

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LETÍCIA KRAFT

COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FLUCONAZOL,
ANIDULAFUNGINA, ANFOTERICINA B E ANFOTERICINA B COMPLEXO
LIPÍDICO EM BIOFILME DE *Candida albicans* ISOLADO DE CANDIDEMIA DE
ESCAPE

CURITIBA
2020

LETÍCIA KRAFT

**COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FLUCONAZOL,
ANIDULAFUNGINA, ANFOTERICINA B E ANFOTERICINA B COMPLEXO
LIPÍDICO EM BIOFILME DE *Candida albicans* ISOLADO DE CANDIDEMIA DE
ESCAPE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon

Coorientadora: Dr^a. Paula Hansen Suss

CURITIBA

2020

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Felipe F. B. Tuon, por depositar sua confiança em mim, e pelos inúmeros momentos de aprendizado. Me sinto honrada por poder trabalhar e dividir experiências contigo.

À minha coorientadora, Dra. Paula H. Suss, pela oportunidade de crescimento, e por despertar em mim a paixão pela ciência. Sem você, eu provavelmente não estaria aqui hoje.

À banca examinadora composta pelo Dr. Fábio A. Motta e Dra. Luiza S. Rodrigues, por aceitar o convite, como também pela sua valiosa contribuição e avaliação deste estudo.

À PUCPR e ao PPGCS e CNPq, pela oportunidade de estudo e concessão de bolsa.

Ao meu marido, Gabriel, pelo amor incondicional, paciência, incentivo e encorajamento. Minhas conquistas também são as suas.

Aos meus pais, Marcio e Regina, por tanto amor e dedicação na minha criação. Hoje vocês realizam um sonho em mim.

Aos meus queridos amigos do LEID – Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Victoria Stadler Ribeiro, Juliette Cieslinski, Geiziane Gonçalves, Letícia Dantas, Ana Paula Andrade, Carmen Ito, Larissa Bail e Lavínia Arend, companheiros de pesquisa, experimentos, discussões, aulas e aprendizados.

À Irenice Cairo e à Equipe do BTH – Banco de Tecidos Humanos, Dra. Luciana Wollmann, Adriane Silva, Eunice Santos, Mônica Pereira, Renata Ferreira, Roseli Nareski, por toda ajuda, paciência e dedicação.

Ao professor Edvaldo Rosa e sua esposa Rosimeire Rosa, por compartilhar suas experiências em trabalhos relacionados a biofilme. Vocês abriram minha mente e me guiaram durante o desenvolvimento da pesquisa.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A formação de biofilme é um dos principais fatores de virulência e resistência da *Candida albicans*; no entanto, nunca foi estudada a susceptibilidade das células sésseis de isolados de candidemia de escape. **OBJETIVO:** Avaliar a atividade antifúngica do fluconazol, anidulafungina, anfotericina B e anfotericina B complexo lipídico (ABCL) nos biofilmes produzidos por *C. albicans* isolada de pacientes com candidemia de escape. **MÉTODOS:** Cepas de *C. albicans* isoladas de candidemia de escape e não escape (grupo controle), foram utilizadas em nosso estudo. A retenção de cristal violeta no biofilme e a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada para classificação da intensidade de produção de biofilme em poliestireno. A suscetibilidade das células planctônicas à anfotericina B, anidulafungina e fluconazol foi realizado através de microdiluição em caldo. Nas células sésseis, a atividade antifúngica foi determinada pela Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme (MBEC), estimativa da atividade metabólica por redução de MTT, e estimativa de biomassa por retenção do cristal violeta. **RESULTADOS:** Todos os isolados foram classificados como fortes produtores de biofilme, onde no MEV foi possível observar blastoconídeos e hifas entrelaçadas, aderidos ao poliestireno. As cepas apresentaram sensibilidade na forma planctônica a anfotericina B, anidulafungina e fluconazol, com concentração inibitória mínima de 1 mg/L, $\leq 0,03$ mg/L e 2 mg/L, respectivamente. No entanto, o fluconazol e anidulafungina não obtiveram ação antifúngica no biofilme. Somente a anfotericina B e ABCL reduziram a atividade metabólica e biomassa, mas a erradicação só foi alcançada utilizando 16 mg/L de anfotericina B (não associada a lipídios). **CONCLUSÃO:** Candidemias de escape associadas a *C. albicans* forte produtora de biofilme, apresenta difícil tratamento antifúngico *in vitro* com as opções terapêuticas disponíveis. No nosso estudo, apenas a anfotericina B e ABCL obtiveram ação anti-biofilme sobre os isolados sésseis de candidemia de escape.

PALAVRAS-CHAVE: Candidemia de escape; biofilme; *Candida albicans*; antifúngico.

ABSTRACT

BACKGROUND: Biofilm formation is one of the main factors of virulence and resistance of *Candida albicans*, however, the susceptibility of sessile cells to breakthrough candidemia isolates has never been studied. **OBJECTIVES:** We evaluate the antifungal activity of fluconazole, anidulafungin, amphotericin B and amphotericin B lipid complex (ABLC) against the biofilm of *Candida albicans* isolated from patients with breakthrough candidemia. **METHODS:** Strains of *C. albicans* isolated from breakthrough and non-breakthrough candidemia (control group) were used in our study. The retention of violet crystal in the biofilm and the Scanning Electron Microscopy (SEM) was used to classify the intensity of biofilm production in polystyrene. The susceptibility of planktonic cells to amphotericin B, anidulafungin and fluconazole was carried out through broth microdilution. In sessile cells, antifungal activity was determined by the Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC), estimated metabolic activity by reducing MTT, and estimated biomass by violet crystal retention. **RESULTS:** All isolates were classified as strong biofilm producers, where in the SEM it was possible to observe interlaced blastoconids and hyphae, adhered to polystyrene. The strains showed sensitivity in the planktonic form to amphotericin B, anidulafungin and fluconazole, with a minimum inhibitory concentration of 1 mg/L, ≤ 0.03 mg/L and 2 mg/L, respectively. However, fluconazole and anidulafungin did not obtain antifungal action on the biofilm. Only amphotericin B and ABCL reduced metabolic activity and biomass, but eradication was only achieved using 16 mg/L amphotericin B (not associated with lipids). **CONCLUSION:** Breakthrough candidemia associated with *C. albicans* strong biofilm producer, presents difficult antifungal treatment in vitro with the therapeutic options available. In our study, only amphotericin B and ABCL obtained anti-biofilm action on sessile breakthrough candidemia isolates.

KEYWORDS: Breakthrough-candidemia; biofilm; *Candida albicans*; antifungal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas para a formação do biofilme de leveduras baseada na descrição por Harding e colaboradores (2009).

Figura 2. Imagens obtidas através da MEV de biofilmes formados por *Candida albicans*, isolados de candidemia de escape e não escape em discos de poliestireno.

Figura 3. MBEC do fluconazol, anidulafungina, anfotericina B e ABCL (mg/L) nos biofilmes formados por *Candida albicans*, isolados de candidemia de escape e não escape.

Figura 4. Redução do metabolismo celular (%) nos biofilmes formados por *Candida albicans*, isolados de candidemia de escape e não escape, utilizando fluconazol, anidulafungina, anfotericina B e ABCL (mg/L).

Figura 6. Redução de biomassa (%) nos biofilmes formados por *Candida albicans*, isolados de candidemia de escape e não escape, utilizando fluconazol, anidulafungina, anfotericina B e ABCL (mg/L).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação de produção de biofilme de *Candida albicans* isolados de candidemia de escape e não escape através da estimativa por retenção de biomassa.

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antifúngicos, para células planctônicas de *Candida albicans* isolados de candidemia de escape e não escape.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
ABCL	Anfotericina B Complexo Lipídico
ATCC	Coleção de microrganismos Norte americana (do inglês: American Type Culture Collection)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DFI	Doença fúngica invasiva
dH ₂ O	Água destilada
DO	Densidade Óptica
DO _B	Densidade Óptica do biofilme
DO _C	Densidade Óptica do controle negativo
DP	Disco de poliestireno
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMDS	Hexametildisilazano (do inglês: Hexamethyldisilazane)
L	Litro
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MALDI-TOF	Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz: tempo de voo (do inglês: Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight)
MBEC	Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MTT	{brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês: phosphate buffered saline)
PC	Controle positivo
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
rpm	Rotações por minuto
UFC	Unidade Formadora de colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	Doenças Fúngicas Invasivas (DFI) e Candidemia de escape	9
1.2	Os grupos de risco e fatores de risco para DFI	10
1.3	Principais microrganismos causadores de DFI	10
1.4	DFI específicas causadas pelo gênero <i>Candida</i>	11
1.5	<i>Candida albicans</i> e seus fatores de virulência	12
1.6	Biofilmes de <i>Candida albicans</i>	13
1.7	Agentes antifúngicos	15
2	JUSTIFICATIVA	18
3	OBJETIVO GERAL	19
3.1	Objetivos específicos	19
4	MÉTODOS.....	20
4.1	Grupo de estudo/seleção das amostras	20
4.2	Identificação dos microrganismos por MALDI-TOF	20
4.3	Antifúngicos	21
4.4	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	21
4.5	Cultivo da levedura para produção do biofilme	22
4.6	Produção do biofilme em microplaca de 96 poços.....	22
4.7	Teste de susceptibilidade a antifúngicos em biofilmes de <i>Candida albicans</i> de escape e não escape	23
4.8	Determinação da Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme (MBEC).....	23
4.9	Estimativa da atividade metabólica pelo ensaio de redução do MTT	23
4.10	Estimativa de biomassa por retenção de cristal violeta.....	24
4.11	Classificação do biofilme	24
4.12	Análise do biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	24
4.13	Análise estatística	25
5	RESULTADOS	26
6	DISCUSSÃO	32
	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
	ANEXOS	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Fúngicas Invasivas (DFI) e Candidemia de escape

Nos últimos anos é observado o aumento global da frequência de doenças fúngicas invasivas (DFI) em humanos, e, apesar das opções terapêuticas antifúngicas atuais, representam uma importante causa de morbidade com alto índice de mortalidade, com aproximadamente 30% dos casos (BITAR et al., 2014; MOTTA et al., 2017). De maneira geral, as DFI também estão associadas a dificuldades de diagnóstico, resistência aos antimicrobianos, extensão do tempo de internação e aumento dos custos hospitalares (CORNELLY, 2008; PERFECT, 2013).

Antigamente conhecidas como infecção fúngica disseminada ou sistêmica, são mais graves que as micoses e candidíases em superfície de pele e mucosas, acometendo a corrente sanguínea, órgãos e líquidos cavitários, podendo apresentar uma grande variedade de manifestações clínicas (HOBSON, 2003). Os dados epidemiológicos existentes geralmente se originam da candidemia (CONCIA; AZZINI; CONTI, 2009).

Candidemia é definida como a invasão da corrente sanguínea por leveduras do gênero *Candida*. A presença desses microrganismos no sangue pode ser classificada como candidemia transitória, intermitente, contínua ou de escape. A do tipo transitória é geralmente rápida, com duração de alguns minutos a poucas horas, ocorrendo após manipulação de um tecido infectado ou colonizado por *Candida* spp. Quando essa se manifesta em intervalos variáveis de tempo e com o mesmo microrganismo, é denominada intermitente. A candidemia contínua é característica da endocardite infecciosa e de outras infecções vasculares (OPLUSTIL et al., 2010). A do tipo escape é definida como uma candidemia em determinado paciente que recebeu um agente antifúngico sistêmico por pelo menos três dias anteriores ao diagnóstico (NUCCI; COLOMBO, 2002).

A incidência de candidemia de escape é variável, podendo chegar de 9% a 18% dos casos de candidemia em hospitais de grande porte e complexidade, e 14% em pacientes pediátricos. Porém, em pacientes portadores de doenças hematológicas graves, a incidência pode chegar a 52%. Múltiplos fatores de risco foram associados, como a presença de cateteres, neutropenia, doenças malignas, cirurgias abdominais e transplante de tecidos e órgãos (BREDA et al., 2017; CUERVO et al., 2016; GAMALETSOU et al., 2014; LAI et al., 2017).

A fonte de infecção para candidemia é frequentemente endógena, a partir de leveduras que estavam colonizando ou causando infecção em um sítio específico. A infecção exógena também é gerada através da manipulação do paciente e dos dispositivos invasivos (HAMAL; KAPPE; RIMEK, 2001; STANISZEWSKA et al., 2012).

1.2 Os grupos de risco e fatores de risco para DFI

A incidência das DFI está aumentando, especialmente na população de imunocomprometidos (ENOCH; LUDLAM; BROWN, 2006; MARTIN et al., 2003; ZILBERBERG; SHORR; KOLLEF, 2008). Pacientes neutropênicos, com leucemia, receptores de transplante de células-tronco hematopoiéticas e de órgãos sólidos, portadores de HIV, idosos e pacientes com queimaduras graves, possuem maior chance de desenvolver DFI. Tratamentos medicamentosos, como o uso de antibióticos de amplo espectro, corticosteroides sistêmicos e de quimioterapias citotóxicas, também foram relacionadas. Além disto, fatores associados a assistência à saúde, como necessidade de diálise e ventilação mecânica, uso de cateteres, ou, internamento por longos períodos em UTI (> 21 dias), aumentam o risco do desenvolvimento de DFI e mortalidade, por fungos oportunistas comuns e incomuns (BADDLEY, 2011; LOW; ROTSTEIN, 2011; MOTTA et al, 2017; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Estes pacientes são mais suscetíveis a infecções por organismos de pequena virulência nativa a hospedeiros saudáveis (FRARE; SILVA, 2010). Assim, como consequência do comprometimento dos mecanismos de defesa dos hospedeiros hospitalizados, estes microrganismos passaram a se comportar como oportunistas, sendo capazes de causar quadros infecciosos (DE PAUW; PICAZO, 2008).

1.3 Principais microrganismos causadores de DFI

Em todo o mundo, *Candida* spp. são os agentes de infecção por fungos mais prevalentes, correspondendo a aproximadamente 50% dos casos (CASSONE, 2015; COLOMBO et al., 2006; DORGAN; DENNING; MCMULLAN, 2015; MORTENSEN; DENNING; ARENDRUP, 2015). Na América Latina, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp. e *Pneumocystis jirovecii* também tem alta prevalência, mas também seguidos da *Candida* spp. (PFALLER; DIEKEMA, 2010).

No Brasil, um país continental com uma população superior a 200 milhões de pessoas, nenhuma das infecções fúngicas humanas está atualmente na lista de

doenças oficialmente reportáveis. Essa situação dificulta a aquisição de dados epidemiológicos e oculta a real incidência de infecções fúngicas superficiais e invasivas no país (GIACOMAZZI et al., 2016).

1.4DFI específicas causadas pelo gênero candida

Existem mais de 150 espécies conhecidas de *Candida*. No entanto, aproximadamente 15 dessas espécies são isoladas dos pacientes como agentes infecciosos. Estas são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa* e *C. norvegensis* (YAPAR, 2014). Embora as frequências de isolamento possam variar, nos últimos 30 anos, foi observado que em 95% das infecções, os patógenos envolvidos são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (DIEKEMA et al., 2012; LEWIS, 2009; MCCARTY; PAPPAS, 2016; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

A casuística da candidemia observada na América Latina no período entre 2008 a 2010, a *C. albicans* foi o principal agente (37,6%), seguido por *C. parapsilosis* (26,5%), *C. tropicalis* (17,6%), *C. guilliermondii* (6,5%), *C. glabrata* (6,3%) e *C. krusei* (2,7%). Houve uma grande variabilidade na distribuição de espécies nos diferentes países. O Equador teve a maior proporção de episódios devido a *C. albicans* (52,2%) e Honduras e Venezuela, a menor (27,4% e 26,8%, respectivamente). Enquanto *C. parapsilosis* foi altamente prevalente na maioria dos países, foi menos frequente em Honduras (14,1%). Por outro lado, *C. guilliermondii* era muito comum naquele país (20,7%). A maior proporção de episódios causados por *C. glabrata* foi observada no Brasil (10%) e a menor foi na Venezuela (1 episódio, 2,4%) (NUCCI et al., 2013).

Braga et al., (2018) avaliaram 331 episódios de candidemia de escape diagnosticados em um período de 20 anos (1996-2016) em um hospital terciário afiliado a uma universidade no Brasil. Naquele estudo, o agente etiológico mais frequente da candidemia foi *C. albicans* (37,5%), seguida por *C. tropicalis* (28,1%), *C. parapsilosis* (18,4%) e *C. glabrata* (6,9%). Os 30 episódios restantes foram causados por *C. pelliculosa* (7 episódios), *C. krusei* e *C. famata* (6 episódios), *C. guilliermondii* (5 episódios), *C. kefyr* (3 episódios) e *C. zeylanoides*, *C. lipolytica* e *Pichia ohmeri* (1 episódio).

1.5 *Candida albicans* e seus fatores de virulência

C. albicans é um fungo leveduriforme dimórfico, pertencente da microbiota humana saudável, colonizando assintomaticamente o trato gastrointestinal, cavidade bucal, pele e genital feminino. No entanto, variações no equilíbrio desses ambientes tornam essas leveduras em oportunistas, gerando infecções superficiais, profundas ou sistêmicas (BARBOSA et al., 2017; GULATI; NOBILE, 2016).

Os mecanismos dos fatores de virulência correspondem aos produtos ou estratégias do microrganismo que contribuem para aumentar a sua capacidade de causar uma infecção. Esses fatores são complexos e multifatoriais. Dentre os principais mecanismos de virulência da *C. albicans* destaca-se o dimorfismo celular, produção de adesinas e enzimas hidrolíticas e formação de biofilme (STANISZEWSKA et al., 2012).

A capacidade da *C. albicans* em apresentar a forma leveduriforme e hifas é denominado dimorfismo. A forma leveduriforme são disseminadas com maior facilidade na corrente sanguínea (STANISZEWSKA et al., 2012). As hifas são células alongadas, com paredes celulares paralelas, sem constrição mãe-filha ou junção septal. A forma hifal é fundamental para adaptação, em resposta à mudança das condições ambientais, como também a maior adesão e invasão dos tecidos (BRAND, 2012; WÄCHTLER et al., 2011).

As adesinas são biomolécula que promovem a aderência da *C. albicans* a superfícies abióticas ou bióticas. A adesão e a formação de hifas estão fundamentalmente relacionadas: o contato da levedura com as superfícies estimula a formação de hifas e a indução simultânea de adesinas associadas a hifas. Esses eventos, por sua vez, aumentam a aderência do fungo.

A produção de enzimas hidrolíticas como a aspartil protease, fosfolipases e lipases, está associado a colonização das membranas e mucosas, permitindo a penetração tecidual e destruição de células imunes e anticorpos (SCHALLER et al., 2000; SCHILD et al., 2011).

Um importante atributo de virulência é sua capacidade de formar biofilmes, comunidades densamente compactadas de células aderidas a uma superfície. Os biofilmes são intrinsecamente resistentes à terapêutica antifúngica convencional, ao sistema imunológico do hospedeiro e a outros fatores ambientais, tornando as infecções associadas ao biofilme um desafio clínico significativo (GULATI; NOBILE, 2016).

1.6 Biofilmes de *Candida albicans*

A formação de biofilme é um mecanismo comum usado por microrganismos para sobreviver em locais hostis, conferindo proteção das células contra os fatores externos (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004). O termo “biofilme” é definido como uma comunidade formada por microrganismos, aderidos a uma superfície e envolvido por uma matriz extracelular polimérica (GUPTA, 2015). Os biofilmes são estudados em uma ampla gama de disciplinas científicas, como engenharia de alimentos, engenharia ambiental, odontologia e em saúde pública (AUSTIN; BERGERON, 1995; COSTERTON, 2001; DAVIES, 2003; HUANG et al., 2019; SILVA et al., 2018). Essas comunidades podem ser habitadas por uma única espécie ou por diferentes microrganismos (bactérias e fungos) organizadas de acordo com a arquitetura do biofilme (CHEVALIER; RANQUE; PRÊCHEUR, 2018).

Os biofilmes têm causado danos à saúde e, cada vez mais, seu desenvolvimento revela ser causa de contaminação e infecções persistentes, principalmente nos setores de assistência à saúde. Além disso, os biofilmes de fungos são um problema clínico crescente, associado ao aumento da mortalidade (RODRIGUES et al, 2019; WILLIAMS; COSTERTON, 2012).

Biofilmes de *C. albicans* são produzidos em cinco estágios (Figura 1). No primeiro estágio ocorre uma firme adsorção das leveduras em uma superfície através de interações físico-químicas; no segundo estágio ocorre a adesão, havendo um aumento de células agrupadas pela presença da matriz extracelular polimérica; no terceiro estágio há formação de microcolônias que produzem uma camada basal e iniciam o desenvolvimento de pseudo-hifas com aumento da produção de matriz, levando ao estabelecimento de agregados em multicamadas; no quarto estágio ocorre a maturação que é constituída por numerosas microcolônias com pseudo-hifas entrelaçadas e presença de canais onde permite a passagem de água e nutrientes; e no último estágio ocorre a dispersão, havendo liberação de células que poderão dar início a um novo ciclo de formação do biofilme (HARDING et al., 2009).

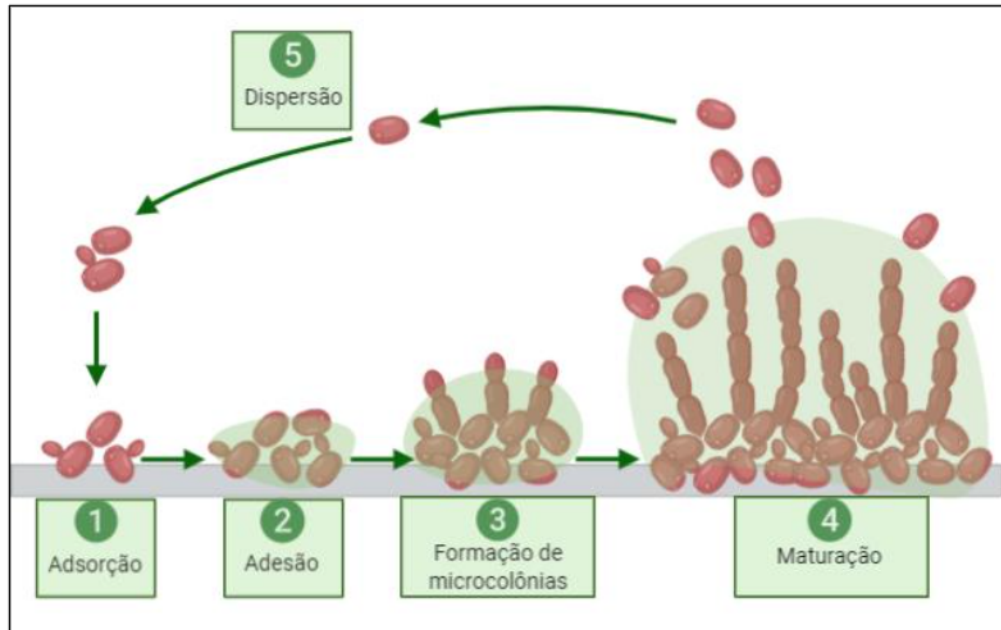


Figura 1. Etapas para a formação do biofilme de leveduras baseada na descrição por Harding e colaboradores (2009). Fonte: o autor (2020), criado em Biorender.com.

A composição da matriz é dinâmica e é afetada pelo ambiente, desse modo, alterações como ausência ou presença de nutrientes, água, temperatura e pH, impactam diretamente no biofilme. A matriz extracelular é um forte fator de resistência dessas comunidades, e, no caso da *C. albicans*, a composição basicamente constituída por carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (MITCHELL; ZARNOWSKI; ANDES, 2016).

O processo de formação do biofilme é semelhante entre as espécies, mas as arquiteturas estruturais apresentam algumas propriedades únicas, conforme observado por meio de microscopia eletrônica de varredura (COSTA et al. 2013). O biofilme de *C. albicans* é composto por uma mistura heterogênea de leveduras, pseudo-hifas e hifas entrelaçadas, enquanto outras espécies são compostas basicamente de leveduras (SILVA et al., 2017).

Alta resistência multifatorial é uma característica intrínseca do biofilme (TAFF et al., 2013). Dentre os fatores, a proteção contra a imunidade do hospedeiro, os estresses ambientais derivados de choque mecânico e antifúngicos, a depleção ou os desequilíbrios nutricionais, a heterogeneidade da população, a redução da taxa de crescimento das células no interior do biofilme, a expressão de bombas de efluxo e a diferença na expressão gênica dependente da comunidade, favorecem a alta resistência. Esta estabilidade é grave, pois diversos fármacos não agem em biofilmes

(MONTAGNA et al., 2014; MUKHERJEE; CHANDRA, 2015; PRASAD; KAPOOR, 2005).

1.7 Agentes antifúngicos

Para o tratamento sistêmico das candidemia, três classes de antifúngicos são usados: equinocandinas, azóis e polienos (CAMPOY; ADRIO, 2017).

A classe das equinocandinas é composta pela anidulafungina, caspofungina e micafungina, e são lipopeptídeos semi-sintéticos derivados de produtos naturais produzidos por fungos. Atuam diretamente na parede celular, ligando-se seletivamente a enzima 1,3- β -D glucana sintase, inibindo a produção de β -glucana, polissacarídeo estrutural que constitui mais de 50% da parede celular dos fungos. Dessa forma, leva à ruptura da parede celular em crescimento, resultando em instabilidade osmótica e morte das células (CAMPOY; ADRIO, 2017). A resistência à equinocandina entre as espécies de *Candida* é relativamente baixa (inferior a 3%), exceto para a *C. glabrata*, onde a resistência em níveis mais altos é relatada em alguns locais clínicos, e, frequentemente associada à resistência aos azóis. Esta resistência adquirida é resultado de alterações em aminoácidos das subunidades Fks da 1,3- β -D glucana sintase (PERLIN, 2015).

Os azóis são os medicamentos mais utilizados na terapia antifúngica. Possuem um amplo espectro de atividade contra fungos patogênicos clinicamente relevantes e são utilizados para tratamento e prevenção dessas infecções. Os azóis são moléculas orgânicas cíclicas classificadas em dois grupos: imidazóis (clotrimazol, miconazol e cetoconazol) e triazóis (primeira geração: itraconazol e fluconazol; segunda geração: voriconazol e posaconazol). As duas classes de azóis formam um grupo de agentes fungistáticos e inibem a enzima lanosterol 14 α -desmetilase (codificada por *ERG11*), dependente do citocromo P450 (CYP), levando à deficiência de ergosterol e ao acúmulo de esteróis 14 α -metilados nas membranas celulares (CAMPOY; ADRIO, 2017; HAEGLER et al., 2017).

A resistência aos azóis é variável, sendo que muitas alterações do gene alvo *ERG11* foram encontradas. Estudos sugerem que o alto polimorfismo genético mostrou a diminuição da afinidade do alvo pelos azóis. A resistência ao fluconazol pode ser causada por mutações no alvo do fármaco, alterações na via de biossíntese de esteróis e por mutações de ganho de função nos fatores de transcrição, que resultam na regulação positiva constitutiva dos genes de biossíntese de ergosterol e

bombas de efluxo de múltiplas drogas (MORIO et al., 2010; MORSCHHÄUSER, 2016; SANGLARD, 2016).

Os polienos, como a anfotericina B, são agentes antimicóticos mais antigos. O polienos ligam-se diretamente ao ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana e provocando extravasamento dos componentes intracelulares e Dos íons de sódio e potássio. Em geral, atuam como fungistáticos, embora, em concentrações próximas aos limites superiores de tolerância possam ser fungicidas (HAMILL, 2013; SHUKLA et al., 2018). A indução do estresse oxidativo celular é outro mecanismo de ação importante da anfotericina B, evidenciado também pela expressão dos genes de estresse celular, por mecanismos ainda não completamente conhecidos (MESA-ARANGO; SCORZINO; ZARAGOZA, 2012).

Existem diferentes formulações para uso clínico de anfotericina B, sendo a anfotericina B desoxicolato a mais utilizada. Quando a anfotericina B desoxicolato é administrada e entra na corrente sanguínea, o desoxicolato separa-se prontamente do princípio ativo. Então a molécula de anfotericina B liga-se às lipoproteínas plasmáticas (HDL e LDL) e é distribuída pelo organismo (FALCI; PASQUALOTTO, 2015). No entanto, o uso da anfotericina B desoxicolato é acompanhado por toxicidades com dose limitada, como reações relacionadas à infusão e nefrotoxicidade (BOTERO; PUENTES-HERRERA; CORTÉS, 2014). Com o objetivo de otimizar o antifúngico, formulações lipídicas de anfotericina B foram desenvolvidas como uma alternativa mais segura que a convencional, com eficácia no mínimo equivalente. Isto ocorre, pois, possuem maior afinidade com a lipoproteína HDL, gerando menor interação com as células tubulares renais por conta da escassez de receptores HDL neste sítio, reduzindo a toxicidade do agente ativo nos rins (HAMILL, 2013).

A resistência a anfotericina B é a menos relatada; porém algumas cepas de *Candida* sp. resistentes a múltiplas drogas estão associadas a mutações no ponto de função ou mutações simultâneas na via de biossíntese do ergosterol (*ERG2*, *ERG3*, *ERG5* e *ERG11*) (SANGLARD, 2016).

Formas planctônicas (células livres/flutuantes) e sésseis (biofilme) dos fungos têm diferentes susceptibilidades antimicrobianas, visto que é necessário uma concentração entre quatro e oito vezes maiores de anfotericina B para eliminar as células do biofilme em comparação com as células planctônicas (RODRIGUES et al., 2016; RODRIGUES; HENRIQUES, 2017). O uso de azóis sobre essas comunidades também tem sido estudado, onde na presença desses antifúngicos, ocorre um

aumento na expressão de genes de resistência e das bombas de efluxo, sendo incapazes de erradicar todas as células dentro de um biofilme (FERNANDES; SILVA; HENRIQUES, 2016; FONSECA et al., 2014).

Conforme as recomendações da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (2015), o tratamento para candidemia em pacientes não neutropênicos inicia-se com uma equinocandina, e a transição para o fluconazol (geralmente em 5 a 7 dias) é recomendada para pacientes clinicamente estáveis, com cepas suscetíveis ao triazol. Formulações lipídicas de anfotericina B é a terceira alternativa, se houver disponibilidade limitada ou resistência aos outros antifúngicos. Em pacientes neutropênicos o uso da equinocandina permanece em primeiro lugar como terapia inicial, mas dessa vez seguida pelas formulações lipídicas de anfotericina como alternativa.

2 JUSTIFICATIVA

A candidemia é uma infecção caracterizada pela presença de *Candida* spp. na corrente sanguínea. Alguns fatores estão diretamente associados ao desenvolvimento da candidemia, como uso de dispositivos médicos invasivos, pacientes imunocomprometidos, e o tratamento profilático com antifúngicos (GUDLAGSSON et al., 2003; DIMOPOULOS et al., 2008; LEROY et al., 2009; NUCCI, 2011; HAMMOUD et al., 2013; KANG et al., 2017).

À medida que o número de pacientes gravemente imunocomprometidos suscetíveis à DFI aumenta, mais pacientes são candidatos a receber antifúngicos sistêmicos para tratamento e profilaxia. O uso de antifúngicos reduz a incidência e a mortalidade por DFI, no entanto, alguns pacientes desenvolvem a infecção, ainda que recebam terapia com agente antifúngico sistêmico. Nestes casos, a infecção é definida como candidemia de escape (BREDA et al., 2017).

A incidência de candidemia de escape varia de acordo com a doença, podendo chegar a uma incidência de 52% em pacientes com comorbidades hematológicas (BREDA et al., 2017; GAMALETSSOU et al., 2014; LAI et al., 2017).

A candidemia está frequentemente associada a formação de biofilme por *Candida* spp. em dispositivos médicos invasivos, como cateter venoso central, e em tecidos do hospedeiro (BLUMBERG; REBOLI, 1996; TREVIÑO-RANGEL et al., 2017). Outro fator agravante descrito por Tumbarello et al. (2012) é que pacientes com candidemia causada por cepas formadoras de biofilme têm um pior prognóstico do que aqueles infectados com cepas não formadoras de biofilme. A associação entre a capacidade de *C. albicans* de formar biofilme com a presença de resistência aos antifúngicos torna seu tratamento difícil, com necessita de diferentes linhas de tratamento (BHATT et al., 2015).

A susceptibilidade aos antifúngicos difere entre as formas planctônica e sésseis das células de *C. albicans*. No entanto, pouco se sabe a resposta de cepas provenientes dos isolados clínicos de pacientes com candidemia de escape e não escape nas formas planctônicas e sésseis.

Assim, visando avanços nas terapias de infecções associadas a biofilmes, este estudo avaliou a susceptibilidade de biofilmes formados por cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes com candidemia de escape, aos antifúngicos disponíveis no mercado para tratamento.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica do fluconazol, anidulafungina, anfotericina B e anfotericina B complexo lipídico (ABLCL) no biofilme formado por cepas de *Candida albicans*, isoladas de pacientes com infecção de corrente sanguínea que ocorreram na vigência de profilaxia ou tratamento com medicação antifúngica sistêmica (candidemia de escape).

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura e por meio da estimativa de biomassa por retenção de cristal violeta, a capacidade de adesão, crescimento e produção de biofilme em poliestireno, por cepas de *C. albicans* provenientes dos isolados clínicos de pacientes com candidemia de escape e não escape;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antifúngicos nas culturas planctônicas de cepas de *C. albicans* provenientes de isolados clínicos de pacientes com candidemia de escape e não escape;
- Determinar a susceptibilidade aos antifúngicos de cepas de *C. albicans* provenientes dos isolados clínicos de pacientes com candidemia de escape e não escape em modelo de biofilme *in vitro* pela concentração mínima de erradicação de biofilme, estimativa da atividade metabólica por redução de MTT, e estimativa de biomassa por retenção de cristal violeta;
- Comparar a susceptibilidade aos antifúngicos de cepas de *C. albicans* provenientes dos isolados clínicos de pacientes com candidemia de escape e não escape.

4 MÉTODOS

4.1 Grupo de estudo/seleção das amostras

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética sob número CAAE 40592915.2.000.0096.

Foram estudadas oito cepas de *C. albicans* provenientes de pacientes maiores de 18 anos, internados no Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, no período entre janeiro de 2011 a dezembro de 2017.

Foram incluídas no Grupo escape, quatro cepas de *C. albicans* isoladas de hemoculturas de pacientes que estavam recebendo terapia antifúngica sistêmica profilática ou terapêutica (candidemia de escape), identificadas pelos números 269, 307, 332 e 334. No Grupo não escape (grupo controle) foram incluídas quatro cepas de *C. albicans* isoladas de hemoculturas de pacientes que apresentaram candidemia, sem histórico de uso recente de antifúngicos sistêmicos (candidemia não escape), identificadas pelos números 300, 328, 347 e 358.

As cepas foram recuperadas de hemoculturas positivas pelo sistema BACTEC 9240 (Microbiologia Becton-Dickinson Systems, Nova Jersey, EUA) ou BacT / Alert (BioMerieux SA, Marcy L'Etoile, França), e armazenadas a -20 °C.

