

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE
FARMÁCIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Novas Alternativas de Combate a Biofilme de *Candida* em Dispositivos
Endovenosos de Hemodiálise

LETÍCIA FERNANDES DA ROCHA

PORTO ALEGRE, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE
FARMÁCIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Novas Alternativas de Combate a Biofilme de *Candida* em Dispositivos de
Hemodiálise

Dissertação apresentada por Letícia Fernandes
da Rocha para obtenção do grau de mestre em
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Coorientadora: Dra. Bruna Pippi

PORTO ALEGRE, 2021

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 25.02.2021, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Patrícia Valente

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Tiana Tasca

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Ana Paula Guedes Frazzon

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Fernandes da Rocha, Leticia
Novas Alternativas de Combate a Biofilme de Candida
em Dispositivos de Hemodiálise / Leticia Fernandes da
Rocha. -- 2021.
89 f.
Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Coorientadora: Bruna Pippi.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2021.

1. Hemodiálise. 2. Biofilme . 3. Candida. 4.
Prótese. 5. Cateter. I. Meneghello Fuentefria,
Alexandre, orient. II. Pippi, Bruna, coorient. III.
Titulo.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos à CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e ao Laboratório de Micologia Aplicada - UFRGS, que disponibilizou equipamentos e material necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Professor Alexandre, quem me deu a oportunidade de sentir o “gosto” da pesquisa ao apostar em mim quando gentilmente me deu condições de realizar o meu trabalho de conclusão de curso, mesmo não sendo meu orientador na época. Agradeço por ter continuado a acreditar no meu potencial, quando a oportunidade de ingressar no mestrado acadêmico surgiu na minha vida. Suas palavras de incentivo, compreensão e conforto foram essenciais para o meu desenvolvimento como pesquisadora, mesmo quando me deparei com rumos e indecisões não esperadas. Serei sempre grata pela confiança que me depositaste.

Também gostaria de agradecer à Bruna, minha coorientadora tão amada. Meu muito obrigada por estar sempre disposta a me ajudar em tudo o que precisei, a me ensinar desde os testes básicos de susceptibilidade até as estatísticas na finalização da dissertação. Obrigada pelas suas correções sempre críticas, mas não menos amigáveis e construtivas. Tu és um exemplo de profissional, tanto como farmacêutica e pesquisadora, como professora! Além disso, és um ser humano incrível e muito generoso. Terei sempre muita gratidão e carinho por ti.

Não poderia deixar de agradecer às minhas colegas do laboratório. Àquelas que tornaram as manhãs mais leves, sempre com bom humor e trocas essenciais para um grupo de pesquisa harmonioso. Me sinto muito grata especialmente por ter conhecido melhor duas pessoas: Bárbara e Paula. Juntas formamos o “trio dinâmico”, com muito trabalho e risadas compartilhadas. Nunca vou esquecer da amorosidade, bondade e sensibilidade da Paula, que me recebeu e fez questão que eu me sentisse em casa no laboratório. Muito obrigada à Bárbara pela generosidade, animação e amizade. Sem vocês não teria chegado até aqui. Agradeço a todos os que de alguma forma fizeram parte do meu projeto, desde o essencial, com as moléculas da Angélica até os que me recebiam com alegria no Laboratório de Síntese, grupo esse que faz parte da família da Micologia Aplicada.

Agradeço também à minha guerreira de mestrado Carol. Nossa trajetória começou no dia da matrícula da graduação de Farmácia e, ao longo dos anos, vimos nossa amizade se fortalecer de forma muito bonita. Não bastou nos formarmos juntas, tínhamos que percorrer o caminho do mestrado de mãos dadas, ela com a química orgânica sintética e eu com a micologia. Tanta complementaridade não teria dado certo se tivéssemos combinado. Na verdade, acredito que foi a vida nos presenteando uma à outra.

Por fim, mas não menos especial, agradeço a minha mãe e ao meu irmão. Não poderia encontrar maior conforto se não nos braços de vocês. Sorte a minha ter um núcleo familiar tão forte e com tanto apoio, principalmente em um ano de reclusão, pessimismo e desmotivação. Sentimentos esses que vão contra a produtividade no cenário pandêmico em que nos encontramos. Mesmo assim, a animosidade de vocês me reergueu e me fez seguir em frente. Obrigada!

Novas Alternativas de Combate a Biofilme de *Candida* em Dispositivos de Hemodiálise

Autor(a): Letícia Fernandes da Rocha

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Coorientadora: Dra. Bruna Pippi

RESUMO

Introdução: Biofilme de *Candida* em dispositivos médicos é uma questão clínica preocupante e importante para pacientes em hemodiálise que necessitam do uso constante de fístula protética ou cateter. Este uso prolongado aumenta o risco de candidemia devido à formação de biofilme. PH151 e Clioquinol são derivados de 8-hidroxiquinolina que foram estudados por nosso grupo e mostraram interessante atividade anti-*Candida*. **Objetivo:** Este estudo avaliou a capacidade de formação de biofilme de espécies de *Candida* em politetrafluoroetileno (PTFE) e poliuretano (PUR), materiais comumente usados em dispositivos de hemodiálise, e investigou o efeito sinérgico entre esses compostos com fluconazol, anfotericina B e caspofungina contra células de biofilme removidas desses materiais. Além disso, a combinação sinérgica foi avaliada em relação à prevenção da formação de biofilme em discos de PTFE e PUR. **Metodologia:** Os testes de suscetibilidade de células planctônicas e de biofilme foram realizados por microdiluição em caldo. O método *checkerboard* e o ensaio de tempo de morte foram usados para avaliar a interação entre os antifúngicos. A atividade do antibiofilme em material PTFE e PUR foi avaliada para quantificar a prevenção da formação de biofilme. **Resultados:** *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* apresentaram capacidade de formar biofilme em ambos os materiais. No entanto, *C. parapsilosis* não demonstrou essa capacidade. Interações sinérgicas foram observadas quando PH151 foi combinado com fluconazol em 77,8% dos isolados e este tratamento foi dependente da concentração e do tempo. Por outro lado, uma interação indiferente foi observada predominantemente com as outras combinações. Uma redução de mais de 50% da formação de biofilme no material PUR foi observada usando PH151 combinado com fluconazol. **Conclusão:** PH151 demonstrou potencial para tratamento local como uma abordagem de terapia combinada contra a formação de biofilme de *Candida* em dispositivos de hemodiálise.

Palavras-chave: *Candida*, biofilme, politetrafluoroetileno, poliuretano, hemodiálise

New alternatives to combat *Candida* biofilm in hemodialysis devices

Author: Letícia Fernandes da Rocha

Advisor: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Co-advisor: Dra. Bruna Pippi

Abstract

Introduction: *Candida* biofilm in medical devices is a concerning and important clinical issue for hemodialysis patients that need to constantly use a prosthetic fistula and catheter. This prolonged use increases the risk of candidemia due to biofilm formation. PH151 and Clioquinol are 8-hydroxyquinoline derivatives that have been studied by our group and showed interesting anti-*Candida* activity. **Aim:** This study evaluated the biofilm formation capacity of *Candida* species on polytetrafluoroethylene (PTFE) and polyurethane (PUR), materials commonly used in hemodialysis devices, and investigated the synergistic effect between those compounds with fluconazole, amphotericin B and caspofungin against biofilm cells removed from those materials. