Assim como foi observado em biofilmes polimicrobianos formados com inóculos maiores de *C. albicans* e *S. aureus*, estes foram semelhantes aos biofilmes monomicrobianos de *C. albicans* (Figura 9). Vale ressaltar que a cepa IAL-40 (resistente ao FLC) forma um biofilme menor quando comparado a SC5314, refletindo também em um biofilme misto menor (Figura 9).

Figura 8. Biomassa total de biofilmes mono- e polimicrobianos de *Candida albicans* (SC5314), *Candida glabrata* (ATCC 2001) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213, ATCC 6538, ATCC 33591, ATCC 43300 e ST5).



Os biofilmes foram quantificados pela técnica de cristal violeta, após 24 h de incubação a 35°C, 150 rpm. O inóculo utilizado foi de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL para *S. aureus* e de $1-2 \times 10^7$ UFC/mL para *Candida* spp. C.a., *Candida albicans*; C.g., *Candida glabrata*; S.a., *Staphylococcus aureus*; D.O., densidade ótica.

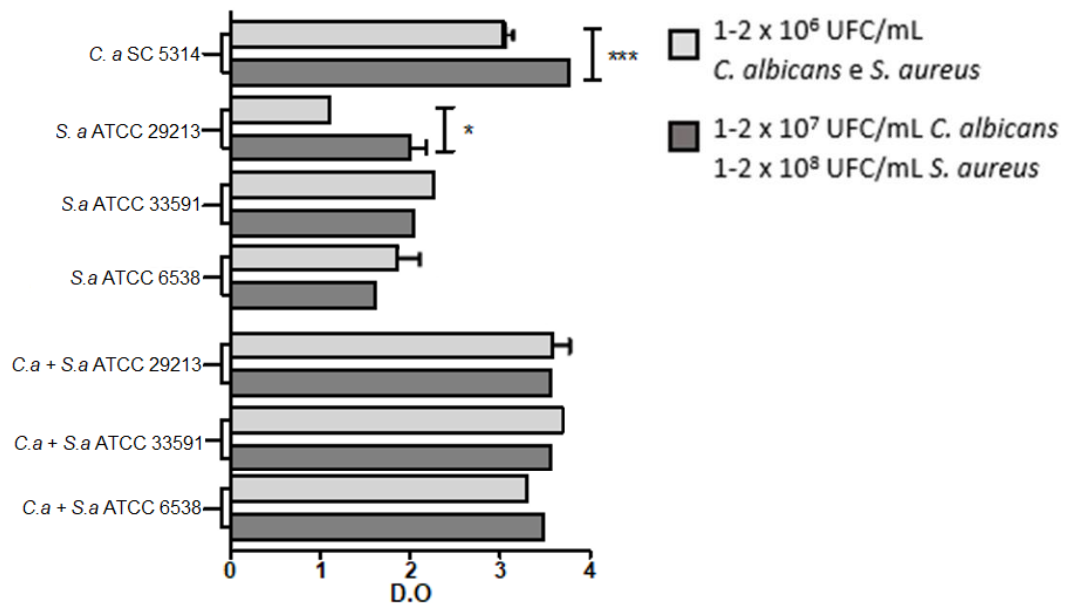
Figura 9. Biomassa total de biofilmes mono- e polimicrobianos de *Candida albicans* (SC5314 e IAL) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213, ATCC 33591 e ATCC 6538).



Os biofilmes foram quantificados pela técnica de cristal violeta, após 24 h de incubação a 35°C, 150 rpm. O inóculo utilizado foi de $1-2 \times 10^6$ UFC/mL para *Staphylococcus aureus* (S.a.) e *Candida albicans* (C.a.). D.O., densidade ótica.

Avaliamos se há diferença estatística entre os biofilmes mono- e polimicrobianos formados com os inóculos $1-2 \times 10^7$ ou $1-2 \times 10^6$ para *C. albicans* e $1-2 \times 10^8$ ou $1-2 \times 10^6$ para *S. aureus* (ATCC 29213, ATCC 33591 e ATCC 6538), e de acordo com os dados obtidos a redução do inóculo foi estatisticamente significativa somente para os biofilmes monomicrobianos de *C. albicans* ($p < 0,001$) e de *S. aureus* ATCC 29213 ($p = 0,0241$). Em contrapartida não foi significativo para *S. aureus* ATCC 6538 e ATCC 33591 e para todos os biofilmes polimicrobianos ($p > 0,05$) (Figura 10).

Figura 10. Comparação da biomassa total entre os biofilmes mono- e polimicrobianos de *Candida albicans* (SC5314) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213, ATCC 6538 e ATCC 33591) usando diferentes concentrações microbianas.



Os inóculos utilizados foram de $1-2 \times 10^6$ ou $1-2 \times 10^8$ UFC/mL para *S. aureus* e de $1-2 \times 10^6$ ou $1-2 \times 10^7$ UFC/mL para *C. albicans*. C.a., *Candida albicans*; S.a., *Staphylococcus aureus*; D.O., densidade ótica. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$

Assim, de acordo com os resultados obtidos nos ensaios de virulência e teste de sensibilidade aos antimicrobianos selecionamos as cepas de *C. albicans* SC 5314 e IAL-40 para dar continuidade aos nossos ensaios, pois exibiram alta virulência e resistência (IAL-40 resistente ao FLC). Embora *C. glabrata* ATCC 2001 seja um isolado formador de biofilmes mono- e polimicrobiano, este apresentou baixa virulência no modelo de *G. mellonella* além de não possuir resistência a nenhum dos antifúngicos testados,

5.7 Teste de Suscetibilidade dos biofilmes monomicrobianos e polimicrobianos de *Candida albicans* e *S. aureus* aos antimicrobianos

Avaliamos a ação dos antimicrobianos sobre os biofilmes mono- e polimicrobianos em formação e sobre os biofilmes pré-formados (1,5 e 24 h de incubação, respectivamente) de *C. albicans* SC 5314 e IAL-40, *S. aureus* ATCC 6538, ATCC 29213 e ATCC 33591 usando dois inóculos microbianos diferentes: $1-2 \times 10^7$ UFC/mL e $1-2 \times 10^8$ UFC/mL para *C. albicans* e *S. aureus*, respectivamente; e $1-2 \times 10^6$ UFC/mL para ambos os microrganismos.

5.7.1 Ação dos antimicrobianos sobre a formação dos biofilmes

As células aderidas por 1,5 h de *C. albicans* SC 5314 ($1-2 \times 10^7$ UFC/mL) e *S. aureus* ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL) foram tratados com diferentes concentrações dos antimicrobianos CAS, MFG, AMB ou VCM (0,125 a 256 µg/mL). Houve inibição (BCIM₅₀) da formação do biofilme monomicrobiano de *C. albicans* SC 5314 em concentrações de 0,125 até 0,5 µg/mL para os antifúngicos AMB, CAS e MFG, porém não foi observada inibição da formação dos biofilmes usando o antibiótico VCM (Tabela 8).

Por outro lado, *S. aureus* tratados com antifúngicos foi observada inibição de 50% sobre os biofilmes em formação (BCIM₅₀) de 8 até 256 µg/mL de AMB, de 8 a 64 µg/mL (BCIM₅₀) para CAS (Tabela 8). Entretanto, a MFG não apresentou ação sobre o biofilme em formação nem mesmo na maior concentração testada (256 µg/mL) corroborando com o ensaio de Suscetibilidade de células planctônicas (Tabela 7). Ao tratarmos com VCM, observamos BCIM₅₀ a partir de 2 até 8 µg/mL e BCIM₉₀ a partir de 4 até 16 µg/mL (Tabela 8).

Para os biofilmes polimicrobianos em formação cultivados nas mesmas condições acima, foi verificada inibição BCIM₅₀ na concentração de 64 µg/mL para os antifúngicos AMB e CAS (Tabela 8), e apesar de MFG possuir ação sobre a formação de biofilmes de *C. albicans* (0,125 µg/mL; BCIM₅₀), não foi observada inibição mesmo na maior concentração testada sobre os biofilmes mistos (256 µg/mL) (Tabela 8).

Ao reduzir o inóculo para $1-2 \times 10^6$ UFC/mL de leveduras e bactérias, AMB, MFG e CAS apresentaram valores de $BCIM_{50}$ e $BCIM_{90}$ entre $<0,125$ e $1 \mu\text{g/mL}$ sobre biofilmes monomicrobianos de *C. albicans* SC 5314 e IAL-40 ainda em formação (1,5h); e assim como observado na concentração de $1-2 \times 10^7$ UFC/mL (SC 5314) não foi observado inibição usando o antimicrobiano VCM, tanto para a *C. albicans* SC 5314 quanto IAL-40 (Tabela 8 e 10). Por outro lado, a inibição de 50% dos biofilmes monomicrobianos em formação de *S. aureus* variou entre $0,125$ a $32 \mu\text{g/mL}$ para os antifúngicos AMB, MFG e CAS; para VCM foi observada inibição a partir de $0,125$ e $0,25 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 8).

Para os biofilmes polimicrobianos em formação foi observada inibição a partir da concentração de $0,125 \mu\text{g/mL}$ até $64 \mu\text{g/mL}$ para os antifúngicos AMB, CAS e MFG (Tabelas 8 e 10). E assim como observado em concentrações superiores de inóculo, não foi observada inibição durante a formação dos biofilmes polimicrobianos quando tratados com o antimicrobiano VCM para a cepa de *C. albicans* SC 5314 (Tabela 8). Interessantemente para o biofilme em formação de *S. aureus* com IAL-40, observamos inibição na concentração de $1 \mu\text{g/mL}$ para VCM (Tabela 10). Uma hipótese para a Suscetibilidade dos biofilmes mistos com esta cepa de *C. albicans* a VCM é a produção de uma menor biomassa total de biofilmes produzida por IAL-40 quando comparada a biomassa de SC 5314. Apesar de não termos observado diferenças significativas entre os inóculos na formação dos biofilmes mono- e polimicrobianos (24 h) (Figura 10, exceto mono- de *C. albicans* e *S. aureus* ATCC 29213), a redução do inóculo bacteriano e fúngico favoreceu o tratamento dos biofilmes em formação com os antimicrobianos resultando em inibição com menores valores de $BCIM_{50}$ (Tabela 8). Por outro lado não foi observado diferença na inibição de 90% dos biofilmes em formação a partir de diferentes inóculos, exceto para CAS (mono-e polimicrobiano) que apresentou maior inibição da formação do biofilme com a redução do inóculo (Tabela 8).

5.7.2 Ação sobre os biofilmes pré-formados

Biofilmes monomicrobianos formados por 24 h usando 10^7 UFC/mL e $1-2 \times 10^8$ UFC/mL para *C. albicans* e *S. aureus*, respectivamente, foram menos susceptíveis aos antimicrobianos que os biofilmes tratados durante a sua formação (Tabelas 9 e 10). Biofilmes maduros de *C. albicans* SC 5314 foram inibidos em 50%

quando tratados com AMB, MFG e CAS nas concentrações de 4 até 16 µg/mL, em contrapartida, não foi observada atividade antifúngica para VCM, mesmo na maior concentração testada (Tabela 9). AMB e CAS inibiram os biofilmes maduros de *S. aureus* em concentrações de 64 até 128 µg/mL (BMIC₅₀), exceto para a cepa ATCC 6538 que apresentou maior tolerância a AMB. Entretanto não foi verificada ação para MFG em nenhuma cepa de *S. aureus*. Para VCM foi verificada inibição de 50% variando entre 8 e 16 µg/mL (Tabela 9). Os biofilmes polimicrobianos maduros não sofreram inibição, mesmo quando tratados com as maiores concentrações dos antimicrobianos AMB, MFG, CAS e VCM (256 µg/mL) (Tabela 9).

Ao reduzir o inóculo bacteriano e fúngico para $1-2 \times 10^6$ UFC/mL, os biofilmes monomicrobianos pré-formados de *C. albicans* SC 5314 apresentaram inibição (BCIM₅₀) para os antifúngicos AMB, MFG e CAS de 1 a 8 µg/mL (BMIC₅₀), porém não foi verificada ação da VCM sobre os biofilmes (Tabela 9). Entretanto, os biofilmes de *C. albicans* formado pela cepa IAL-40 foram mais susceptíveis aos antifúngicos em concentrações de 0,125 a 4 µg/mL (BCIM₅₀) (Tabela 10). Para todas as cepas de *S. aureus* foi observado inibição de 50% dos biofilmes quando tratados com AMB e CAS nas concentrações de 4 a 32 µg/mL, porém não foi verificada ação para os biofilmes tratados com MFG (> 256 µg/mL). Para VCM foi observada inibição de 50% variando entre 4 e 8 µg/mL e inibição de 90% a partir de 8 até 128 µg/mL (Tabela 9).