4.2 Identificação dos microrganismos por MALDI-TOF

As leveduras dos dois grupos foram ativadas em Caldo Sabouraud Dextrose (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e incubadas à 36 °C por 24 horas. Após esse período, foi realizado um repique em Ágar Sabouraud Dextrose (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e incubada à 36 °C por 24 horas. Para a extração, foi utilizado o protocolo fornecido pelo fabricante, onde 2 a 3 colônias isoladas foram dissolvidas em 300 µL de água ultrapura em um microtubo. Este foi agitado em vórtex por 15 segundos e acrescentado 900 µL de etanol 100%. O microtubo foi agitado em vórtex novamente por 15 segundos e centrifugado em 14000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi removido e 20 µL de ácido fórmico 70% e 20 µL de acetonitrila 100% foram acrescentados a amostra. O microtubo foi agitado em vórtex por 15 segundos e centrifugado em 14000 rpm por 2 minutos. Após o processo de extração, foi pipetado 1 µL do sobrenadante sob uma placa de leitura (Target Plate), e após secagem, adicionado 1 µL de matriz (HCCA) sob a amostra. A placa foi colocada na câmara de ionização do equipamento Microflex (Bruker Corporation, Massachusetts, EUA) e

realizado a leitura. Os critérios de identificação foram uma pontuação ≥ 2.000 , que indica identificação altamente confiável, uma pontuação entre 1.700 e 1.999, que indica uma identificação de baixa confiabilidade, e, uma pontuação <1.700 foi interpretada como não identificado.

4.3 Antifúngicos

Foram utilizados os seguintes antifúngicos: anfotericina B (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), anfotericina B complexo lipídico (ABCL, Teva, São Paulo, Brasil), fluconazol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e anidulafungina (Wyeth-Pfizer, Michigan, EUA). As soluções estoque da anfotericina B e do fluconazol foram preparadas de acordo com o *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) protocolo M27-S4 (2012), onde os antifúngicos foram diluídos em dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Para diluição da anidulafungina foi utilizado água de injeção, conforme a bula do fabricante. A ABLC é fornecida suspensa (5 mg/mL), razão molar de fármaco-lipídio de 1:1.

Foi realizada uma solução 10 vezes a concentração da diluição mais alta utilizada. Posteriormente, foi diluída 1:5 (para solução duas vezes concentrada) com meio RPMI-1640 contendo L-glutamina e sem bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), tamponado a pH 7,0 com ácido 3- (N- morfolino) propanossulfônico (MOPS, 0,165 M; Sigma-Aldrich, Missouri, EUA)

4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da CIM foi utilizado a Microdiluição em Caldo descrito no CLSI protocolo M27-A2 (2002).

Após recuperação das leveduras, as colônias isoladas de ambos os grupos foram diluídas em solução salina estéril 0,9% até turbidez equivalente ao tubo #0,5 da escala de McFarland, que corresponde a $1-5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). As suspensões tiveram sua turbidez acertadas em nefelômetro AT 100PB II Multiparâmetro (Alfakit Ltda, Florianópolis, Brasil). A suspensão foi diluída 1:50 e depois 1:20 com meio RPMI-1640, para se obter o inóculo duas vezes concentrado usado no teste (1 a 5×10^3 UFC/mL).

O teste de microdiluição foi realizado em placas de poliestireno estéreis de 96 poços com fundo em U (Greiner Bio-One, Estocolmo, Suécia). Aliquotas de 100 μ L dos antifúngicos duas vezes concentrados foram dispensadas nos poços juntamente

com 100 µL correspondente a suspensão de leveduras 2 vezes concentrado, obtendo assim, uma diluição 1:1, com o inoculo final de 0,5 a 2,5 x 10³ UFC/mL. As concentrações finais das drogas foram: 0,0313 a 16 mg/L para anfotericina B; 0,125 a 64 mg/L para fluconazol e 0,0313 a 16 mg/L para anidulafungina. A microdiluição foi realizada apenas utilizando o sal de anfotericina B.

O controle positivo de crescimento foi realizado com 100 µL de meio isento da droga e 100 µL da suspensão de leveduras. O controle negativo de crescimento foi realizado com 200 µL RPMI-1640. Além dos controles de crescimento e esterilidade, foram utilizadas as cepas *C. parapsilosis* ATCC® 22019™ e *C. krusei* ATCC® 6258™. As placas de microdiluição foram incubadas à 36 °C, e as leituras realizadas em 24 e 48 horas através da avaliação do crescimento ou ausência do crescimento. Os valores foram interpretados com base em pontos de corte estabelecido pelo documento CLSI M27-S4 (2012).

4.5 Cultivo da levedura para produção do biofilme

Para o cultivo da levedura e produção do biofilme, foram utilizados os métodos descritos por Rodrigues e Henriques (2017). As leveduras foram cultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose e incubadas durante 24 horas a 36 °C. Após o crescimento as colônias foram inoculadas em Caldo Sabouraud Dextrose e incubadas durante 24 horas a 36 °C sob agitação a 120 rpm. Decorrido o tempo da incubação, o caldo foi centrifugado durante 10 minutos em uma velocidade de 1500 rpm, com duas lavagens das células na sequência, utilizando Tampão Salino Fosfato (PBS) pH 7,5. O sedimento foi suspenso em meio RPMI-1640 até turbidez equivalente ao tubo #0,5 da escala de McFarland, utilizando o nefelômetro.

4.6 Produção do biofilme em microplaca de 96 poços

Para a produção do biofilme, 200 µL da suspensão de leveduras padronizada (10⁶ UFC/mL) preparadas em RPMI-1640, foram depositadas em microplacas de poliestireno de 96 poços estéril com fundo chato (Greiner Bio-One, Estocolmo, Suécia). A microplaca foi incubada por 24 horas à 36 °C sob agitação a 120 rpm. O controle de crescimento foi realizado com 200 µL da suspensão de leveduras. O controle de esterilidade foi realizado com 200 µL de RPMI-1640.

4.7 Teste de susceptibilidade a antifúngicos no biofilme

Após a formação do biofilme, o meio foi aspirado e foram adicionados 200 µL de meio RPMI-1640 com anfotericina B nas concentrações 0,5 a 16 mg/L, ABCL 0,25 a 64 mg/L, anidulafungina 0,25 a 32 mg/L ou fluconazol 0,125 a 32 mg/L. As microplacas foram incubadas a 36 °C durante 24 horas sob agitação a 120 rpm. O meio foi aspirado e os biofilmes foram lavados uma vez com 200 µL de PBS para remover as células não aderentes.

4.8 Determinação da Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme (MBEC)

Após o tratamento antimicrobiano e lavagem das células, foram adicionados 200 µL de tampão PBS aos poços e as microplacas foram sonicadas em banho ultrassônico (Sanders Medical, Minas Gerais, Brasil), na frequência de 40 Khz durante 5 minutos a 36 °C, a fim de desagregar as células da matriz. Foram realizadas diluições seriadas decimais em solução salina 0,9%, e semeadas em Ágar Sabouraud Dextrose. As placas foram incubadas durante 24 horas a 36 °C. O número de células foi determinado pela contagem de colônias e os resultados foram calculados como total de UFC por unidade de área ($\text{Log}_{10} \text{UFC} / \text{cm}^2$). A MBEC é a menor concentração em mg/L dos antimicrobianos capazes de reduzir o número de células do biofilme a 2 Log_{10} por cm^2 (RODRIGUES; HENRIQUES, 2017).

4.9 Estimativa da atividade metabólica pelo ensaio de redução do MTT

Neste ensaio os biofilmes foram incubados com 200 µL de MTT (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) na concentração de 1 mg/mL a 36 °C durante 2 horas. Após incubação, o MTT foi aspirado e os poços foram lavados três vezes com PBS. A formazana que se formou no interior das células foi dissolvida com 200µL de isopropanol e, após homogeneização com a pipeta, 100µL da solução foi transferida para uma nova microplaca. A medida da absorbância foi realizada utilizando o leitor de microplacas Versa-Max (Molecular Devices, Califórnia, EUA) ajustado o comprimento de onda 570nm (KHARIDIA; LIANG, 2011; TRABA; LIANG, 2011; ROSA et al.,2015). Os resultados foram apresentados como porcentagem de redução de atividade metabólica.

4.10 Estimativa de biomassa por retenção do cristal violeta

Os biofilmes foram fixados a microplaca com 200 µL de metanol durante 15 minutos. O metanol foi aspirado e os poços foram secos em temperatura ambiente. Foi adicionado 200 µL de cristal violeta 1% a cada poço e a microplaca foi incubada à 36°C durante 5 min. Então, os poços foram cuidadosamente lavados três vezes com água ultrapura estéril. Após, foram adicionados 200 µL de ácido acético 33% para dissolver a coloração, homogeneizando com a pipeta, e transferiu-se 100 µL da solução para uma nova microplaca. A absorbância da solução obtida foi medida utilizando o leitor de microplacas Versa-Max, a 570 nm. Os resultados foram apresentados como porcentagem de redução de biomassa.

4.11 Classificação do biofilme

A classificação do biofilme foi determinada a partir da densidade ótica (DO), seguindo os critérios de Christensen et al. (1985), a partir da técnica de estimativa de biomassa por retenção do cristal violeta, onde:

- DO_C (DO do controle negativo) \leq DO_B (DO do biofilme) = não produtor de biofilme;
- $DO_C < DO_B < 2x DO_C$ = fraco produtor de biofilme;
- $DO_C < DO_B < 4x DO_C$ = moderadamente produtor de biofilme;
- $DO_B > 4x DO_C$ = forte produtor de biofilme.

4.12 Análise do biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com o objetivo de analisar a estrutura e a aderência do biofilme *in vitro* da *C. albicans*, foi utilizado a MEV em discos de poliestireno (DP) com 16 mm de diâmetro por 2 mm de altura.

Para a produção do biofilme foi utilizada placa de seis poços (Nest Biotechnology, Wuxi, China). Os DP foram colocados em um poço submerso em 5 mL da suspensão das leveduras em meio RPMI-1640, na concentração de 10^6 UFC/mL. Após 90 minutos, os DP foram lavados uma vez para a remoção de células planctônicas, submergindo-os em PBS com o auxílio de uma pinça estéril. Após a lavagem, foram colocados em nova placa de poliestireno com um novo RPMI-1640, e incubados a 36 °C por 24 horas de forma estática. Decorrido as 24 horas, o meio de cultura foi substituído por 5 mL de RPMI-1640 e a placa foi incubada novamente nas mesmas condições por mais 24 horas. Após este processo, os DP foram novamente

lavados em PBS estéril uma vez, com o auxílio de uma pinça estéril para remover os possíveis resíduos e células planctônicas.

Para o preparo das soluções para fixação e desidratação da amostra, foi utilizado o processo descrito por Kuo (2014), com algumas modificações. Para o preparo da solução tampão, foi pesado 0,68 g de sacarose, 0,42 g de cocadilato e diluído em 19,4 mL de dH₂O estéril. Para o preparo do fixador primário, foi utilizado 9,4 mL da solução tampão e adicionado 0,6 mL de glutaraldeído 30%. Após preparo dos insumos, utilizando recipiente de vidro estéril, o DP foi submerso no fixador primário por 45 minutos. Depois foi transferido para um segundo recipiente contendo a solução tampão por 10 minutos. Então foi realizada uma desidratação em série crescente de etanol a 35%, 50%, 70% e 100% por 10 minutos cada. Após este processo, o DP foi submerso em hexametildisilano (HMDS) 100% por 10 minutos. Os DP foram transferidos para uma nova placa de seis poços estéril e acondicionadas em um dessecador com sílica ativa até o momento da metalização.

As amostras foram montadas em suportes metálicos, recobertas com ouro coloidal pelo sistema automatizado Q150R ES (Quorum Technologies, Lewes, Reino Unido), e foram observadas no Microscópio Eletrônico de Varredura Tescan Vega 3 (Tescan Analytics, Fuveau, França). As imagens foram obtidas com ampliações de 1000.

