

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

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*.

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 (Agencia 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 candidalísina, 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 uma 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, histoplasmose 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 medicamentosas (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-glucana 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 America 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 microbicidas 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 à 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 Pantón-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 coinfeção; 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

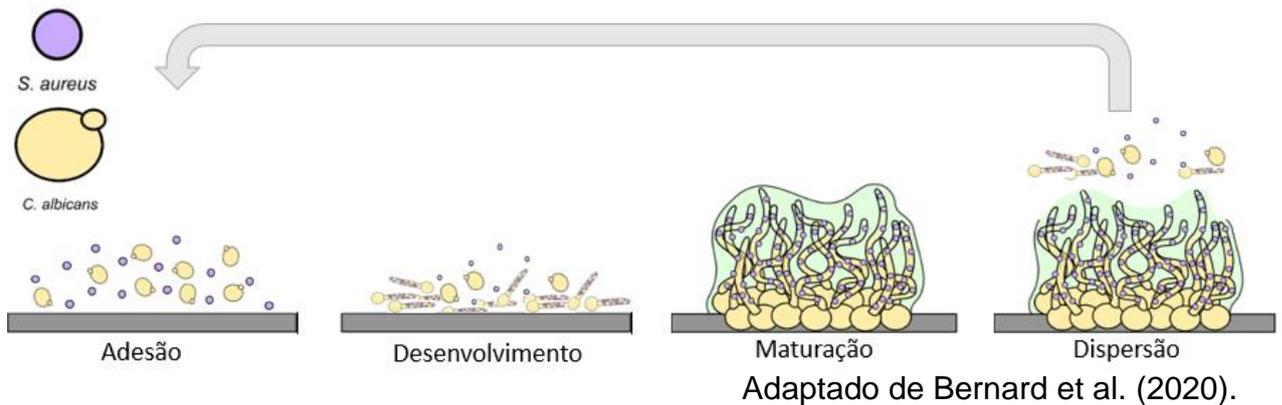
C. albicans e *S. aureus*, frequentemente, coexistem em biofilmes polimicrobianos sobre superfícies dos tecidos do hospedeiro ou no ambiente. Biofilmes polimicrobianos representam um problema de saúde clinicamente relevante com potencial para servir como reservatório infeccioso para uma variedade de 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.

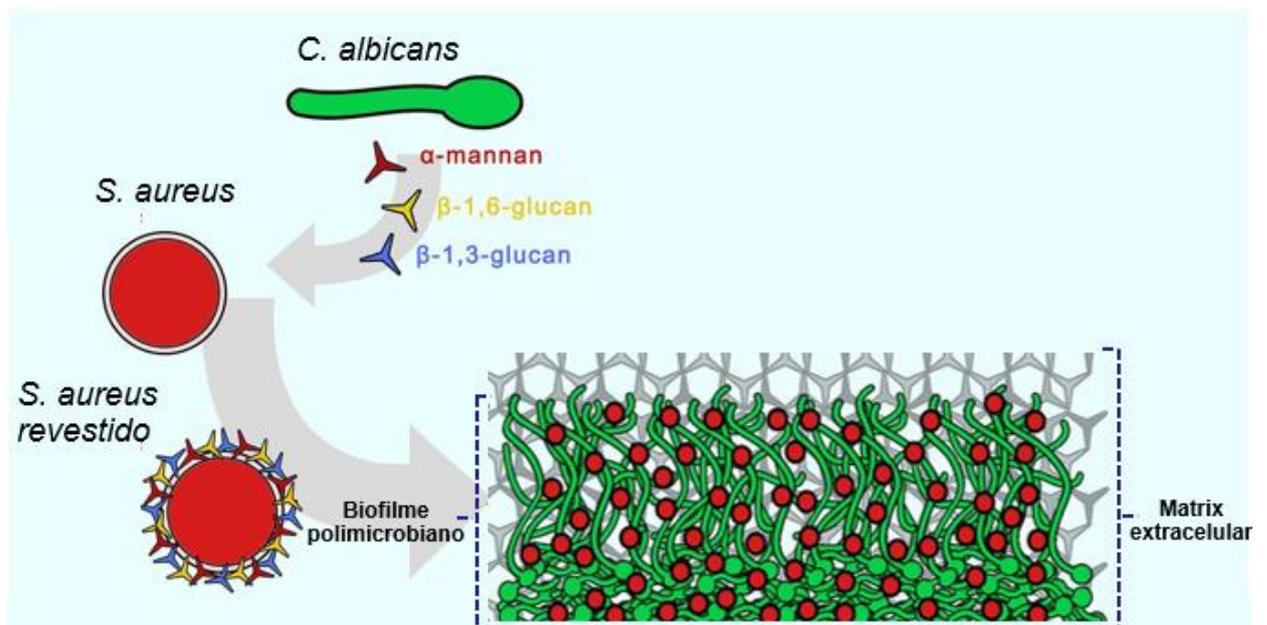


Um dos primeiros ensaios evidenciando a interação entre *S. aureus* e *C. albicans* foi baseada em um estudo onde as bactérias e fungos foram injetados em diferentes locais do mesmo camundongo. Foi observado que *S. aureus* se disseminava para o local da infecção fúngica e se aderiu às hifas de *C. albicans*, porém o mesmo não ocorria no local da injeção bacteriana (CARLSON; JOHNSON, 1985). Ensaios 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-infectivas. 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. 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.

3. 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. Micafungin 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.