Os biofilmes polimicrobianos de *C. albicans* com *S. aureus* tratados com AMB foram inibidos entre 4 e 128 µg/mL e os tratados com CAS entre 4 a 256 µg/mL (Tabelas 9 e 10), em contrapartida não foi observada inibição quando foram utilizados MFC ou VCM quando o biofilme misto foi formado com a cepa *C. albicans* SC 5314 (Tabela 9). Entretanto, para biofilmes mistos formados com *C. albicans* IAL-40, foi possível observar ação inibitória de MFG e VCM, nas concentrações de 0,25 até 64 µg/mL e 0,5 até 16 µg/mL, respectivamente (Tabela 10).

Assim como nos biofilmes em formação (1,5 h), os biofilmes maduros (24 h) foram mais susceptíveis a ação dos antimicrobianos quando comparados com os biofilmes formados com o maior inóculo. Para os biofilmes monomicrobianos de *C. albicans* SC 5314 foi observada diferença entre os inóculos para AMB, CAS e MFG, tanto para 50 quanto 90% de inibição; já para o biofilme monomicrobiano de *S.*

aureus, foi observada diferença para os antimicrobianos AMB (BCIM₅₀), CAS e VCM (BCIM₅₀ e BCIM₉₀). Entretanto, não foi observada inibição de 90% do biofilme polimicrobiano, mesmo com a redução dos inóculos bacterianos e fúngicos, exceto para CAS no período de 1,5 h onde a inibição de 90% do biofilme em formação variou entre 64 e 128 µg/mL.

Ao relacionar a formação de biofilmes com os diferentes inóculos (Figura 10) e a eficácia do tratamento, podemos concluir que, embora não haja diferença estatística entre o biofilme mono- e polimicrobiano formado a partir do inóculos diferentes (exceto biofilmes monomicrobianos de *C. albicans* e *S. aureus* ATCC 29213) há impacto no tratamento com antimicrobianos, tornando-o mais susceptível. Em um estudo semelhante, Vila et al. (2016), avaliaram a ação da CAS contra biofilmes nas etapas de adesão (1,5h) e pré-formados (24 h) de *Candida albicans* SC 5314, usando inóculo de 1×10^7 UFC/mL. CAS nas concentrações de 0,015 a 8 µg/mL foram capazes de inibir 50% da formação de biofilmes e concentrações >16 µg/mL inibiram em 50% dos biofilmes pré-formados de (VILA et al., 2016). Os dados de Villa et al. (2016) corroboram com aqueles observados neste trabalho em que a ação da CAS sobre a formação dos biofilmes é mais eficiente que sobre os biofilmes maduros.

Vários estudos relataram o coisolamento de *S. aureus* e *C. albicans* em numerosas doenças associadas ao biofilme. Esses dados indicam que esses microrganismos têm a capacidade de interagir uns com os outros à nível molecular tornando-os notoriamente resistentes aos antimicrobianos em comparação com as células planctônicas (KEAN et al., 2017). Harriot et al. (2009), demonstraram que a resistência a VCM em um biofilme polimicrobiano de *C. albicans* e *S. aureus* é fortemente aumentada quando comparado ao biofilme monomicrobiano de *S. aureus*, corroborando com os dados apresentados neste trabalho, sugerindo que a matriz extracelular secretada por *C. albicans*, reveste as células de *S. aureus*, tornando-as resistentes a VCM (HARRIOTT; NOVERR, 2009).

Segundo Siala et al. (2016) a CAS inibe a atividade enzimática de N-acetilglucosamina transferase (análogo da β-1,3-D glucana sintetase de fungos), importante para a síntese de PIA/PNAG, componente majoritário da matriz extracelular de biofilmes de *S. aureus*. Concomitantemente, a CAS inibe beta 1,3

glucana sintetase, importante na síntese da parede celular e de matriz extracelular de biofilmes de *C. albicans*. Dessa forma, hipotetizamos que a CAS esteja agindo diretamente nas células microbianas, mas principalmente, inibindo a síntese de matriz extracelular dos biofilmes mistos. Assim, o aumento da tolerância dos biofilmes se deve a limitada penetração dos antimicrobianos no biofilme pela presença da matriz extracelular. A matriz pode retardar a difusão do fármaco e permitindo que *S. aureus* regule genes de resistência as drogas, ou até mesmo, o próprio material da matriz de *C. albicans*, pode alterar o crescimento e expressão gênica de *S. aureus*, resultando em regulação positiva de genes de resistência antimicrobiana (BAILLIE, 2000; HARRIOTT; NOVERR, 2009, 2010; ROGIERS et al., 2018).

Tabela 8. Inibição da formação dos biofilmes mono- e polimicrobianos das cepas de *Candida albicans* SC 5314 (10^7 e 10^8 UFC/mL) e *Staphylococcus aureus* ($1-2 \times 10^8$ e $1-2 \times 10^6$ UFC/mL) pelos antimicrobianos. Tratamento com diferentes concentrações dos antimicrobianos foi iniciado após a fase de adesão (1,5h de incubação). Os resultados estão expressos em $\mu\text{g/mL}$.

	1,5h							
	AMB		MFG		CAS		VCM	
	BCIM ₅₀	BCIM ₉₀	BCIM ₅₀	BCIM ₉₀	BCIM ₅₀	BCIM ₉₀	BCIM ₅₀	BCIM ₉₀
1-2x10⁷ C. albicans e 1-2 x 10⁸ S. aureus								
Monomicrobiano								
<i>C. albicans</i> SC5314	0,5	16	0,125	>256	0,5	>256	>256	>256
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	8	>256	>256	>256	16	128	2	8
<i>S. aureus</i> ATCC 33591	64	128	>256	>256	64	128	2	4
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	256	>256	>256	>256	8	64	8	16
Polimicrobiano								
<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i> ATCC 29213	64	>256	>256	>256	64	256	>256	>256
<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i> ATCC 33591	64	>256	>256	>256	64	>256	>256	>256
<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i> ATCC 6538	64	>256	>256	>256	64	256	>256	>256
1-2x10⁶ C. albicans e 1-2 x 10⁶ S. aureus								
Monomicrobiano								
<i>C. albicans</i> SC5314	0,25	0,5	<0,125	0,125	<0,125	1	>256	>256
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,125	8	8	>256	16	64	0,125	0,5
<i>S. aureus</i> ATCC 33591	0,125	128	16	>256	04-08	32-64	0,125	1
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0,125	32	32	>256	0,125	32	0,25	0,5
Polimicrobiano								
<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i> ATCC 29213	32	>256	32	>256	16	128	>256	>256
<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i> ATCC 33591	64	>256	16	>256	32	64	>256	>256
<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i> ATCC 6538	32	>256	16	>256	16	32-64	>256	>256

Legenda: AMB, anfotericina B; MFG, micafungina; CAS, caspofungina; VCM, vancomicina; BCIM, concentração inibitória mínima.

Tabela 9. Ação dos antimicrobianos em biofilmes mono- e polimicrobianos das cepas de *Candida albicans* SC 5314 (10^7 e 10^6 UFC/mL) e *Staphylococcus aureus* ($1-2 \times 10^8$ e $1-2 \times 10^6$ UFC/mL). Tratamento com diferentes concentrações dos antimicrobianos foi iniciado após a fase de formação (24 h de incubação). Os resultados estão expressos em $\mu\text{g/mL}$.

	24 h							
	AMB		MFG		CAS		VCM	
	BCIM ₅₀	BCIM ₉₀	BCIM ₅₀	BCIM ₉₀	BCIM ₅₀	BCIM ₉₀	BCIM ₅₀	BCIM ₉₀
1-2x10⁷ C. albicans e 1-2 x 10⁸ S. aureus								
Monomicrobiano								
<i>C. albicans</i> SC 5314	4	256	16	>256	8	>256	>256	>256
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	64	>256	>256	>256	128	128	8	256
<i>S. aureus</i> ATCC 33591	64	>256	>256	>256	128	>256	16	>256
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	>256	>256	>256	>256	128	>256	8	>256
Polimicrobiano								
<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i> ATCC 29213	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i> ATCC 33591	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i> ATCC 6538	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
1-2x10⁶ C. albicans e 1-2 x 10⁶ S. aureus								
Monomicrobiano								
<i>C. albicans</i> SC 5314	4	32	1	8	2	8	>256	>256
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	4	256	>256	>256	16	>256	4	8
<i>S. aureus</i> ATCC 33591	32	>256	>256	>256	32	>256	8	128
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	8	>256	>256	>256	32	64	8	32-64
Polimicrobiano								
<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i> ATCC 29213	32	>256	>256	>256	128	>256	>256	>256
<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i> ATCC 33591	128	>256	>256	>256	256	>256	>256	>256
<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i> ATCC 6538	64	>256	>256	>256	64	>256	>256	>256

Legenda: AMB, anfotericina B; MFG, micafungina; CAS, caspofungina; VCM, vancomicina; BCIM, concentração inibitória mínima.

Tabela 10. Inibição do biofilme em formação e pré-formados mono e polimicrobianos das cepas de *C. albicans* IAL-40 e *Staphylococcus aureus* formados a partir do inóculo 10^6 UFC/mL para ambos os microrganismos; Tempo de 1,5 e 24 h. Tratamento com diferentes concentrações dos antimicrobianos foi iniciado após a fase de adesão e em biofilmes maduros (1,5 e 24 h de incubação respectivamente). Os resultados estão expressos em $\mu\text{g/mL}$.

		1,5h							
		AMB		MFG		CAS		VCM	
		BCIM ₅₀	BCIM ₉₀	BCIM ₅₀	BCIM ₉₀	BCIM ₅₀	BCIM ₉₀	BCIM ₅₀	BCIM ₉₀
Monomicrobiano									
<i>C. albicans</i> IAL-40		0,125	0,125	0,125	0,125	1	2	>256	>256
Polimicrobiano									
<i>C. albicans</i> IAL-40 + <i>S. aureus</i> ATCC 29213		0,25	8-16	0,125	0,2	2	64	1	16
<i>C. albicans</i> IAL-40 + <i>S. aureus</i> ATCC 33591		64	>256	0,5	16	32-64	128	1	>256
<i>C. albicans</i> IAL-40 + <i>S. aureus</i> ATCC 6538		16	>256	0,125	>256	1	32-64	1	64-128
		24 h							
		AMB		MFG		CAS		VCM	
		BCIM ₅₀	BCIM ₉₀	BCIM ₅₀	BCIM ₉₀	BCIM ₅₀	BCIM ₉₀	BCIM ₅₀	BCIM ₉₀
Monomicrobiano									
<i>C. albicans</i> IAL-40		4	128	0,125	0,5	2	4	>256	>256
Polimicrobiano									
<i>C. albicans</i> IAL-40 + <i>S. aureus</i> ATCC 29213		4	8	0,25	8	256	>256	0,5	256
<i>C. albicans</i> IAL-40 + <i>S. aureus</i> ATCC 33591		32-64	>256	32	>256	4-8	>256	8-16	>256
<i>C. albicans</i> IAL-40 + <i>S. aureus</i> ATCC 6538		32	>256	16	>256	8	128	8-16	>256

Legenda: AMB, anfotericina B; MFG, micafungina; CAS, caspofungina; VCM, vancomicina; BCIM, concentração inibitória mínima.

5.8 Avaliação do efeito da caspofungina sobre a viabilidade celular e biomassa total durante a formação de biofilmes de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*

Devido à baixa formação de biofilmes da cepa de *C. albicans* IAL-40, escolhemos para dar continuidade aos nossos ensaios a cepa de *C. albicans* SC 5314. A atividade antibiofilme da caspofungina (CAS) nas concentrações de 2, 8, 32 e 128 µg/mL sobre formação dos biofilmes monomicrobianos (tratado após fase de adesão - 1,5h) de *C. albicans* SC5314 ou *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, ATCC 33591 e ATCC 6538 foi avaliada pela determinação da biomassa total e da viabilidade celular de bactéria e de fungo dentro dos biofilmes.

A biomassa total de biofilme de *C. albicans* SC5314 reduziu significativamente em concentrações ≥ 2 µg/mL ($p < 0,001$) (Figura 11A). O mesmo resultado pode ser observado sobre a formação dos biofilmes de *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 6538 ($p < 0,001$), enquanto para a cepa ATCC 33591 uma redução significativa da biomassa total ocorreu somente a partir de 8 µg/mL ($p < 0,05$) (Figura 11B-D).