4.13 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os dados qualitativos foram descritos como porcentagens e os dados quantitativos foram expressos em mediana e interquartil 10 e 90%. Para comparações dos resultados entre as amostras isoladas de pacientes com candidemia de escape e não escape, foi realizado a comparação de medianas por Mann-Whitney e foi considerado estatisticamente significativo quando houve uma diferença menor de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

A identificação do gênero e espécie das oito cepas deste estudo foi confirmada como *Candida albicans*, através da metodologia MALDI-TOF.

A capacidade de adesão, crescimento e produção de biofilme foi observada em todos os isolados dos dois grupos. A DO_B foi superior a 4x a DO_C , dessa forma, todos os isolados foram classificados como forte produtor de biofilme (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação de produção de biofilme de *Candida albicans* isolados de candidemia de escape e não escape através da estimativa por retenção de biomassa.

Grupo	Cepa	DO_C	DO_B	Classificação
Grupo Escape	269	0,158	1,770	Forte produtor de biofilme
	307	0,158	2,620	Forte produtor de biofilme
	332	0,163	2,777	Forte produtor de biofilme
	334	0,168	3,371	Forte produtor de biofilme
Grupo Não escape	300	0,135	0,626	Forte produtor de biofilme
	328	0,110	2,707	Forte produtor de biofilme
	347	0,108	1,306	Forte produtor de biofilme
	358	0,107	2,975	Forte produtor de biofilme

Legenda: DO_C : Densidade óptica do controle negativo; DO_B : Densidade óptica do biofilme produzido pelos isolados. Fonte: O autor (2020).

Além da classificação, a estrutura arquitetônica foi observada nas micrografias eletrônicas, confirmando que todas as cepas produziram biofilmes após 48 horas sobre DP (Figura 2). No aumento de 1000 vezes foi possível observar o biofilme aderido à superfície plana e lisa do DP com presença de blastoconídeos (setas brancas) e de hifas entrelaçadas (setas pretas) (Figura 2A). Nas bordas do DP foi observado o predomínio de hifas entrelaçadas (setas brancas) (Figura 2B).

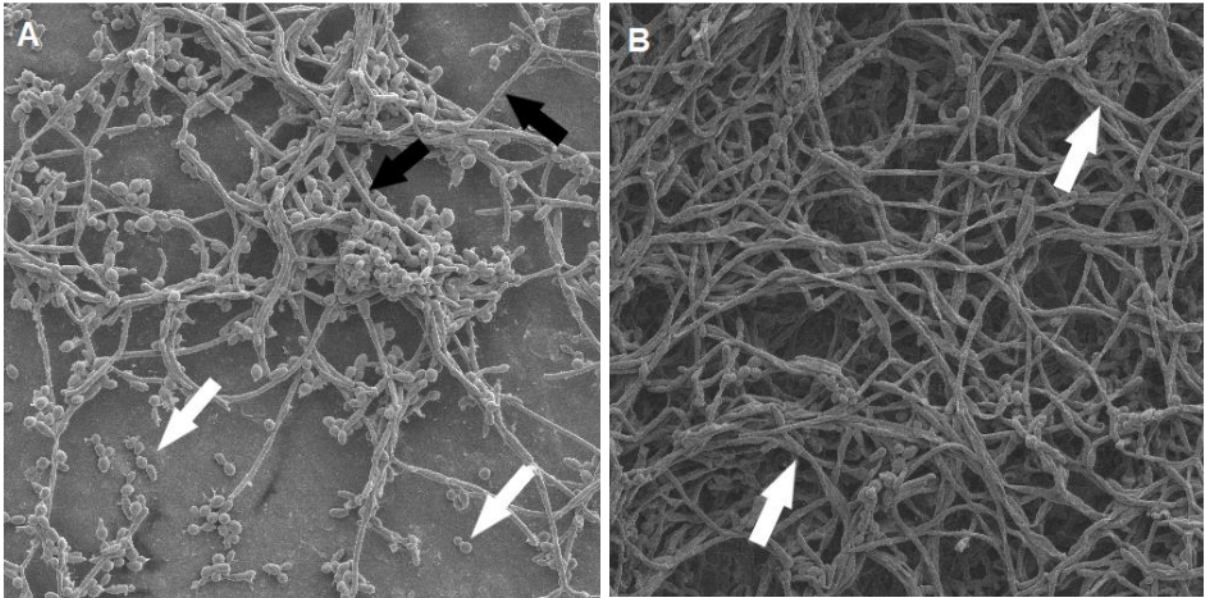


Figura 2. MEV do biofilme formado sobre DP por cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes com candidemia de escape. Aumento 1000 \times - barra: 50 μ m. Fonte: O autor (2020).

Foi determinado a susceptibilidade aos antifúngicos nas células planctônicas. Para anfotericina B as cepas obtiveram a CIM de 0,25 a 1 mg/L; para fluconazol as CIM foram mais variadas, de 0,125 a 2 mg/L; e para anidulafungina todas as CIM foram $\leq 0,03$ mg/L (Tabela 1). Todas as cepas foram classificadas como sensíveis aos antifúngicos testados.

Tabela 2: CIM dos antifúngicos, para células planctônicas de *Candida albicans* isoladas de candidemia de escape e não escape.

Grupo	Cepa	Anfotericina B CIM (mg/L)	Fluconazol CIM (mg/L)	Anidulafungina CIM (mg/L)
Grupo Escape	269	0,25	0,25	$\leq 0,03$
	307	0,25	2	$\leq 0,03$
	332	0,25	0,125	$\leq 0,03$
	334	0,25	0,25	$\leq 0,03$
Grupo Não escape	300	0,5	0,125	$\leq 0,03$
	328	0,5	0,25	$\leq 0,03$
	347	1	0,25	$\leq 0,03$
	358	0,5	0,125	$\leq 0,03$

Fonte: O autor (2020).

Após a produção do biofilme, a susceptibilidade aos antifúngicos foi analisada nas células sésseis. Utilizamos três técnicas complementares para determinar este

efeito, a MBEC, a estimativa da atividade metabólica por redução de MTT, e a estimativa de biomassa por retenção de cristal violeta.

O fluconazol e a anidulafungina não foram capazes de erradicar o biofilme ($p > 0,05$), mantendo-se constante as concentrações celulares, independente da concentração dos antifúngicos e do grupo. A ABCL também não erradicou, mas houve queda da concentração celular em $1 \log_{10}$ para o grupo escape ($p = 0,09$), mas não para o grupo não escape. Quando utilizado a anfotericina B houve erradicação (redução de $2 \log_{10}$) das células do biofilme em 16 mg/L do antifúngico ($p < 0,05$ para o grupo escape e não escape).

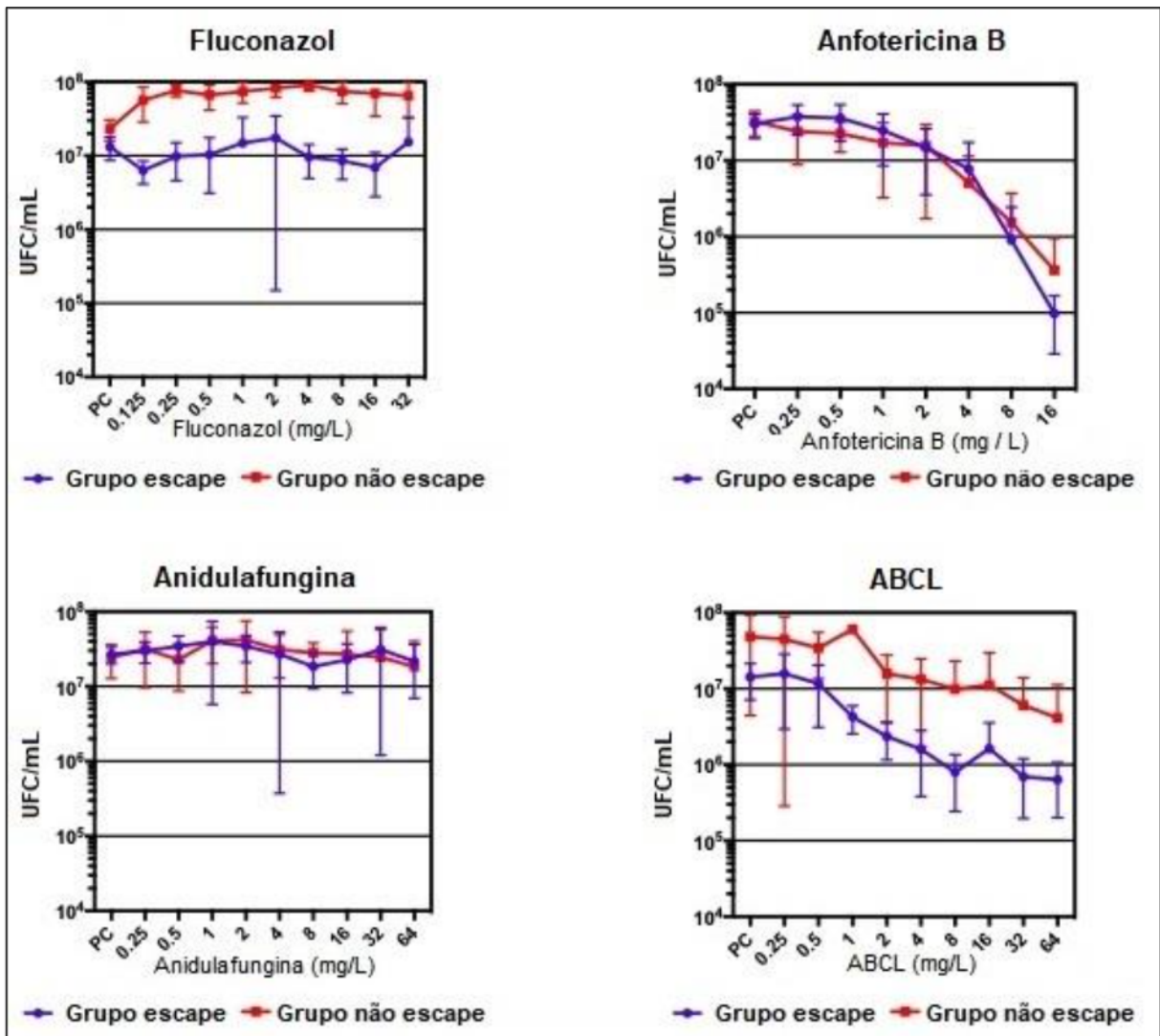


Figura 4. MBEC do fluconazol, anidulafungina, anfotericina B e ABCL (mg/L) para *C. albicans* isoladas de candidemia de escape e não escape. PC: controle positivo. Fonte: O autor (2020).

O fluconazol não obteve redução da atividade metabólica nas células ($p > 0,05$). Com a anidulafungina também não houve redução significativa ($p > 0,05$) para ambos

os grupos, mesmo com a redução nas concentrações de 1, 2, 4 e 8 mg/L no grupo não escape, obtendo efeito paradoxal nas concentrações ≥ 16 mg/L. Somente a anfotericina B e ABCL apresentaram atividade antifúngica no biofilme. A anfotericina B reduziu a atividade metabólica em aproximadamente 50% em 0,5 mg/L do fármaco, e 75% em 16 mg/L ($p < 0,05$). A ABCL obteve a maior redução da atividade metabólica, com aproximadamente 50% em 0,25 mg/L, logo a menor dose testada, e com $p < 0,05$ em 0,5 a 64 mg/L do fármaco (Figura 5).

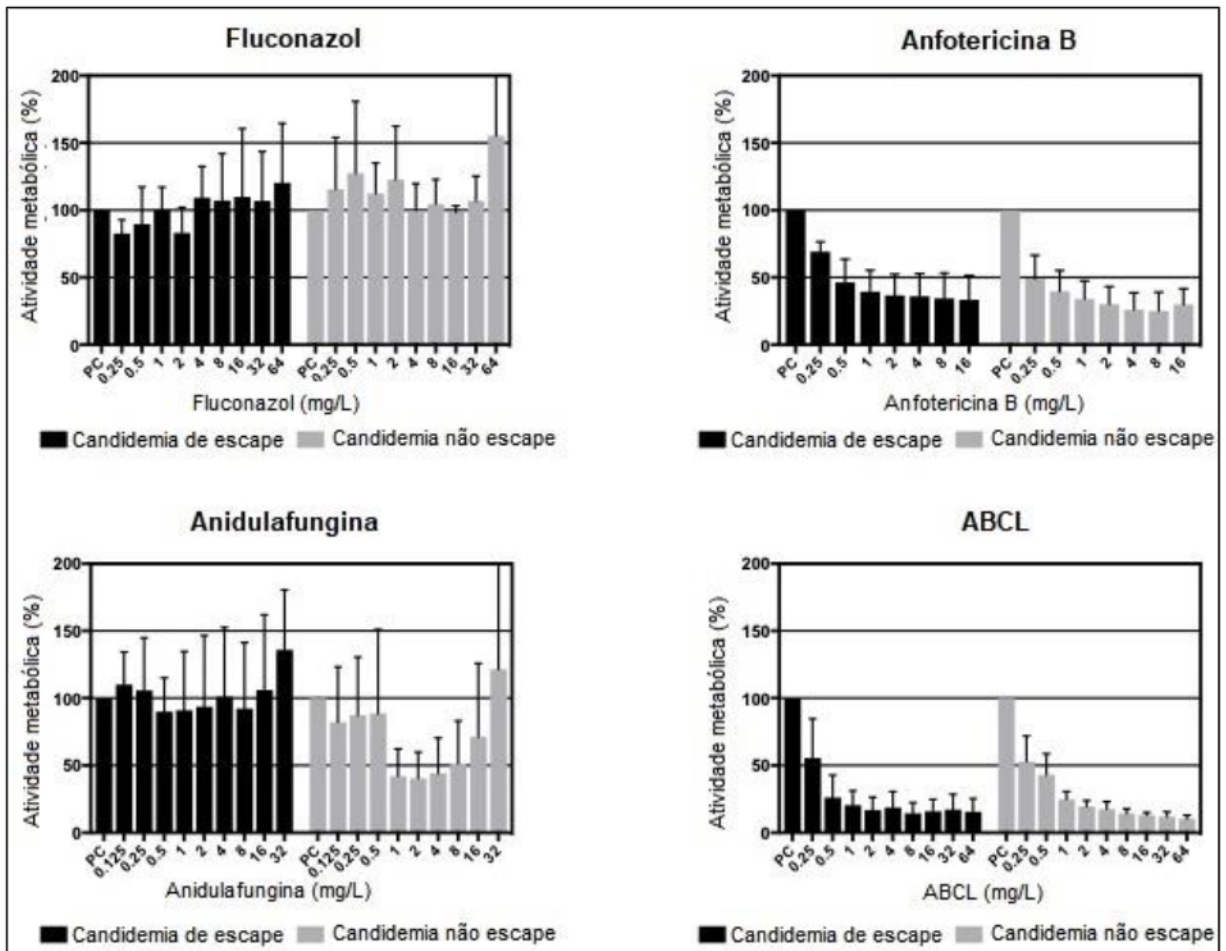


Figura 5. Estimativa da atividade metabólica (%) pelo ensaio de redução do MTT, utilizando fluconazol, anidulafungina, anfotericina B e ABCL (mg/L) para *C. albicans* isoladas de candidemia de escape e não escape. PC: controle positivo. Fonte: O autor (2020).

A última metodologia utilizada foi a estimativa de biomassa por retenção de cristal violeta. Em nosso estudo, quando testado fluconazol e anidulafungina não houve a redução de biomassa de forma significativa ($p > 0,05$); contrariamente, a biomassa foi maior em concentrações mais altas dos antifúngicos, quando comparado com o controle positivo/sem o fármaco. A anfotericina B mostrou melhor atividade

antifúngica sob o biofilme, reduzindo 52% da biomassa na concentração de 0,5 mg/L do antifúngico nas cepas de candidemia de escape e com $p < 0,05$ nas concentrações 4 mg/L e 16 mg/L do antifúngico. Para os isolados de candidemia não escape houve uma redução 54% da biomassa na concentração 4 mg/L, com $p < 0,05$ para as concentrações 8 mg/L e 16 mg/L, respectivamente. Utilizando a ABCL, houve redução de 50% observada em 2 mg/L no grupo escape. Em comparação ao grupo não escape, a redução máxima de aproximadamente 25% foi observada na concentração de 32 e 64 mg/L do antifúngico (Figura 6).

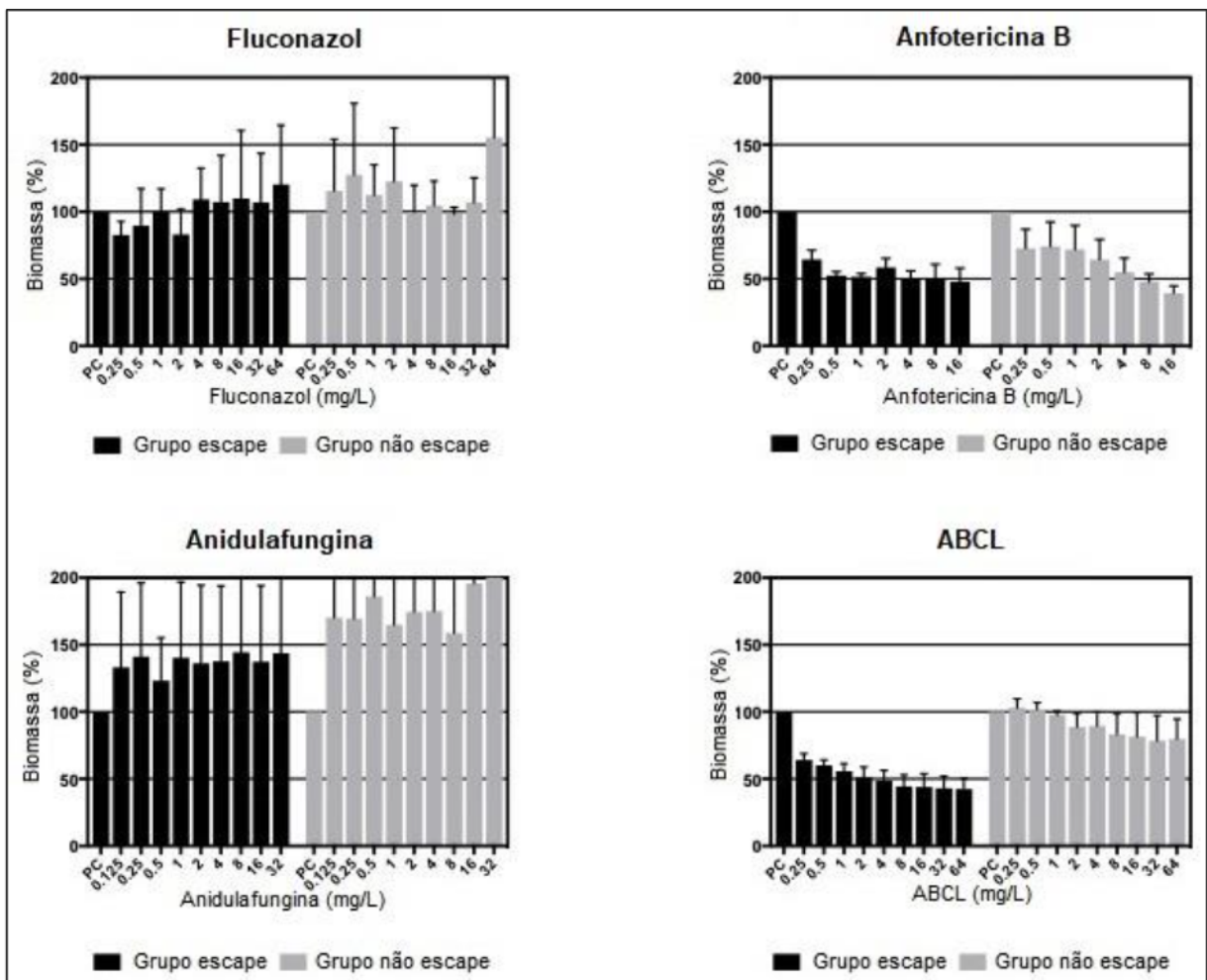


Figura 6. Estimativa de redução de biomassa (%) por retenção de cristal violeta, utilizando fluconazol, anidulafungina, anfotericina B e ABCL (mg/L) para *C. albicans* isoladas de candidemia de escape e não escape. PC: controle positivo. Fonte: O autor (2020).

Em relação as diferenças entre os grupos escape e não escape, ambos biofilmes foram resistentes ao fluconazol e anidulafungina, não havendo erradicação

das células, redução do metabolismo celular e de biomassa. No entanto, os biofilmes apresentaram maior sensibilidade a anfotericina B e ABCL.

Em uma análise dos grupos, avaliando separadamente as técnicas e antifúngicos, independentemente da concentração do antifúngico testado, não houve diferença estatística entre as *C. albicans* isoladas de candidemia de escape e não escape nos testes: MBEC utilizando anfotericina B ($p = 0,312$), ABCL ($p = 0,112$) e anidulafungina ($p = 0,911$); redução de MTT utilizando anfotericina B ($p = 0,203$), ABCL ($p = 0,103$) e fluconazol ($p = 0,197$); e estimativa de biomassa quando utilizado anfotericina B ($p = 0,459$), ABLC ($p = 0,245$) e fluconazol ($p = 0,197$). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na técnica MBEC utilizando o fluconazol ($p = <0,001$); MTT e biomassa quando testado anidulafungina ($p = 0,004$ e $p = 0,001$ respectivamente).

6 DISCUSSÃO

Infecções de corrente sanguínea por *Candida* spp. são uma tendência crescente, e, estão associadas a outras comorbidades e aos cuidados a saúde em muitos hospitais (DIEKEMA et al., 2012). A maioria dos casos de candidemia de escape ocorre em pacientes gravemente imunossuprimidos, independentemente de serem tratados com antifúngicos de amplo espectro (ARENDRUP et al., 2011; CUERVO et al., 2016). A inserção do cateter é um fator de risco para o desenvolvimento dessas infecções, visto que a manipulação desses dispositivos contribui para contaminação e desenvolvimento de biofilme pelas leveduras do gênero *Candida* spp. (KIM et al., 2018; KRALOVICOVA et al., 1996). Visto a importância de estudar as doenças causadas por microrganismos produtores de biofilme, nosso grupo analisou cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes com candidemia de escape e não escape (grupo controle) em relação a capacidade de formar biofilme e a resistência aos antifúngicos.

No presente estudo, induzimos a produção de biofilme em discos e em placas de poliestireno. As técnicas demonstraram que as cepas estudadas apresentaram capacidade de aderir e formar biofilme denso e com grande quantidade de células e hifas entrelaçadas. Nossos resultados corroboram com os achados por Andes e colaboradores (2004), que descreveram o biofilme produzido por *C. albicans* como heterogêneo, devido a composição de leveduras e hifas. Estas estruturas formadas por *C. albicans* são difíceis de erradicar (DESAI et al., 2014) e apresentam maior estabilidade e resistência contra a maioria dos antifúngicos (FANNING & MITCHELL, 2012). Além disso, candidemia por cepas produtoras de biofilme está associado ao aumento da mortalidade dos pacientes (RODRIGUES et al, 2019).

Analisamos a susceptibilidade aos antifúngicos na forma planctônica e séssil das células. Todos os isolados na forma planctônica foram sensíveis ao antifúngicos, porém a susceptibilidade dessas na forma séssil foi diferente. Para anfotericina B as células planctônicas obtiveram CIM máximo de 1 mg/L, enquanto na forma séssil foi necessário 16 mg/L para a erradicação do biofilme de ambos os grupos. Para anidulafungina e fluconazol, mesmo sensíveis na forma planctônica, nenhuma concentração testada for capaz de obter um efeito antifúngico nos biofilmes. Outros estudos demonstraram alta prevalência de resistência antifúngica em biofilme formado por *C. albicans* (JABRA-RIZK et al., 2004; VIJAYALAKSHMI et al., 2016; SHIEF et al.,

2019). Essa resistência pode ser atribuída a diversos mecanismos, como penetração ineficaz do fármaco através da matriz extracelular do biofilme, diminuição da taxa de crescimento de *C. albicans*, persistência de células dentro do biofilme, e expressão de genes de resistência induzida pela comunidade.