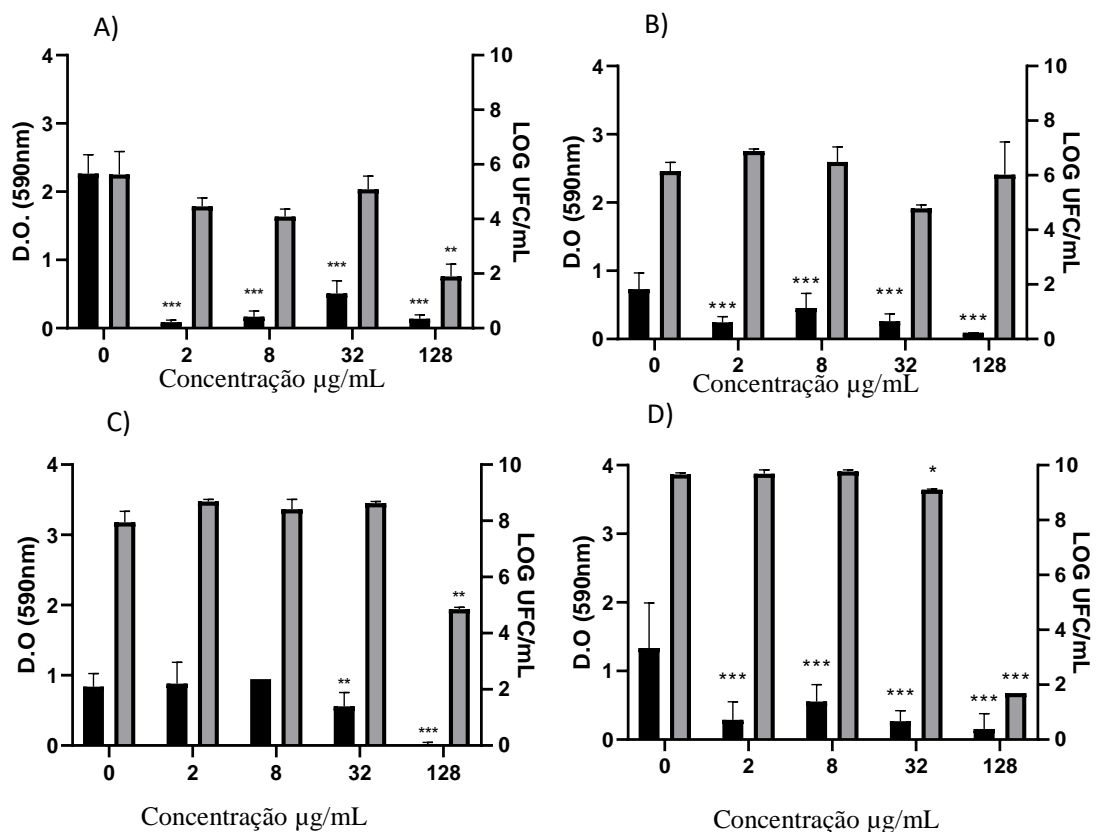
Quando a contagem de células viáveis foi avaliada, é possível observar redução significativa a partir de 32 µg/mL ($p < 0,05$) para *S. aureus* ATCC 6538 (perfil MSSA e menos virulento), e a partir de 128 µg/mL para *S. aureus* ATCC 33591 (perfil MRSA) e *C. albicans* SC 5314 ($p < 0,01$ para ambos) (Figura 11). Por outro lado, não foi observada diminuição significativa de células viáveis de *S. aureus* ATCC 29213 (perfil MSSA e mais virulento), mesmo na maior concentração testada (128 µg/mL) (Figura 11C).

De modo geral, CAS reduziu significativamente tanto a biomassa total quanto as células viáveis de todos os biofilmes monomicrobianos de *S. aureus* a partir de 2 µg/mL na biomassa total e para células viáveis a partir de 128 µg/mL.

O tratamento com CAS sobre a formação dos biofilmes polimicrobianos de *C. albicans* (SC5314) com *S. aureus* (ATCC 6538, ATCC 33591 e ATCC 29213) foi avaliada com os dados obtidos através do ensaio de biomassa total e de contagem de viáveis. CAS em concentrações iguais ou superiores a 2 µg/mL foram capazes de reduzir significativamente mais de 50% da biomassa total dos biofilmes mistos

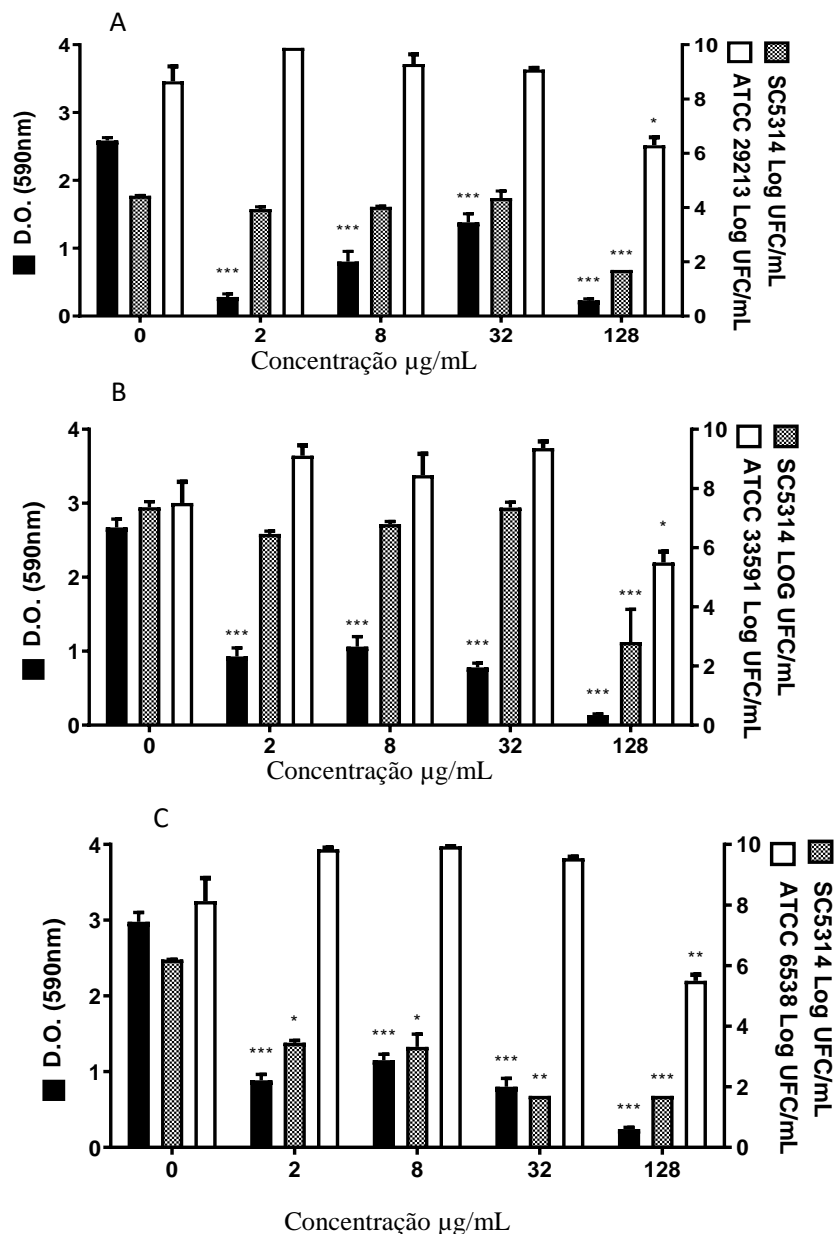
formados por todas as cepas de *S. aureus* ($p < 0,001$) (Figura 12). A viabilidade celular de *C. albicans* nos biofilmes mistos teve uma maior redução de 50% em 2 e 8 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) e mais de 50% nas concentrações superiores ($p < 0,001$) quando houve interação com a cepa *S. aureus* ATCC 6538 (Figura 12C). Por outro lado, somente a concentração de 128 $\mu\text{g/mL}$ de CAS reduziu significativamente a contagem de células viáveis de *C. albicans* quando submetida a interação com ATCC 33591 ou ATCC 29213 ($p < 0,001$) (Figuras 12A e 12B). Nessas interações, somente a concentração de 128 $\mu\text{g/mL}$ de CAS levou a uma redução significativa da viabilidade bacteriana ($p < 0,05$) (Figura 12), resultado que corrobora com aqueles obtidos com os biofilmes monomicrobianos de *S. aureus* (Figura 11).

Figura 11. Biomassa total (barras pretas) e viabilidade celular (barras cinzas) de biofilmes monomicrobianos de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* após o tratamento com diferentes concentrações da caspofungina durante a formação dos biofilmes.



A) *Candida albicans* SC 5314; B) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; C) *Staphylococcus aureus* ATCC 33591; D) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Suspensão microbiana de 10^6 UFC/mL foi dispensada nos poços da microplaca de 96 poços e após 1,5 h (fase de adesão) diferentes concentrações de caspofungina foram adicionadas e a microplaca inubada por 24 h a 35 °C e sob agitação 150 rpm. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; e *** $p < 0,001$ (One way anova) quando comparado com o biofilme não tratado (grupo 0).

Figura 12. Biomassa total (barras pretas) e viabilidade celular (barras cinza e brancas) de biofilmes polimicrobianos de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* após o tratamento com diferentes concentrações da caspofungina durante a formação dos biofilmes.



A) *Candida albicans* SC 5314 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; B) *Candida albicans* SC 5314 e *Staphylococcus aureus* ATCC 33591; C) *Candida albicans* SC 5314 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Suspensão microbiana de 10^6 UFC/mL foi dispensada nos poços da microplaca de 96 poços e, após 1,5 h (fase de adesão), diferentes concentrações de caspofungina foram adicionadas e a microplaca incubada por 24 h a 35 °C e sob agitação 150 rpm. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (One way anova) quando comparado com o biofilme não tratado (grupo 0).

Siala et al. (2016) avaliaram a atividade de moxifloxacino (MXF) e delafloxacina (DFX) sozinhos ou combinados com CAS contra biofilmes maduros (48 h de formação) de *S. aureus* (N= 9), entre elas a cepa ATCC 33591 utilizada neste trabalho. Ao combinar MXF com CAS na concentração de 40 µg/mL, foi observado a redução de 1 até 12 vezes da viabilidade celular, quando comparado com a MXF sozinha; o mesmo efeito é observado para DFX, onde ocorre a redução de 4 até 20 vezes na quantidade necessária de fármaco (MXF ou DFX) para inibição de 50% do biofilme. Estes achados sugerem que as fluoroquinolonas são potencializadas pela ação da CAS, que segundo Siala et al. (2016), a CAS inibe a polimerização dos exopolissacarídeos desestruturando a matriz extracelular permitindo a maior penetração das fluoroquinolonas nos biofilmes de *S. aureus*.

Assim como Siala et al. (2016), Mohamed et al. (2020), investigaram o papel da CAS na sensibilização de cepas de *S. aureus* MRSA com resistência à uma nova fluoroquinolona, a zabofloxacina. Após o tratamento com concentração subinibitória de CAS, esses isolados tiveram seus valores de CIM de zabofloxacina diminuídos em uma faixa variando de 2 a 32 vezes. Segundo Mohamed et al. (2020) foi detectada homologia entre 1,3-beta-glucano sintase (a enzima fúngica alvo da CAS) e SdrM, uma bomba de efluxo de múltiplas drogas em *S. aureus*. Assim, a CAS conseguiu sensibilizar os isolados clínicos de MRSA resistentes à zabofloxacina, bloqueando a ação da bomba de efluxo SdrM e, conseqüentemente, restaurando sua atividade antibacteriana. Em conclusão, este estudo identificou um novo alvo bacteriano para o antifúngico CAS, além do proposto por Siala et al. (2016) (MOHAMED; ZAKARIA; EDWARD, 2020; SIALA et al., 2016).

Após 24h de formação biofilmes polimicrobianos de *C. albicans* e *S. aureus*, foram tratados com anidulafungina e Rogiers et al. (2019), observaram que houve redução significativa do número de células de *C. albicans* nos biofilmes mono-e polimicrobianos formados. Entretanto, não foi verificada redução significativa nas células de *S. aureus*, mesmo na maior concentração testada de 16 mg/L (ROGIERS et al., 2018)

5.9 Avaliação da eficácia das equinocandinas no tratamento de larvas de *Galleria mellonella* com infecção monomicrobiana ou mista por *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*

Larvas infectadas com somente leveduras de *Candida albicans* SC5314 (5×10^5 UFC/larva) apresentaram 80% de mortalidade após o quinto dia da infecção ($p < 0,001$ comparado com o grupo não infectado PBS). Todas as doses testadas de CAS foram eficientes em prolongar a vida das larvas (Figuras 13 A-D). As doses mais altas 20 e 50 mg/Kg de CAS protegeram significativamente 85,71% e 95% das larvas, respectivamente ($p < 0,001$ para ambas doses) em comparação com o grupo infectado e não tratado (Figura 13A). As doses de 5 e 10 mg/kg de CAS protegeram 30% ($p < 0,01$) e 80% ($p < 0,001$) das larvas, respectivamente (Figura 13 C). Resultados similares foram observados quando as larvas infectadas com *C. albicans* foram tratadas com 5 ou 10 mg/kg de MFG. A dose de 5 mg/Kg de MFG protegeu somente 35% das larvas ($p = 0,077$), enquanto as larvas tratadas com 10 mg/kg de MFG a taxa de sobrevivência foi de 80,95% havendo diferença estatística ($p < 0,001$) (Figura 13 E). Quando o índice de saúde foi avaliado para cada grupo tratado com as equinocandinas, as maiores doses resultaram em larvas mais saudáveis enquanto na dose de 5 mg/Kg de CAS e MFG as larvas tiveram índice de saúde entre 3 e 6 (Figura 13 B, D e F).

Similarmente a concentração de *C. albicans* empregada neste estudo (5×10^5 UFC/larva) usando modelo de *G. mellonella*, Kelly e Kavanagh (2011) demonstraram que o tratamento com 20 μ L de CAS nas concentrações de 0,19, 0,095 ou 0,0475 μ g/mL (equivalentes as doses de 12, 6 e 3 mg/kg, respectivamente) após 1h da infecção com *C. albicans* (Cepa Men), e tratadas com a maior dose utilizada neste ensaio (0,19 mg/kg), resulta em um aumento da sobrevivência de 93,3% em 24h e 56,5% em 72h, enquanto no grupo controle infectado e não tratado a sobrevivência foi de 66,6% em 24h e 3,3% em 72h. As doses menores de CAS (6 e 3 mg/kg) promoveram cerca de 50 e 20% de sobrevivência em 24 e 72h, respectivamente, e assim como o nosso trabalho demonstrou efetividade da CAS, em todas as doses, contra infecções causadas por *C. albicans* (KELLY; KAVANAGH, 2011).

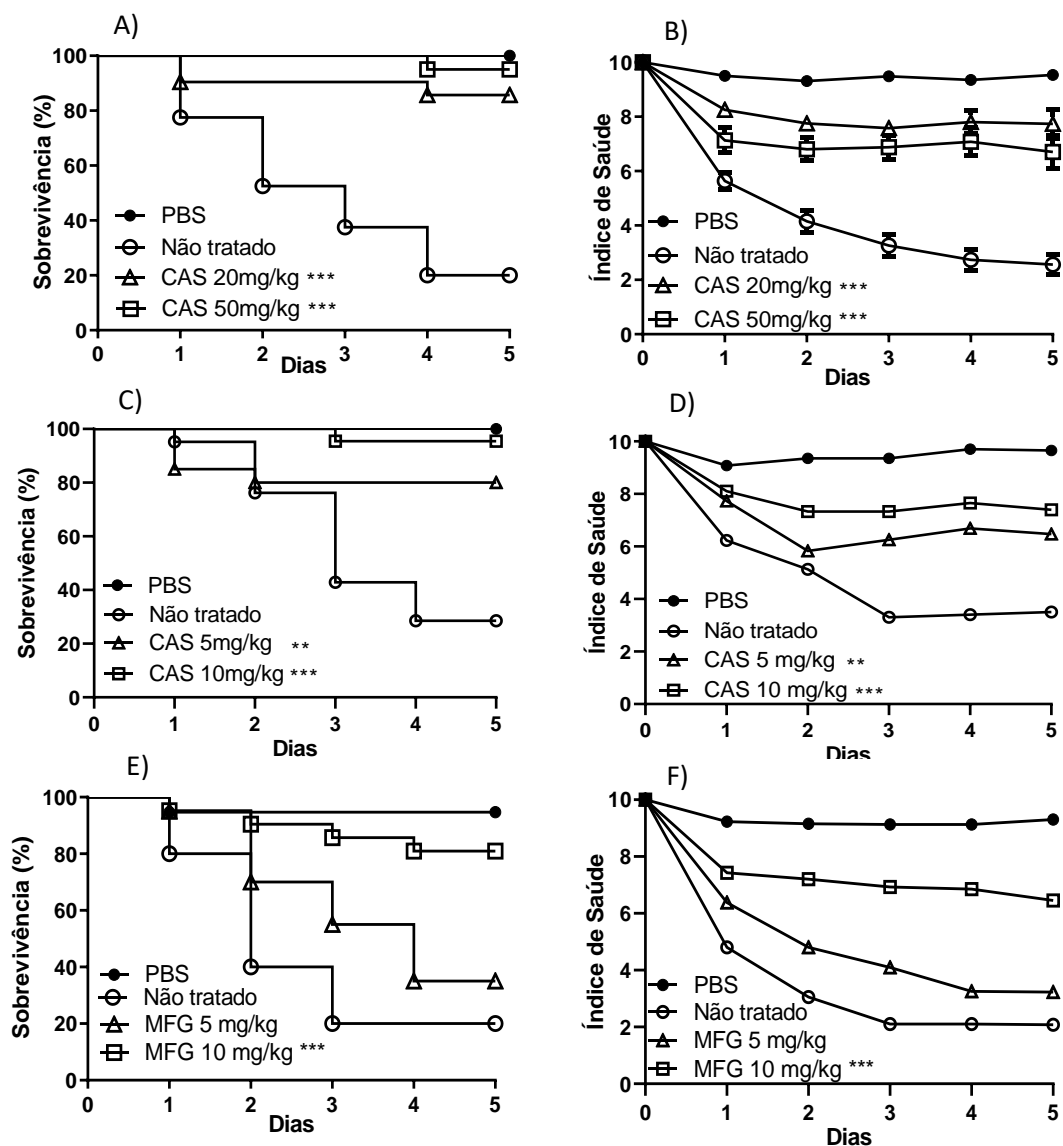
As equinocandinas são administradas como doses intravenosas diárias únicas com efeitos colaterais mínimos, e sua eficácia está intimamente relacionada aos

valores de CIM (PRÉPOST et al., 2019). Recentemente Prépost et al. (2019), avaliaram a eficácia e a toxicidade de CAS em modelo murino neutropênico. Camundongos imunossuprimidos foram infectados com *C. albicans* (2×10^4 UFC/mL) e tratados com diferentes doses de CAS (8, 10, 40, 60 e 80 mg/kg por dia) durante 5 dias e os animais avaliados até o sétimo dia. CAS, em todas as doses, conseguiu preservar a sobrevivência dos animais $\geq 90\%$; entretanto doses elevadas de 60 e 80 mg/kg de CAS foram tóxicas levando a 80% de mortalidade dos animais em contraponto às doses inferiores que não causaram nenhum efeito tóxico (PRÉPOST et al., 2019). Dessa forma, doses inferiores a 60 mg/kg de CAS podem ser consideradas seguras para o modelo murino. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que doses de 50 mg/kg de CAS foi eficiente no tratamento da infecção por *C. albicans* preservando a vida e a saúde das larvas.

Também avaliamos a eficácia de CAS em modelo de *G. mellonella* infectadas com *S. aureus* ATCC 29213 ou ATCC 33591 (Figura 14). Nossos dados indicam que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) na redução da mortalidade, bem como não foi verificada melhora no índice de saúde na dose testada de 50 mg/kg para ambos os microrganismos. O tratamento com CAS da infecção por *S. aureus* ATCC 6538 não foi realizado pois esta cepa apresentou baixa virulência no modelo, quando inoculado sozinho (Figura 6).

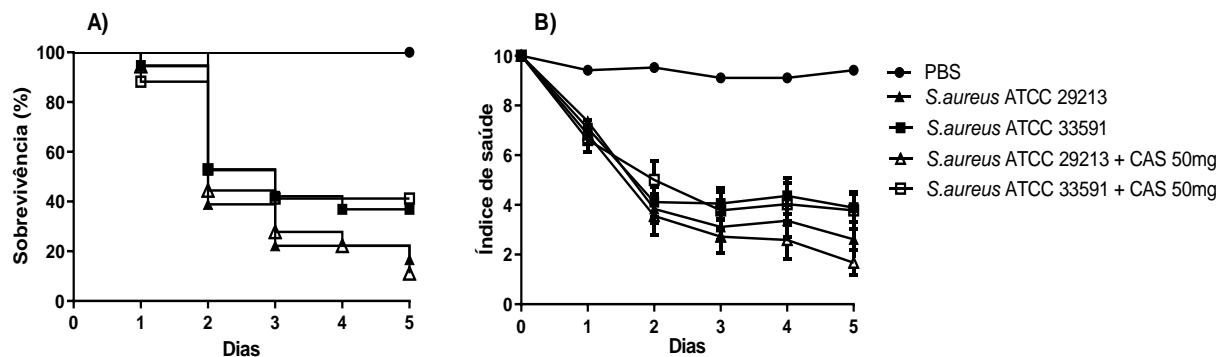
A eficácia da CAS (20 ou 50 mg/Kg) também foi avaliada sobre as infecções mistas de *C. albicans* e *S. aureus* em larvas de *G. mellonella* (Figura 15). As doses de CAS 20 e 50 mg/kg não protegeram as larvas da morte quando infectadas com *C. albicans* e *S. aureus* ATCC 29213 ($p > 0,05$) (Figuras 15 A e B), em contrapartida as doses de CAS 20 e 50 mg/kg protegeram 60-70 % das larvas coinfectedas com *C. albicans* e *S. aureus* ATCC 33591 ou ATCC 6538 (Figuras 15 C -F).

Figura 13. Curvas de sobrevivência e morbidade de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com leveduras *Candida albicans* SC5314 (5×10^5 UFC/larva) e tratadas após 30 minutos da infecção com caspofungina (CAS) ou micafungina (MFG).