Os azóis tem demonstrado pior atividade contra biofilmes de *Candida* spp. (SHUNFORD et al., 2007; MELO et al., 2011; UPPULURI et al., 2011; NWEZE et al., 2012). Choi e colaboradores (2007) estimaram a redução do metabolismo celular, e relataram que os biofilmes eram resistentes ao fluconazol em concentrações superiores a 1.024 mg/L. Chi e colaboradores (2019), assim como no nosso estudo, relataram que os isolados eram sensíveis ao fluconazol na forma planctônica e resistente na forma séssil. A resistência, dependente do tempo, foi associada a expressão de genes relacionados a bombas de efluxo, após indução do fármaco (CHI et al, 2019).

Das três classes de antifúngicos para tratamento de candidemias, apenas os polienos e as equinocandinas tem demonstrado atividade consistente contra biofilmes de *C. albicans* (KUHN et al., 2002). No entanto, não encontramos trabalhos que relatam a ação destes antifúngicos em isolados clínicos de pacientes com candidemia de escape.

No nosso estudo, a anidulafungina também não obteve ação antifúngica nos biofilmes analisados, o que foi inesperado. Outros estudos relatam que as equinocandinas possuem ação sob biofilmes *in vitro* e *in vivo* de *C. albicans*, reduzindo o número de células, em doses superiores da encontrada no CIM de células planctônicas (KUCCHARÍKOVÁ et al., 2013; ROSATO et al., 2013). Paralelamente, Rosato e colaboradores (2013) descreveram que a anidulafungia estabelece efeito paradoxal no crescimento de *C. albicans*. O estudo relata a redução do crescimento microbiano em concentrações baixas do antifúngico e ressurgimento do crescimento em concentrações da droga acima da CIM. Resultado semelhantemente encontrado em nosso trabalho, onde as cepas do grupo de candidemia não escape reduziram a atividade celular, porém, em concentrações maiores do antifúngico houve também o aumento de metabolismo.

Em comparação, a anfotericina B associada ou não ao complexo lipídico, obteve maior atividade antifúngica no biofilme. Para redução do metabolismo celular em 50% foi necessário 0,5 mg/L de anfotericina B e 0,25 mg/L de ABCL. Além disso, a redução de biomassa em 50% também foi alcançada 0,5 mg/L e 2 mg/L para

anfotericina B e ABCL, respectivamente, para o grupo escape. Diferentes trabalhos reportam que a redução de 50% do metabolismo celular e de biomassa, é utilizada para determinar um efeito antifúngico importante no biofilme (RODRIGUES & HENRIQUES, 2017; KUHN et al., 2002). Porém a erradicação do biofilme só foi alcançada utilizando 16 mg/L de anfotericina B (não associada ao complexo lipídico).

A anfotericina B já foi considerada “padrão ouro” entre os antifúngicos devido ao espectro antifúngico mais amplo. Porém, devido a toxicidade, as formulações lipídicas foram desenvolvidas na tentativa de reduzir a toxicidade (HAMILL, 2013). Kuhn e colaboradores (2002) determinaram que a exposição da célula planctônica a concentrações subinibitórias de ABCL, inibiu a formação de biofilme subsequente. O autor também relata que, dado o grande tamanho da molécula da ABCL, é surpreendente que eles penetrem na matriz extracelular para atingir as células fúngicas dentro do biofilme, embora sua dispersão em fosfolípidios possa de fato facilitar a passagem através do polissacarídeo. Porém, tratando-se de infecções da corrente sanguínea, a estrutura complexada a lipídios permite maior depuração e distribuição nos tecidos, diminuindo rapidamente seu nível sérico (HAMILL, 2013).

Embora a anfotericina B tenha erradicado o biofilme em 16 mg / L, os picos médios de concentração plasmática da anfotericina desoxicolato (fármaco de uso clínico, não associada a lipídios), variam de 0,5 a 2 mg / L em adultos, recebendo doses repetidas de aproximadamente 0,5 mg / kg / dia. Essas concentrações teriam um efeito de redução de metabolismo celular e biomassa, porém o biofilme não seria erradicado.

A literatura é robusta em relação aos fatores de risco associados ao desenvolvimento da candidemia de escape, porém, pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual o microrganismo “escapa” dos tratamentos antifúngicos prévios. Este trabalho foi desenvolvido com o intuito de investigar a hipótese de que cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes com candidemia de escape diferem das cepas isoladas de pacientes com candidemia não escape na capacidade de produção de biofilme e na resposta aos antifúngicos. Assim, visando determinar fatores que influenciem na suscetibilidade das cepas aos antifúngicos, um maior número de amostras clínicas deverá ser analisado para relacionar as características microbiológicas de isolados de *C. albicans* à candidemia escape.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados observados ao longo do desenvolvimento da pesquisa, podemos inferir que:

- Cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes com candidemia de escape e não escape, apresentaram capacidade de formar biofilme em superfície de poliestireno;
- Todos os isolados clínicos apresentaram características de fortes produtores de biofilme;
- O perfil de sensibilidade aos antifúngicos foi diferente entre a forma planctônica (livre) e séssil (biofilme);
- As cepas na forma planctônica apresentaram sensibilidade a anfotericina B, anidulafungina e fluconazol;
- Os biofilmes formados pelos isolados de pacientes com candidemia de escape e não escape apresentaram susceptibilidade semelhante aos antifúngicos, pois todas as cepas foram resistentes ao fluconazol e anidulafungina e apresentaram maior sensibilidade a anfotericina B e ABCL;
- Fluconazol, anidulafungina e ABCL não foram eficazes na erradicação dos biofilmes formados *in vitro*, isto foi possível somente com a anfotericina B, porém em concentrações altas do antifúngico.
- Candidemias de escape associadas a *C. albicans* forte produtora de biofilme, apresenta difícil tratamento antifúngico *in vitro* com os antifúngicos testados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AUSTIN, J. W.; BERGERON, G. Development of Bacterial Biofilms in Dairy Processing Lines. **Journal of Dairy Research**, v. 62, n. 3, p. 509-519, 1995.

BADDLEY, J. W. Clinical risk factors for invasive aspergillosis. **Medical Mycology**. v. 49, n.1, p. 7-12, 2011.

BARBOSA, G. M. et al. Direct electric current modifies important cellular aspects and ultrastructure features of *Candida albicans* yeasts: Influence of doses and polarities. **Bioelectromagnetics**, v. 38, n. 2, p. 95-108, 2017.

BITAR, D. et al. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010. **Emerg Infect Dis**. v. 7, p.1149-1155, 2014.

BHATT, M. et al. Biofilm as a virulence marker in *Candida* species in Nosocomial blood stream infection and its correlation with antifungal resistance. **Indian J Med Microbiol**, v.33, p.112-114, 2015.

BLUMBERG, E. A.; REBOLI, A. C. Failure of systemic empirical treatment with amphotericin B to prevent candidemia in neutropenic patients with cancer. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, n. 3, p. 462-466, 1996.

BOTERO, M. C.; PUENTES-HERRERA, M.; CORTÉS, J. A. Lipid formulations of amphotericin. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 31, n. 5, p. 518-527, 2014.

BRAGA, P. R. et al. Secular trends of candidemia at a Brazilian tertiary care teaching hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 273-277, 2018.

BRAND, A. Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2012/517529/>. DOI: 10.1155 / 2012/517529. Acesso em: 8 jul.2020.

BREDA, G. L. et al. Breakthrough candidemia after the introduction of broad spectrum antifungal agents: A 5-year retrospective study. **Medical Mycology**, v. 56, n. 4, p. 406-415, 2017.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86-96, 2017.

CASSONE, A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: Pathogenesis, immunity and vaccine prospects. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 122, n. 6, p. 785-794, 2015.

CHEVALIER, M.; RANQUE, S.; PRÊCHEUR, I. Oral fungal-bacterial biofilm models in vitro: A review. **Medical Mycology**, v. 56, n. 6, p. 653-667, 2018.

CHOI, H. W. et al. Species-specific differences in the susceptibilities of biofilms formed by *Candida* bloodstream isolates to echinocandin antifungals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1520-1523, 2007.

CHRISTENSEN, G. D. et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996-1006, 1985.

CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute M27-S4. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**, Michigan, 2012.

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.

CONCIA, E.; AZZINI, A. M.; CONTI, M. Epidemiology, incidence and risk factors for invasive candidiasis in high-risk patients. **Drugs**, v. 69, p. 5-14, 2009.

CORNELY, O. A. Aspergillus to zygomycetes: Causes, risk factors, prevention, and treatment of invasive fungal infections. **Infection**, v. 36, p. 296-313, 2008.

COSTA, A. C. B. P. et al. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of Candida biofilms formed in vitro. **Mycoses**, v. 56, n. 6, p. 614-622, 2013.

COSTERTON, J. W. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 50-52, 2001.

CUERVO, G. et al. Breakthrough candidaemia in the era of broad-spectrum antifungal therapies. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, p. 2, p. 181-188, 2016.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 114-122, 2003.

DE PAUW, B. E.; PICAZO, J. J. Present situation in the treatment of invasive fungal infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.32, n. 2, p. 167-171, 2008.

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

DIEKEMA, D. et al. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 1, p. 45-48, 2012.

DORGAN, E.; DENNING, D. W.; MCMULLAN, R. Burden of fungal disease in Ireland. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 423-426, 2015.

ENOCH, D. A.; LUDLAM, H. A.; BROWN, N. M. Invasive fungal infections: A review of epidemiology and management options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 7, p. 809-818, 2006.

FALCI, D. G.; PASQUALOTTO, A.; COMARU, A. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clin. Biomed. Res**, v. 35, n.2, p.65-82, 2015.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **Plos Pathog**. v.8, n.4, 2012.

FERNANDES, T.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. Effect of Voriconazole on *Candida tropicalis* Biofilms: Relation with ERG Genes Expression. **Mycopathologia**, v. 181, p. 643-651, 2016.

FONSECA, E. et al. Effects of fluconazole on *Candida glabrata* biofilms and its relationship with ABC transporter gene expression. **Biofouling**, v. 30, n. 4, p. 447-457, 2014.

GAMALETSOU, M. N. et al. Breakthrough candidaemia caused by phenotypically susceptible *Candida* spp. in patients with haematological malignancies does not correlate with established interpretive breakpoints. **International journal of antimicrobial agents**, v. 44, n. 3, p. 248-255, 2014.

GIACOMAZZI, J. et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145-150, 2016.

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

GUPTA, V. K. et al. **Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments**, Oxford: Garsington Road, 2015.

HAEGLER, P. et al. Hepatocellular toxicity of imidazole and triazole antimycotic agents. **Toxicological Sciences**, v. 157, n. 1, p. 183-195, 2017.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 95-108, 2004.

HAMAL, P.; KAPPE, R.; RIMEK, D. Rate of transmission and endogenous origin of *Candida albicans* and *Candida glabrata* on adult intensive care units studied by pulsed field gel electrophoresis. **Journal of Hospital Infection**, v. 49, n. 1, p. 37-42, 2001.

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

HARDING, M. W. et al. Can filamentous fungi form biofilms?. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 475-480, 2009.

HOBSON, R. P. The global epidemiology of invasive *Candida* infections - Is the tide turning?. **Journal of Hospital Infection**, v. 55, n. 3, p. 159-168, 2003.

HUANG, H. et al. Towards the biofilm characterization and regulation in biological wastewater treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 1115-1129, 2019.

JABRA-RIZK, M. A.; FALKLER, W. A.; MEILLER, T. F. Fungal biofilms and drug resistance. **Emerg Infect Dis**, v.10, n.1, p.14-19, 2004.