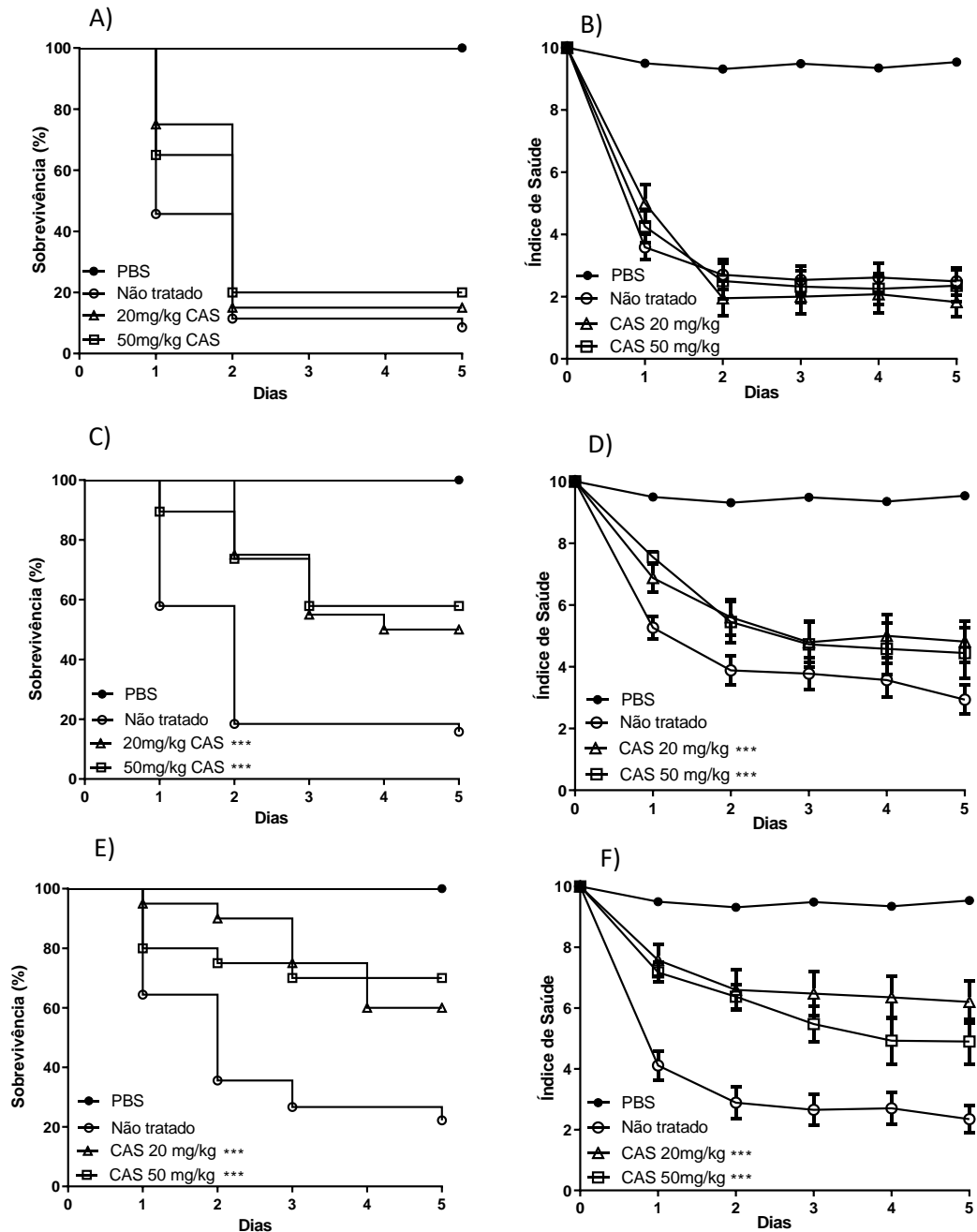
A) e B) Sobrevivência e morbidade, respectivamente, das larvas tratadas com caspofungina nas doses de 20 ou 50mg/Kg; **C) e D)** Sobrevivência e morbidade, respectivamente, das larvas tratadas com caspofungina nas doses de 5 ou 10mg/Kg. **E) e F)** Sobrevivência e morbidade, respectivamente, das larvas tratadas com micafungina nas doses de 5 ou 10mg/Kg. ** $p=0,01$ e *** $p<0,001$ (Log-rank, Mantel-Cox Test para sobrevivência e *two-way* ANOVA para a mortalidade) quando comparado com o grupo de larvas infectadas e não tratadas (grupo Não tratado).

Figura 14. Curva de sobrevivência e morbidade de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e ATCC 33591 (1×10^7 UFC/larva) e tratadas após 30 minutos da infecção com caspofungina (CAS).



A) e B) Sobrevivência e morbidade, respectivamente, das larvas tratadas com caspofungina doses de 50mg/Kg.

Figura 15. Curvas de sobrevivência (A, C e E) e de morbidade (B, D e F) de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com leveduras *Candida albicans* SC5314 (5×10^5 UFC/larva) e *Staphylococcus aureus* (1×10^7 UFC/larva) e tratadas após 30 minutos da infecção com caspofungina (CAS) nas doses de 20 ou 50 mg/kg.



A) e B) Sobrevivência e morbidade, respectivamente, das larvas infectadas com *C. albicans* e *S. aureus* ATCC 29213; **C) e D)** Sobrevivência e morbidade, respectivamente, das larvas infectadas com *C. albicans* e *S. aureus* ATCC 33591. **E) e F)** Sobrevivência e morbidade, respectivamente, das larvas infectadas com *C. albicans* e *S. aureus* ATCC 6538. *** $p < 0,001$ (Log-rank, Mantel-Cox Test para sobrevivência e *two-way* ANOVA para a mortalidade) quando comparado com o grupo de larvas infectadas e não tratadas (grupo Não tratado).

Estudos prévios demonstraram o efeito de estimulação imunológica das equinocandinas em modelos de profilaxia da infecção. As larvas de *G. mellonella* que receberam CAS (0,19 µg/mL ou 12 mg/kg) 24 h previamente à infecção por *S. aureus* foram protegidas dos efeitos da infecção, reduzindo as taxas de mortalidade larvária (KELLY; KAVANAGH, 2011). Um efeito semelhante de modulação imunológica induzindo proteção contra a infecção por *S. aureus* em larvas de *G. mellonella*, também foi observado após a administração de MFG (BURGWYN et al., 2016), prolongando a sobrevivência. De acordo com ambos os trabalhos, esta modulação imunológica pode ser explicada pelo fato de que tanto a MFG quanto a CAS recrutam hemócitos para a hemolinfa (BURGWYN et al., 2016; KELLY; KAVANAGH, 2011).

Fidan et al. (2014) avaliaram o efeito imunomodulatório promovido por CAS em três tipos de células sanguíneas humanas: neutrófilos, eosinófilos e basófilos. O estudo consistiu em preparar uma cultura contendo tais células e adicionar as leveduras *C. albicans* ou *C. krusei* previamente inativadas por calor, na presença ou ausência de CAS. Através do ensaio de MTT a proliferação das células sanguíneas foi avaliada e os resultados indicaram que quando incubadas durante 24h e 48h as células sanguíneas se proliferaram a níveis mais altos, quando estão na presença de CAS, comparados com a cultura somente com *C. albicans* ou *C. krusei*, sendo os níveis mais altos detectados em 48h, confirmando o efeito imunomodulatório promovido por CAS, não só em modelo de *G. mellonella* conforme observado por Kelly e Kavanagh (2011), mas também em células sanguíneas (FIDAN et al., 2014; KELLY; KAVANAGH, 2011).

Recentemente Sheehan, Tully e Kavanagh (2020) avaliaram a diferença de mortalidade entre as infecções mistas e monomicrobianas de *S. aureus* e *C. albicans*. A inoculação monomicrobiana de *C. albicans* (1×10^5 UFC/larva) ou *S. aureus* (2×10^4 UFC/larva) não resultou em redução da sobrevivência. Entretanto quando as larvas foram coinfecadas resultou em diminuição na sobrevivência quando comparado com a infecção por um único microrganismo, sugerindo sinergia entre as interações de *C. albicans* e *S. aureus* (SHEEHAN; TULLY; KAVANAGH, 2020). Os autores ainda mostraram que a coinfecção resulta no aumento da proliferação de *S. aureus* quando comparada a infecção monomicrobiana (SHEEHAN; TULLY; KAVANAGH, 2020). Nossos dados também apresentaram resultados similares quando as larvas foram

coinfectadas com *C. albicans* SC5314 e *S. aureus* (ATCC 29213, ATCC 33591 ou ATCC 6538), principalmente para a cepa ATCC 6538 em que a coinfeção com *C. albicans* resultou em mortalidade larvária significativa quando comparado com a infecção monomicrobiana (Figura 6 e 15E - F).

As coinfeções de *C. albicans* com espécies de *Staphylococcus* estão entre os melhores exemplos de "sinergismo letal", o que significa que a coinfeção medeia o aumento da mortalidade de infecções polimicrobianas (CAROLUS; VAN DYCK; VAN DIJCK, 2019; SHEEHAN; TULLY; KAVANAGH, 2020), como podemos observar no ensaio de virulência utilizando larvas de *G. mellonella*, as cepas de *S. aureus* ATCC 29213 e *C. albicans* SC 5314 exibiram 40% de sobrevivência em 48h na infecção monomicrobiana cada uma, contudo, quando combinadas na infecção polimicrobiana, exibiram sobrevivência de apenas 20% no mesmo período (figura 5 e 6 – monomicrobiano; Figura 15 A e B - polimicrobiano).

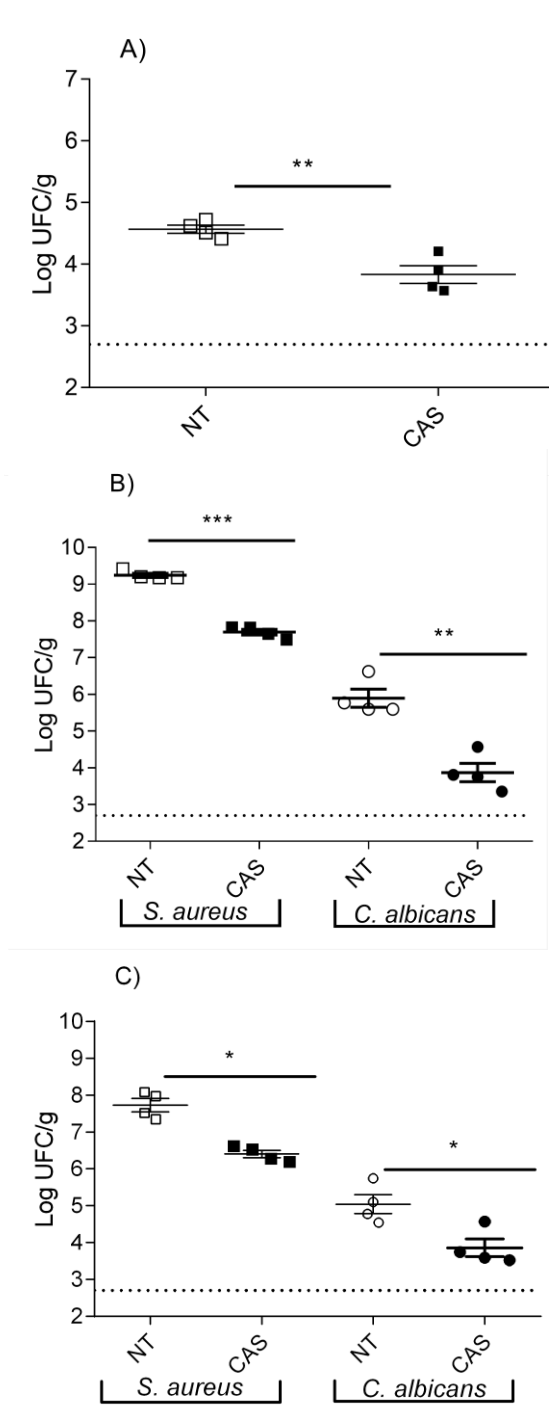
5.10. Análise da carga microbiana em larvas de *Galleria mellonella*

Larvas de *G. mellonella* coinfectadas com 5×10^5 UFC/larva de *C. albicans* SC5314 (infecção monomicrobiana) ou coinfectadas com 1×10^7 UFC/larva de *S. aureus* (ATCC 6538 ou ATCC 33591) foram tratadas com CAS (50 mg/kg) e após 24 h a carga fúngica foi avaliada (Figura 16).

Na figura 16 A, o agente infeccioso foi *C. albicans* SC 5314; é possível observar que houve redução na carga fúngica de ~1 Log no grupo tratados com CAS, quando comparado com o grupo não tratado ($p < 0,01$).

Na figura 16 B ao avaliarmos a eficácia de CAS frente a infecção mista por *C. albicans* e *S. aureus* ATCC 33591, foi verificada redução significativa de ~1,5 Log de *S. aureus* e de ~2 Log de *C. albicans* em comparação com o grupo intectado e não tratado ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente). Em larvas coinfectadas com *C. albicans* e *S. aureus* ATCC 6538 a CAS reduziu ~1,3 log da carga microbiana para ambos os microrganismos ($p < 0,05$) (Figura 16 C).

Figura 16. Avaliação da carga microbiana em larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Candida albicans* (SC5314) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 e ATCC 33591) e tratadas com caspofungina (50mg/kg).



A) Infecção monomicrobiana por *C. albicans*; **B)** Infecção polimicrobiana por *S. aureus* ATCC 33591 e *C. albicans* SC 5314; **C)** Infecção polimicrobiana por *S. aureus* ATCC 6538 e *C. albicans* SC 5314. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o grupo não tratado (Two-way ANOVA). A linha tracejada representa o limite de detecção da técnica ($\pm 2,7$ CFU/g). Legenda: CAS, caspofungina; NT, não tratado.

5.11. Análise histopatológica

A coloração de hematoxilina e eosina revelou que larvas de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* SC 5314 e/ou *S. aureus* mono-e polimicrobiano apresentaram carga fúngica elevada (++ a ++++), podendo ser observadas por todo o corte histológico.

O tratamento com CAS na dose de 50mg/Kg de larva do grupo monomicrobiano infectado com *C. albicans* SC 5314, apresentou redução da carga fúngica (++) e, assim como observado nos grupos polimicrobianos infectados com *C. albicans* SC 5314 e *S. aureus* ATCC 6538 ou ATCC 33591, onde é possível constatar que houve redução da carga fúngica (Tabela 11). Uma característica que merece destaque é a presença aumentada de granulomas nos grupos infectados e tratados com CAS (Figura 17 - setas cinza). A resposta imune celular inata de *G. mellonella* inclui plasmócitos e células granulares, ambos atores-chave na defesa celular, fagocitose, formação de nódulos e encapsulamento, todos envolvidos na contenção da infecção (MEIR; GROSFELD; BARKAN, 2018). Interessantemente, os números de grânulos foram maiores nos grupos tratados com CAS, enquanto nos grupos não tratados os microrganismos encontravam-se espalhados por todo o corte histológico (Figura 17).

Em um recente estudo Dias et al. (2020) avaliaram a ação da AMB, na disseminação da infecção fúngica de *C. albicans* SC 5314, sendo o inóculo utilizado semelhante ao deste ensaio, avaliado através de cortes histológicos. A análise histopatológica de larvas infectadas com *C. albicans* revelou que o tratamento com AMB resultou em redução do número de focos de infecção e também em uma infecção mais limitada, em contraste com a forma disseminada observada nos grupos não tratados. Além disso, os autores observaram a presença de hifas, possivelmente indicando invasão de tecido de *C. albicans* conforme descrito anteriormente grupo de pesquisa (DE BASTIANI, 2018; DIAS et al., 2020).

Diferentemente do ensaio realizado por De Bastiani (2018), em que as larvas foram selecionadas após 48h da infecção, escolhemos o período de 24h por se tratar não somente de uma infecção por *C. albicans*, mas uma coinfeção com *S. aureus*. A diminuição da incubação em 24h poderia explicar o fato de não observarmos a

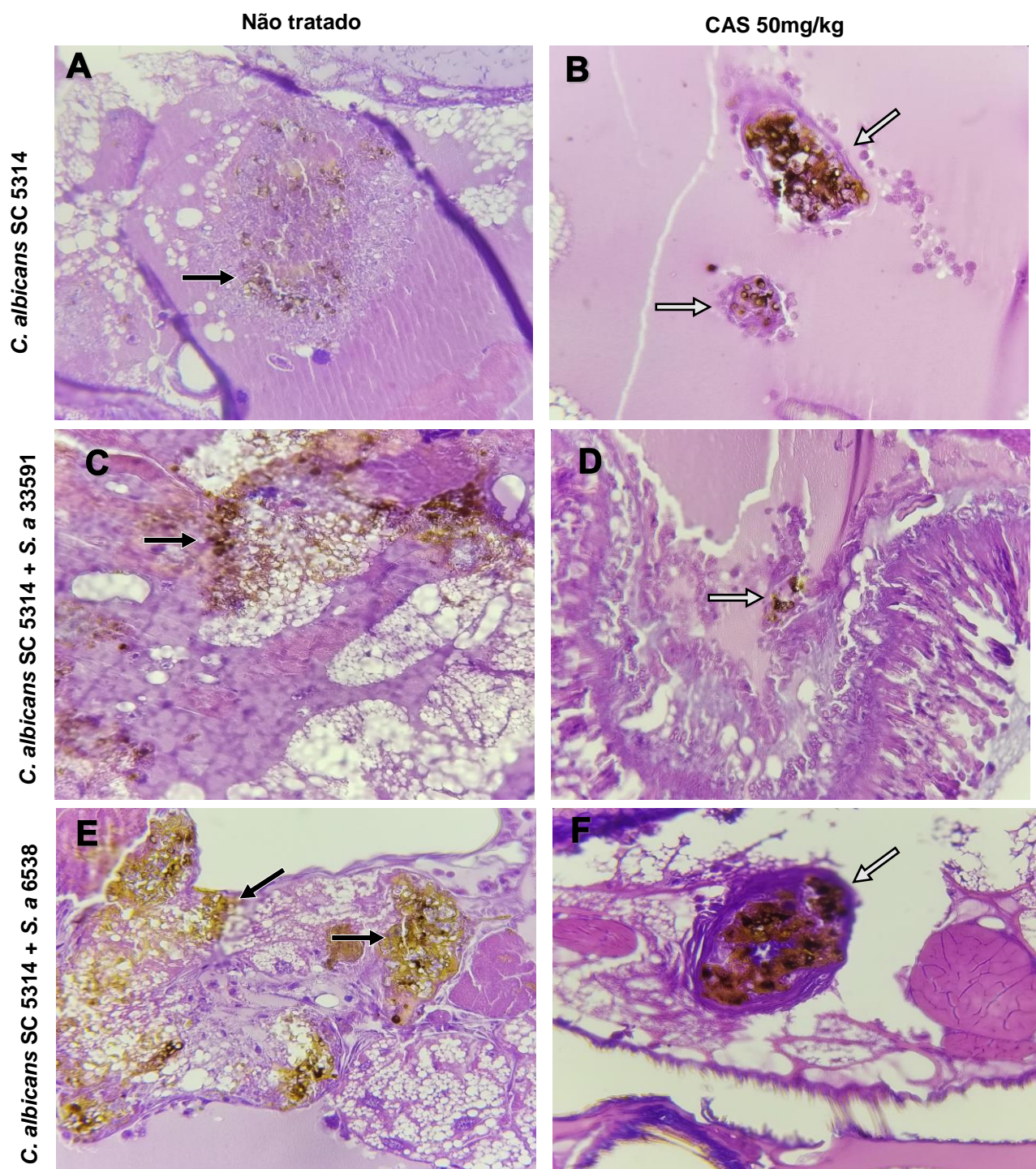
presença de filimentação nos cortes observados, entretanto a presença de granulomas e melanização foi uma característica relevante observada que pode estar relacionada à resposta imune das larvas (BORGHI et al., 2014; DE BASTIANI, 2018; DIAS et al., 2020).

Tabela 11. Análise semi-quantitativa da presença de carga microbiana e granulomas de *Candida albicans* (SC5314) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591 e ATCC 6538) em larvas de *Galleria mellonella* não tratadas e tratadas com caspofungina (CAS)

Grupos	Carga microbiana	Granulomas
<i>C. albicans</i> SC 5314 não tratado	+++	0
<i>C. albicans</i> SC 5314 + CAS 50 mg/Kg	++	20
<i>C. albicans</i> SC 5314 + <i>S. aureus</i> 33591 não tratado	++++	2
<i>C. albicans</i> SC 5314 + <i>S. aureus</i> 33591 + CAS 50 mg/Kg	+ / ++	6
<i>C. albicans</i> SC 5314 + <i>S. aureus</i> 6538 não tratado	++	1
<i>C. albicans</i> SC 5314 + <i>S. aureus</i> 6538 + CAS 50 mg/Kg	+	11

0 sem microrganismos; + Até cinco elementos microbianos por secção; ++ de 5 elementos microbianos por sessão a 5 por campo em aumento de 400X; +++ De 6 a 50 por campo em aumento de 400X; ++++ Mais de 50 por campo em aumento de 400X.

Figura 17. Cortes histopatológicos de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Candida albicans* SC 5314 sozinho e coinfectadas com *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591 e ATCC 6538) não tratadas e tratadas com caspofungina (CAS).



A, C, E. Carga microbiana e presença de granulomas em larvas infectadas com *C. albicans*, *C. albicans* + *S. aureus* ATCC 33591 e *C. albicans* + *S. aureus* ATCC 6538 respectivamente. **B, D, F.** Carga microbiana e presença de granulomas em larvas infectadas com *C. albicans*, *C. albicans* + *S. aureus* ATCC 33591 e *C. albicans* + *S. aureus* ATCC 6538 respectivamente, tratadas com caspofungina (50mg/kg). Setas pretas indicam a presença de microrganismos e Setas cinza indicam a presença de granulomas.

Tabela 12. Resumo do perfil de Suscetibilidade aos antibacterianos, produção de biofilme e virulência de cepas de *Staphylococcus aureus* bem como de Suscetibilidade *in vitro* das células planctônicas e dos biofilmes mistos formados com *Candida albicans* (SC5314) a caspofungina. Destaca-se a eficácia antimicrobiana da caspofungina na coinfeção no modelo larvário de *G. mellonella* com *C. albicans* e *S. aureus*.

Cepas	Perfil de Resistência	Biofilme	Virulência	PCIM	Caspofungina (µg/mL)		
					CIMB ₅₀ (1,5h)	CIMB ₅₀ (24 h)	<i>G. mellonella</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	MSSA	^a Alta	+++	16	16	16	-
<i>S. aureus</i> ATCC 33591	MRSA	^a Alta	++	32	4-8	32	*
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	MSSA	^a Alta	+	16	0,12	32	*

^aXU et al. 2016;

Legenda: +++ alta virulência; ++ média virulência; + baixa virulência; * 50 mg/kg de CAS foi efetivo em prologar a sobrevivência das larvas de *G. mellonella* e reduzir significativamente a carga microbiana nos tecidos infectados; PCIM, concentração inibitória mínima sobre células planctônicas de *S. aureus*; CIMB₅₀, concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% dos biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. aureus*; MSSA, *Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*; MRSA *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*.

Destacamos, também, que a eficácia da CAS sobre a coinfeção de *C. albicans* SC5314 com diferentes cepas de *S. aureus* em *G. mellonella* parece estar diretamente relacionada com o perfil de virulência e a suscetibilidade dos biofilmes mistos à CAS (Tabela 12). Portanto, a CAS em modelo de *G. mellonella* mostrou-se eficiente no tratamento das coinfeções de *C. albicans* com cepas de *S. aureus* que foram caracterizadas como menos virulentas (ATCC 33591 e ATCC 6538) e os biofilmes mistos em formação (após 1,5 h – fase de adesão) foram susceptíveis a menores concentrações de CAS ($\leq 8 \mu\text{mL}$) (Tabela 12).

Em um ensaio semelhante, porém monomicrobiano, utilizando a mesma cepa fúngica, De-Dong Li et al. (2013) avaliaram a eficácia de FLC, AMB e 5-FC (5 - fluorocitosina), os autores verificaram que os resultados da carga fúngica nos tecidos

diminuíram de uma maneira dose dependente, e todos os antifúngicos testados foram eficientes, a partir da menor dose testada (FLC: 1, 4mg/kg; AMB: 0,4mg/kg; 5-FC: 1,25mg/kg) (LI et al., 2013). Recentemente, Campos-Silva et al. (2019), avaliaram a eficácia de VCM em larvas de *G. mellonella* infectadas com *S. aureus*, e a dose de 50mg/kg de VCM foi capaz de reduzir significativamente a carga bacteriana (CAMPOS-SILVA et al., 2019).

O modelo de *G. mellonella* é uma alternativa simples e barata para a avaliação rápida da eficácia de um antimicrobiano *in vivo* e reduz a probabilidade de um agente antimicrobiano que teve um bom desempenho em estudos *in vitro* de progredir para um desempenho mal sucedido em um modelo de mamífero. O modelo de *G. mellonella* pode, portanto, servir como um experimento de pré-triagem adicional para reduzir o número de antimicrobianos que seguem para testes em modelos de mamíferos, sendo um excelente modelo para análise de carga microbiana (TSAI; LOH; PROFT, 2016).

6. CONCLUSÃO

Os nossos achados *in vitro* indicam que além da ação antifúngica da caspofungina sobre *Candida* spp. também apresentou ação inibitória sobre células planctônicas de *S. aureus*; e interessantemente mostrou-se bactericida para todas as cepas bacterianas. Quanto a avaliação da inibição do biofilme, a caspofungina pôde inibir em 50% a formação de biofilmes polimicrobianos de *C. albicans* e *S. aureus* em concentração maiores ou iguais a 16 µg/mL para os biofilmes em formação e a partir de 64 µg/ mL para os biofilmes pré-formados. Nos ensaios de viabilidade celular a CAS foi capaz de inibir significativamente as células viáveis de *C. albicans* e *S. aureus* a partir de 32 até 128 µg/ mL, e nos ensaios de viabilidade celular do biofilme polimicrobiano, a redução significativa das células viáveis foi observada a partir de 128 µg/mL, exceto para *S. aureus* ATCC 6538 e *C. albicans* onde a inibição das células viáveis de *C. albicans* ocorreu em uma concentração menor.

Em ensaio *in vivo* utilizando modelo de invertebrado de *G. mellonella* demonstramos que a caspofungina é capaz de aumentar a sobrevivência e melhorar o índice de saúde das larvas coinfectadas com *C. albicans* e *S. aureus* (cepas MRSA e MSSA) em doses de 20 e 50 mg/kg. O tratamento com 50 mg/kg de CAS reduz a

carga fúngica e bacteriana e induz a formação de granulomas e melanização. Nossos resultados indicam que a caspofungina possa ser uma alternativa no tratamento das infecções mistas de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* relacionadas a biofilmes. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para esclarecer o seu uso sozinho ou combinado com outros antimicrobianos para reduzir as infecções mistas por essas duas espécies.

7. REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – **ANVISA**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/identificacao-de-caso-de-candida-auris-no-brasil>. Acesso em: 04 de janeiro de 2021.
- ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. *Quorum sensing* in fungi a review. **Medical Mycology**, v. 50, n. 4, p. 337–345, 2012.
- AMORIM-VAZ, S. et al. Examining the virulence of *Candida albicans* transcription factor mutants using *Galleria mellonella* and mouse infection models. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAY, p. 1–14, 2015.
- ANWAR, S. et al. The rise and rise of *Staphylococcus aureus*: Laughing in the face of granulocytes. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 157, n. 2, p. 216–224, 2009.
- BAILLIE, G. S. 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.
- BAMBEKE, F. VAN. Glycopeptides in clinical development: pharmacological profile and clinical perspectives. **Elsevier**, v. 4, n. 5, p. 471–478, 2004.
- BASSETTI, M. et al. What has changed in the treatment of invasive candidiasis? A look at the past 10 years and ahead. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, p. i14–i25, 2018.
- BAUER, J. et al. A combined pharmacodynamic quantitative and qualitative model reveals the potent activity of daptomycin and delafloxacin against *Staphylococcus aureus* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2726–2737, 2013.
- BAZZI, W. et al. The inhibitory effect of micafungin on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Biofouling**, v. 29, n. 8, p. 909–915, 2013.
- BEENKEN, K. E. et al. Global Gene Expression in Expression in Biofilm. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 186, n. 14, p. 4665–4684, 2004.
- BEN-AMI, R. Treatment of Invasive Candidiasis: A Narrative Review. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 97, 2018.
- BERNARD, C.; GIRARDOT, M.; IMBERT, C. *Candida albicans* interaction with Gram-positive bacteria within interkingdom biofilms. **Journal de Mycologie Medicale**, 2019.
- BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015.
- BORGHI, E. et al. Correlation between *Candida albicans* biofilm formation and invasion of the invertebrate host *Galleria mellonella*. **Future Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 163–173, 2014.
- BRENNAN, M. et al. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 153–157, 2002.

- BROGDEN, K. A.; GUTHMILLER, J. M.; TAYLOR, C. E. Human polymicrobial infections. **The Lancet**, 2005.
- BROOKS, J. L.; JEFFERSON, K. K. Phase Variation of Poly-N-Acetylglucosamine Expression in *Staphylococcus aureus*. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 7, 2014.
- BURGWYN, B. et al. Miconazole Elicits an Immunomodulatory Effect in *Galleria mellonella* and Mice. **Mycopathologia**, v. 181, n. 1, p. 17–25, 2016.
- CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **trends in microbiology**, v. 80, n. 7, p. 357–385, 2001.
- CAMARILLO-MÁRQUEZ, O. et al. Antagonistic interaction of *Staphylococcus aureus* toward *Candida glabrata* during in vitro biofilm formation is caused by an apoptotic mechanism. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1–17, 2018.
- CAMILLI A., B. B. L. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. **Science**, v. 311, n. 5764, p. 1113–1116, 2009.
- CAMPOS-SILVA, R. et al. Alternative method in *Galleria mellonella* larvae to study biofilm infection and treatment. **Microbial Pathogenesis**, v. 137, n. August, p. 103756, 2019.
- CARLSON, E.; JOHNSON, G. Protection by *Candida albicans* of *Staphylococcus aureus* in the establishment of dual infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 50, n. 3, p. 655–659, 1985.
- CAROLUS, H.; VAN DYCK, K.; VAN DIJCK, P. *Candida albicans* and *Staphylococcus* Species: A Threatening Twosome. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. September, 2019.
- CARROLL, L. **Alice no país das maravilhas**. [s.l.: s.n.].
- CASTANHEIRA, M. et al. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: Results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 85, n. 2, p. 200–204, 2016.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Centers for Disease Control and Prevention**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/tracking-c-auris.html#world>>. Acesso em: 15 maio. 2020.
- CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629–641, 2009.
- CLAUDITZ, A. et al. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 8, p. 4950–4953, 2006.
- COLOMBO, A. 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.
- COOPER, D.; ELEFThERIANOS, I. Memory and specificity in the insect immune system: Current perspectives and future challenges. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAY, 2017.
- CORDEIRO, R. DE A. et al. Farnesol inhibits in vitro growth of the *Cryptococcus neoformans* species complex with no significant changes in virulence-related

- exoenzymes. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 3–4, p. 375–380, 2012.
- CORNELY, O. A. et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: Non-neutropenic adult patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. SUPPL.7, p. 19–37, 2012.
- COTTER, G.; DOYLE, S.; KAVANAGH, K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 163–169, 2000.
- CROES, S. et al. *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1–9, 2009.
- CUTULI, M. A. et al. *Galleria mellonella* as a consolidated in vivo model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 527–541, 2019.
- CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. **Annual Data Report 2018 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry**. Disponível em: <<https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/2018-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf>>. Acesso em: 18 maio. 2020.
- DA MATTA, D. A.; SOUZA, A. C. R.; COLOMBO, A. L. Revisiting species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates from latin american medical centers. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, p. 11–17, 2017.
- DA SILVA DANTAS, A. et al. Cell biology of *Candida albicans*–host interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, p. 111–118, 2016.
- DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 409, p. 435, 2017.
- DAVIES, J. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiología (Madrid, Spain)**, v. 12, n. 1, p. 9–16, 1996.
- DE BASTIANI, F. W. M. DA S. **Sistemas de liberação para anfotericina B e miltefosina no tratamento das candidíases**. [s.l: s.n.].
- DE FREITAS, A. L. D. et al. Proanthocyanidin polymeric tannins from *Stryphnodendron adstringens* are effective against *Candida* spp. isolates and for vaginal candidiasis treatment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 216, n. January, p. 184–190, 2018.
- DESBOIS, A. P.; COOTE, P. J. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): An in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 8, p. 1785–1790, 2011.
- DIAS, J. et al. Mechanisms of action of antimicrobial peptides ToAP2 and NDBP-5.7 against *Candida albicans* planktonic and biofilm cells. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020.
- DIEKEMA, D. J. et al. Twenty-year trends in antimicrobial susceptibilities among *Staphylococcus aureus* from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. Suppl 1, p. S47–S53, 2019.
- DOI, A. M. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PloS one**, v. 11, n. 1, p.

e0146909, 2016.

DONG, C. L. et al. Synergistic effect of pleuromutilins with other antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* in vitro and in an experimental *Galleria mellonella* model. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. AUG, p. 1–8, 2017.

DUFOUR, P. et al. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in France: Emergence of a Single Clone That Produces Panton-Valentine Leukocidin . **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 7, p. 819–824, 2002.

EDMOND, M. B. et al. Nosocomial Bloodstream Infections in United States Hospitals : A Three-Year Analysis. v. 0663, p. 239–244, 1999.

ENWURU, C. A. et al. Fluconazole resistant opportunistic oro-pharyngeal candida and non-candida yeast-like isolates from HIV infected patients attending ARV clinics in Lagos, Nigeria. **African Health Sciences**, v. 8, n. 3, p. 142–148, 2008.

FIDAN, I. et al. Immunomodulatory effects of voriconazole and caspofungin on human peripheral blood mononuclear cells stimulated by *Candida albicans* and *Candida krusei*. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 348, n. 3, p. 219–223, 2014.

FIGUEIREDO, A. M. S. What is behind the epidemiological difference between community-acquired and health-care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? **Virulence**, v. 8, n. 6, p. 640–642, 2017.

FLANNERY, A. et al. Glycomics Microarrays Reveal Differential In Situ Presentation of the Biofilm Polysaccharide Poly-N-acetylglucosamine on *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* Cell Surfaces. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2465, 2020.

FOSTER, T. J. Colonization and infection of the human host by staphylococci: Adhesion, survival and immune evasion. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5–6, p. 456–470, 2009.

FRENKEL, M. et al. Pathogenicity of *Candida albicans* isolates from bloodstream and mucosal candidiasis assessed in mice and *Galleria mellonella*. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 26, n. 1, p. 1–8, 2016.

GANTNER, B. N.; SIMMONS, R. M.; UNDERHILL, D. M. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. **EMBO Journal**, v. 24, n. 6, p. 1277–1286, 2005.

GARA, J. P. O. ica and beyond : biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. v. 270, p. 179–188, 2007.

GARDETE, S.; TOMASZ, A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* Find the latest version: Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 7, p. 2836–2840, 2014.

GERKE, C. et al. Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 29, p. 18586–18593, 1998.

GHANNOUM, M. et al. The Role of Echinocandins in *Candida* Biofilm–Related Vascular Catheter Infections: In Vitro and In Vivo Model Systems. **Clinical Infectious**

Diseases, v. 61, n. suppl_6, p. S618–S621, 1 dez. 2015.

GUPTA, S. et al. Cholic Acid-Peptide Conjugates as Potent Antimicrobials against Interkingdom Polymicrobial Biofilms. n. October, p. 1–21, 2019.

HAMILL, R. J. Amphotericin B formulations: A comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**, v. 73, n. 9, p. 919–934, 2013.

HARRIOTT, M. M.; NOVERR, M. C. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: Effects on antimicrobial resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3914–3922, 2009.

HARRIOTT, M. M.; NOVERR, M. C. Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3746–3755, 2010.

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

HELLEBERG, M. et al. Rezafungin In Vitro Activity against Contemporary Nordic Clinical *Candida* Isolates and *Candida auris* Determined by the EUCAST Reference Method. n. January, p. 1–10, 2020.

HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 149–169, 2016.

HOGAN, S. et al. In vitro approach for identification of the most effective agents for antimicrobial lock therapy in the treatment of intravascular catheter-related infections caused by *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 2923–2931, 2016.

JABRA-RIZK, M. A. et al. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1463–1469, 2006.

JACOBSEN, I. D. *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. **Virulence**, v. 5, n. 2, p. 237–239, 2014.

JEMEL, S. et al. *Galleria mellonella* for the Evaluation of Antifungal Efficacy against Medically Important Fungi, a Narrative Review. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 390, 2020.

JOHNSON, L. B.; KAUFFMAN, C. A. Voriconazole: A New Triazole Antifungal Agent. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 4, p. 268–275, 2003.

JØNSSON, R. et al. The wax moth *Galleria mellonella* as a novel model system to study Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Virulence**, v. 8, n. 8, p. 1894–1899, 2017.

KARCHMER, A. W. Nosocomial Bloodstream Infections: Organisms, Risk Factors, and Implications. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. Supplement_4, p. S139–S143, 2000.

KAVANAGH, K.; SHEEHAN, G. The Use of *Galleria mellonella* Larvae to Identify Novel Antimicrobial Agents against Fungal Species of Medical Interest. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 113, 2018.

- KEAN, R. et al. *Candida albicans* mycofilms support *Staphylococcus aureus* colonization and enhances miconazole resistance in dual-species interactions. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. FEB, p. 1–11, 2017.
- KELLY, J.; KAVANAGH, K. Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a non-specific antimicrobial response. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 189–196, 1 fev. 2011.
- KIEDROWSKI, M. R.; HORSWILL, A. R. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1241, n. 1, p. 104–121, 2011.
- KISSOYAN, K. A. B. et al. The inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by micafungin and the enhancement of antimicrobial agent effectiveness in BALB / c mice. **Biofouling**, v. 32, n. 7, p. 1–8, 2016.
- KLOTZ, S. 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.
- KONG, E. F. et al. Commensal Protection of *Staphylococcus aureus* against antimicrobials by *Candida albicans* biofilm matrix. **mBio**, v. 7, n. 5, p. e01365-16, 2 nov. 2016.
- KONG, E. F. et al. Modulation of *Staphylococcus aureus* response to antimicrobials by the *Candida albicans* quorum sensing molecule farnesol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 12, p. 1–14, 2017.
- KONG, K. F.; VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus quorum sensing* in biofilm formation and infection. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, n. 2–3, p. 133–139, 2006.
- KRÜGER, W. et al. Fungal-bacterial interactions: In health and disease. **Candida albicans: Cellular and Molecular Biology: Second Edition**, p. 115–143, 2017.
- KRUPPA, M. *Quorum sensing and Candida albicans*. **Mycoses**, v. 52, n. 1, p. 1–10, jan. 2009.
- KUSE, E. R. et al. Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidaemia and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. **Lancet**, v. 369, n. 9572, p. 1519–1527, 2007.
- LAMOTH, F. et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, p. i4–i13, 2018.
- LANDINI, P. et al. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 3, p. 813–823, 2010.
- LE, K. Y.; OTTO, M. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. OCT, p. 1–8, 2015.
- LEWIS, P. O. et al. Treatment strategies for persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 43, n. 5, p. 614–625, 2018.
- LI, D. D. et al. Using *Galleria mellonella-candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 9, p. 1482–

1487, 2013.