JOHN KUO. **Electron Microscopy. Methodos and Protcols**. 2. ed. New Jersey: Riverview Drive, 2007.

KIM, S. H., et al. Risk factors and clinical outcomes of breakthrough yeast bloodstream infections in patients with hematological malignancies in the era of newer antifungal agents. **Med Mycol**, v.56, n.2, p.197-206, 2018.

KHARIDIA, R.; LIANG, J. F. The activity of a small lytic peptide PTP-7 on *Staphylococcus aureus* biofilms. **Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 663-668, 2011.

KRALOVICOVA, K., et al. Fungemia in cancer patients undergoing chemotherapy versus surgery: risk factors, etiology and outcome. **Scand J Infect Dis**. v.29, n.3, p.301-4, 1997.

KUCHARÍKOVÁ, S. et al. Activities of systemically administered echinocandins against in Vivo mature *Candida albicans* biofilms developed in a rat subcutaneous model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2365-2368, 2013.

KUHN, D. M., et al. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, p. 1773–1780, 2002.

LAI, M. Y. et al. Breakthrough candidemia in children: Clinical and microbiological characteristics, therapeutic strategies and impact on outcomes. **Future Microbiology**, v. 12, p. 695-705, 2017.

LEROY, O., et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). **Crit. Care Med**. v.37, p.1612–1618, 2009.

LEWIS, R. E. Overview of the changing epidemiology of candidemia. **Current Medical Research and Opinion**, v. 25, n. 7, p. 732-740, 2009

LOW, C. Y.; ROTSTEIN, C. Emerging fungal infections in immunocompromised patients. **Medicine Reports**, v. 3, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3155160/>. DOI: 10.3410/M3-14. Acesso em: 8 jul. 2020.

MARTIN, G. S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 16, p. 1546-1554, 2003.

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 103-24, 2016.

MELO, A. S.; COLOMBO, A. L.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3081-3088, 2007.

MELO, A. S., et al. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Medical Mycol.* v.49, n.3, p253-262, 2011.

MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Front Microbiol**, v.3, n.286, p.1-10, 2012.

MITCHELL, K. F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D. R. Fungal Super Glue: The Biofilm Matrix and Its Composition, Assembly, and Functions. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 9, 2016.

MONTAGNA, M. T. et al. In vitro activities of amphotericin B deoxycholate and liposomal amphotericin B against 604 clinical yeast isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, p. 1638-1643, 2014.

MORIO, F. et al. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, n. 4, p. 373-384, 2010.

MORSCHHÄUSER, J. The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* – an example of microevolution of a fungal pathogen. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 192-201, 2016.

MORTENSEN, K. L.; DENNING, D. W.; ARENDRUP, M. C. The burden of fungal disease in Denmark. **Mycoses**, v. 58, n. 5, p. 15-21, 2015.

MOTTA, F. A. et al. Risk factors for candidemia mortality in hospitalized children. **Jornal de Pediatria**, v. 93, n. 2, p. 165-171, 2017.

MUKHERJEE, P. K. et al. Amphotericin B lipid complex is efficacious in the treatment of *Candida albicans* biofilms using a model of catheter-associated Candida biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 2, p. 149-153, 2009.

MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J. Candida Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 4, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4566167/pdf/nihms-713268.pdf>. DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015. Acesso em: 8 jul. 2020.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – Segunda M27-A2, Pennsylvania, 2002.

NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, p. 71–92, 2015.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **PLoS ONE**, v.8, n.3, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3601956/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0059373. Acesso em: 8 jul. 2020.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. Risk factors for breakthrough candidemia. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 209-211, 2002.

NWEZE, E. I., et al. Development of a 96-well catheter-based microdilution method to test antifungal susceptibility of *Candida* biofilms. **Journal Antimicrob Chemother**, v.16, n.1, p.149-153, 2012.

OPLUSTIL, C. P. et al. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 3. ed. São Paulo, Brasil Sarvier, 2004.

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. 1-50, 2015.

PERFECT, J. R. Fungal diagnosis: How do we do it and can we do better?. **Current Medical Research and Opinion**, v. 29, n. 4, p. 3-11, 2013.

PERLIN, D. S. Echinocandin Resistance in Candida. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 6, p. 612–617, 2015.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1-53, 2010.

PRASAD, R.; KAPOOR, K. Multidrug resistance in yeast Candida. **International review of cytology**, v. 242, p. 215-248, 2005.

RODRIGUES, L. S. et al. Invasive candidiasis: Risk factor for mortality in a pediatric tertiary care hospital in south of Brazil. **Medicine**, v.98, n. 23, 2019.

RODRIGUES, C. F. et al. *Candida glabrata's* recurrent infections: biofilm formation during Amphotericin B treatment. **Letters in Applied Microbiology**, v. 63, n. 2. p. 77-81, 2016.

RODRIGUES, C.; HENRIQUES, M. Liposomal and Deoxycholate Amphotericin B Formulations: Effectiveness against Biofilm Infections of *Candida* spp. **Pathogens**, v. 6, n. 4, 2017.

ROSATO, A. et al. In vitro effectiveness of anidulafungin against *Candida* sp. biofilms. **Journal of Antibiotics**, v. 66, n. 12, p. 701-704, 2013.

SANGLARD, D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. **Frontiers in Medicine**, v. 15, n. 3, 2016.

SCHALLER, M. et al. Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, n. 4, p. 712-717, 2000.

SCHILD, L. et al. Proteolytic cleavage of covalently linked cell wall proteins by *Candida albicans* Sap9 and Sap10. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 1, p. 98-109, 2011.

SHUKLA, P. K. et al. Past, present, and future of antifungal drug development. **Communicable Diseases of the Developing World**, v. 29, p. 125-167, 2016.

SILVA, R. F. E. Infecções fúngicas em imunocomprometidos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 36, n. 1, p. 142-147, 2010.

SILVA, S. et al. *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. **Journal of Fungi**, V. 133, 2018.

SILVA, T. S. O. et al. Oral Biofilm Formation on Different Materials for Dental Implants. **Journal of Visualized Experiments**, v. 136, 2018. Disponível em: <https://www.jove.com/t/57756/oral-biofilm-formation-on-different-materials-for-dental-implants>. DOI: 10.3791/57756. Acesso em: 8 jul. 2020.

STANISZEWSKA, M. et al. Virulence factors of *Candida albicans*. **Przegląd epidemiologiczny**, v. 66, n. 4, p. 629-633, 2012.

STEPANOVIĆ, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

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

TRABA, C.; LIANG, J. F. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms to reactive discharge gases. **Biofouling**, v. 27, n. 7, p. 763-772, 2011.

TREVIÑO-RANGEL, R. DE J. et al. Association between *Candida* biofilm-forming bloodstream isolates and the clinical evolution in patients with candidemia: An observational nine-year single center study in Mexico. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 35, n. 1, p. 11-16, 2017.

TUMBARELLO M, et al. Risk Factors and Outcomes of Candidemia Caused by Biofilm-Forming Isolates in a Tertiary Care Hospital. **PLoS ONE**, v. 7, n.3, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3316499/>. Acesso em: 27 set. 2020.

UPPULURI, P. et al. Effects of fluconazole, amphotericin B, and caspofungin on *Candida albicans* biofilms under conditions of flow and on biofilm dispersion. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, n.7, p.591-593, 2011.

VIJAVAKSHMI, P.; THENMOZHI, S.; RAJSWARI, P. The Evaluation of the virulence factors of clinical *Candida* isolates and the anti-biofilm activity of *Elettaria cardamomum* against multi-drug resistant *Candida albicans*. **Curr Med Mycol**, v.2, n.2, p.8-15, 2016.

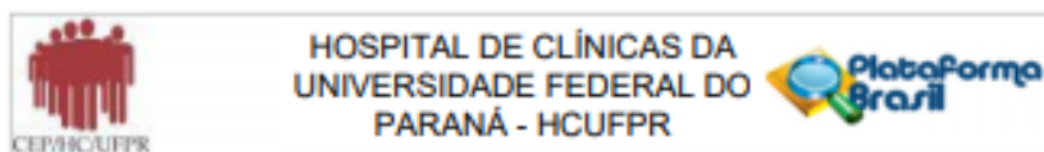
WÄCHTLER, B. et al. From attachment to damage: Defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0017046>. DOI: 10.1371/journal.pone.0017046. Acesso em: 8 jul. 2020.

WILLIAMS, D. L.; COSTERTON, J. W. Using biofilms as initial inocula in animal models of biofilm-related infections. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 100, n. 4, p. 1163-1169, 2012.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 13, n. 10, p. 95-105, 2014.

ZILBERBERG, M. D.; SHORR, A. F.; KOLLEF, M. H. Secular Trends in Candidemia-Related Hospitalization in the United States, 2000–2005. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 10, p. 978-80, 2008.

ANEXOS


PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Fatores de risco para ocorrência de candidemia de escape

Pesquisador: FELIPE FRANCISCO BONDAN TUON

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 40592915.2.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.033.008

Data da Relatoria: 23/03/2015

Apresentação do Projeto:

Estudo retrospectivo que pretende identificar, em pacientes com hemocultura positiva para candidíase, casos de candidíase de escape. Dados clínicos como idade, gênero e doença de base serão avaliados, assim como a presença de possíveis fatores de risco identificados em estudos prévios para a ocorrência de candidemia e candidemia de escape: presença e duração de neutropenia, presença e gravidade da mucosite, presença e tipo de cateter venoso, indicação do uso de antifúngico e dose, uso de antibiótico de amplo espectro, uso e dose de corticoide, tratamento quimioterápico, nutrição parenteral total, insuficiência renal, pancreatite, cirurgia abdominal, e espécie de *Candida* isolada.

Objetivo da Pesquisa:

Determinar o perfil epidemiológico de infecções de corrente sanguínea por *Candida* spp. e fatores de risco para ocorrência de candidemia de escape em pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR).

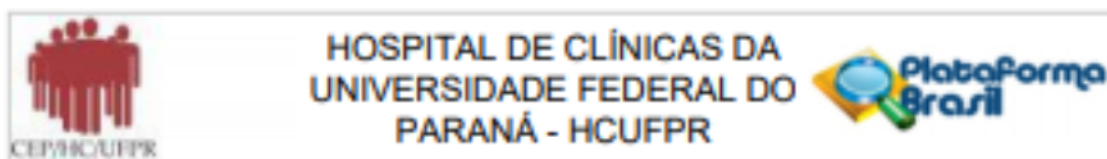
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos, respeitados o termo de confidencialidade são mínimos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa retrospectiva que, dentro do que se propõe, não apresenta falha de desenho.

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
 Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.033.008

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

folha de rosto foi apresentada com a devida chancela. Os termos de confidencialidade, uso específico do material coletado e compromisso de publicação dos resultados estão presentes. A aquiescência do serviço envolvido vem assinado pela Sra. Marisol Dominguez Muro, gerente da UAD -HC - UFPR. Por se tratar de estudo retrospectivo o pesquisador pede a dispensa do TCLE. Também há o Termo de Responsabilidade devidamente firmado pelos componentes da equipe, e o link para o currículo Lattes está presente para todas as pesquisadoras.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto e documentações apresentados de forma adequada.

Projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

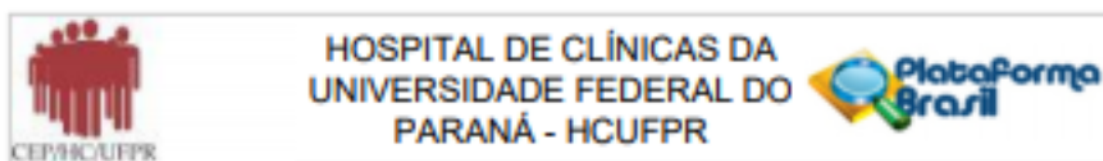
Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta -se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivado.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
 Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Processo: 1.033.008

CURITIBA, 23 de Abril de 2015

Assinado por:
Renato Tambara Filho
(Coordenador)

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** csp@hc.ufpr.br