LIMBAGO, B. M. et al. Report of the 13th vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 998–1002, 2014.

LITTLE, D. J. et al. Structural Basis for the De- N -acetylation of Poly- β -1,6- N -acetyl-d-glucosamine in Gram-positive Bacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 52, p. 35907–35917, 26 dez. 2014.

LIU, G. Y. et al. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 2, p. 209–215, 2005.

LIU, P. et al. Farnesol induces apoptosis and oxidative stress in the fungal pathogen *Penicillium expansum*. **Mycologia**, v. 102, n. 2, p. 311–318, 2010.

LOH, J. M. S. et al. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 419–428, 2013.

LUIZ, R. L. F. et al. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2015.

ŁYSKOWSKI, A.; LEO, J. C.; GOLDMAN, A. Bacterial Adhesion : Chapter 9 : Structure and Biology of Trimeric Autotransporter Adhesins. In: **Europe**. [s.l.: s.n.]. v. 715p. 143–158.

LYU, X. et al. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. p. 1161–1171, 2016.

MACHIDA, K. et al. Farnesol-induced growth inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* by a cell cycle mechanism. **Microbiology**, v. 145, n. 2, p. 293–299, 1999.

MADIGAN, M. et al. **Microbiologia de Brock**. 14^a edição ed. [s.l.: s.n.].

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; AL., R. B. C. ET. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **BACTERIOLOGY**, v. 18, p. 268–281, 2011.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J. 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.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J. et al. *Candida* isolates causing candidemia show different degrees of virulence in *Galleria mellonella*. **Medical mycology**, v. 58, n. 1, p. 83–92, 2020.

MARRA, A. 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.

MBA, I. E.; NWEZE, E. I. Mechanism of *Candida* pathogenesis : revisiting the vital drivers. 2020.

MCMULLAN, B. J.; HONS, B.; CAMPBELL, A. J. Clinical Management of

- Staphylococcus aureus* Bacteremia in Neonates , Children , and Adolescents. v. 146, n. 3, 2020.
- MEDIAVILLA, J. R. et al. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 588–595, 2012.
- MEIR, M.; GROSFELD, T.; BARKAN, D. Establishment and Validation of *Galleria mellonella* as a Novel Model Organism To Study *Mycobacterium abscessus* Infection, Pathogenesis, and Treatment Michal. p. 1–9, 2018.
- MOHAMED, N. M.; ZAKARIA, A. S.; EDWARD, E. A. Antifungal caspofungin sensitizes MRSA isolates towards zaborfloxacin, a proteomic study. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 559–572, 2020.
- MORA-DUARTE, J. et al. Comparison of caspofungin and amphotericin b for invasive candidiasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 25, p. 2020–2029, 2002.
- MORIO, F. et al. Deciphering azole resistance mechanisms with a focus on transcription factor-encoding genes TAC1, MRR1 and UPC2 in a set of fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 5, p. 410–415, 2013.
- MORIO, F. et al. Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 5, p. 599–606, 2017.
- MOYES, D. L. et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. **Nature**, v. 532, n. 7597, p. 64–68, 2016.
- MUÑOZ, J. E. et al. Antifungal activity of the biphosphinic cyclopalladate C7a against *Candida albicans* yeast forms in vitro and in vivo. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, p. 1–10, 2017.
- NEOPANE, P. et al. In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. **International Journal of General Medicine**, v. 11, p. 25–32, 2018.
- NETT, J. E.; ANDES, D. R. Contributions of the biofilm matrix to candida pathogenesis. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 33–38, 2020.
- NICKERSON, E. K. et al. *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a tropical setting: Patient outcome and impact of antibiotic resistance. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, 2009.
- NUCCI, M. et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.
- O'TOOLE, G. A. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. **Journal of Visualized Experiments**, n. 47, p. 10–11, 2011.
- ORSI, C. F. et al. Impact of *Candida albicans* hyphal wall protein 1 (HWP1) genotype on biofilm production and fungal susceptibility to microglial cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 69–70, n. 1, p. 20–27, 2014.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L. et al. An insight into the antifungal pipeline: Selected new molecules and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 9, p. 719–727, 2010.

- OTTO, M. *Staphylococcus aureus* toxins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 32–37, 2014.
- PANTOSTI, A.; SANCHINI, A.; MONACO, M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 323–334, 2007.
- PAPPAS, P. G. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1–e50, 2016.
- PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. May, p. 1–20, 2018.
- PARAJE, M. G. Antimicrobial resistance in biofilms. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, v. 2, p. 736–744, 2011.
- PATERNINA-DE LA OSSA, R. et al. Is community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) an emerging pathogen among children in Brazil? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 371–376, 2018.
- PELEG, A. Y. et al. Reduced Susceptibility to Vancomycin Influences Pathogenicity in *Staphylococcus aureus* Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 4, p. 532–536, 2009.
- PELEG, A. Y.; HOGAN, D. A.; MYLONAKIS, E. Medically important bacterial-fungal interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 340–349, 2010.
- PERLIN, D. S. Echinocandin Resistance in *Candida*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. Suppl 6, p. S612–S617, 2015.
- PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. 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. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* -*Candida albicans* dual-species biofilms. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 493–503, 2010.
- PETERS, B. M. et al. *Staphylococcus aureus* adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 158, n. 12, p. 2975–2986, 2012.
- PFALLER, M. A. et al. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 10, p. 3185–3190, 2009.
- PFALLER, M. A. et al. Twenty years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* species from 1997-2016. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. Suppl 1, p. S79–S94, 2019.
- PIERCE, C. G. et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, p. 1494–1500, 2008.
- PRÉPOST, E. et al. Efficacy of humanized single large doses of caspofungin on the lethality and fungal tissue burden in a deeply neutropenic murine model against

Candida albicans and *Candida dubliniensis*. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 1805–1814, 2019.

PRESS, E. G.; SHIELDS, R. K.; CLANCY, C. J. Candida biofilm: Clinical implications of recent advances in research. **Current Fungal Infection Reports**, v. 8, n. 1, p. 72–80, 2014.

QU, Y. et al. Searching for new strategies against polymicrobial biofilm infections: Guanylated polymethacrylates kill mixed fungal/bacterial biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 2, p. 413–421, 2016.

QUINTELLA, L. P. et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: A series of 119 consecutive cases. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 38, n. 1, p. 25–32, 2011.

RAMAGE, G. et al. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

RAMAGE, G.; ROBERTSON, S. N.; WILLIAMS, C. Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 2, p. 114–120, fev. 2014.

REBOLI, A. C. et al. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 24, p. 2472–2482, 2007.

REUNES, S. et al. Risk factors and mortality for nosocomial bloodstream infections in elderly patients. **European Journal of Internal Medicine**, v. 22, n. 5, p. e39–e44, 2011.

REYNOLDS, P. E. Structure, Biochemistry and Mechanism of Action of Glycopeptide.pdf. v. 8, n. 11, p. 943–950, 1989.

ROGIERS, O. et al. Anidulafungin increases the antibacterial activity of tigecycline in polymicrobial *Candida albicans*/*Staphylococcus aureus* biofilms on intraperitoneally implanted foreign bodies. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 10, p. 2806–2814, 2018.

ROMO, J. A.; KUMAMOTO, C. A. On commensalism of candida. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 27–30, 2020.

RUSSELL, W.; BURCH, R. **PRILIMINARY AND CONTENTS.pdf**, 1959.

SANTE, L. et al. Epidemiological study of secondary bloodstream infections: The forgotten issue. **Journal of Infection and Public Health**, v. 12, n. 1, p. 37–42, 2018.

SASS, G. et al. Studies of *Pseudomonas aeruginosa* Mutants Indicate Pyoverdine as the Central Factor in Inhibition of *Aspergillus fumigatus* Biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 200, n. 1, p. 1–24, 2018.

SCHLECHT, L. M. et al. Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 161, n. 1, 2015.

SCUDIERO, O. et al. Human defensins: A novel approach in the fight against skin colonizing staphylococcus aureus. **Antibiotics**, v. 9, n. 4, p. 1–16, 2020.

SEBAA, S.; BOUCHERIT-OTMANI, Z.; COURTOIS, P. Effects of tyrosol and farnesol on *Candida albicans* biofilm. **Molecular Medicine Reports**, v. 19, n. 4, p. 3201–3209,

2019.

SHEEHAN, G.; TULLY, L.; KAVANAGH, K. A. *Candida albicans* increases the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* during polymicrobial infection of *Galleria mellonella* larvae. **Microbiology**, p. 375–385, 2020.

SHORR, A. F. et al. Healthcare-associated bloodstream infection: A distinct entity? Insights from a large U.S. database. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 10, p. 2588–2595, 2006.

SIALA, W. et al. The antifungal caspofungin increases fluoroquinolone activity against *Staphylococcus aureus* biofilms by inhibiting *N-acetylglucosamine transferase*. **Nature Communications**, v. 7, 2016.

SILVA, S. et al. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 241–247, 2011.

SLATER, J. L. et al. Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice. **Medical Mycology**, v. 49, n. SUPPL. 1, p. 107–113, 2011.

SPADARI, C. DE C. et al. Alginate nanoparticles as non-toxic delivery system for miltefosine in the treatment of candidiasis and cryptococcosis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 5187–5199, 2019.

SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 317–324, 2004.

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

SWIDERGALL, M.; ERNST, J. F. Interplay between *Candida albicans* and the antimicrobial peptide armory. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 8, p. 950–957, 2014.

THWAITES, G. E.; GANT, V. Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of *Staphylococcus aureus*? **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 215–222, 2011.

TODD, O. A. et al. *Candida albicans* augments *Staphylococcus aureus* virulence by engaging the staphylococcal agr quorum sensing system. **mBio**, v. 10, n. 3, p. 1–16, 2019.

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015.

TREVIJANO-CONTADOR, N.; ZARAGOZA, O. Immune response of *Galleria mellonella* against human fungal pathogens. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 1–13, 2019.

TSAI, C. J. Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214–229, 2016.

VERTYPOROKH, L.; WOJDA, I. Immune response of *Galleria mellonella* after injection with non-lethal and lethal dosages of *Candida albicans*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 170, n. October 2019, p. 107327, 2020.

- VILA, T. et al. Miltefosine inhibits *Candida albicans* and non-albicans *Candida* spp. biofilms and impairs the dispersion of infectious cells. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 5, p. 512–520, 2016.
- VILA, T. et al. *Candida albicans* quorum-sensing molecule farnesol modulates staphyloxanthin production and activates the thiol-based oxidative-stress response in *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 625–642, 2019.
- VUONG, C. et al. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 6, p. 1688–1693, 2000.
- WANG, X. et al. Farnesol induces apoptosis-like cell death in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, v. 106, n. 5, p. 881–888, 2014.
- WIJESIRI, N. et al. Photodynamic Inactivation of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Using Hybrid Photosensitizers Based on Amphiphilic Block Copolymer-Functionalized Gold Nanoparticles. **ACS Omega**, v. 2, n. 9, p. 5364–5369, 2017.
- WILLIAM COSTERTON, J. et al. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711–745, 1995.
- WISPLINGHOFF, H. 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.
- WITCHLEY, J. N. et al. *Candida albicans* Morphogenesis Programs Control the Balance between Gut Commensalism and Invasive Infection. **Cell Host and Microbe**, v. 25, n. 3, p. 432–443.e6, 2019.
- WOJDA, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Science**, v. 24, n. 3, p. 342–357, 2017.
- XU, Z. et al. Crystal Violet and XTT Assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm Quantification. **Current Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 474–482, 2016.
- YI, A. et al. Interactions between *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* within mixed species biofilms. **BioOne Complete**, v. 84, n. 1, p. 30–39, 2013.
- YOUSEFI, M. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* biofilm formation in urinary tract infection. **Iranian Journal of Public Health**, v. 45, n. 4, p. 485–493, 2016.
- ZHAO, J.; YU, W. Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis. **PeerJ**, v. 2018, n. 11, 2018.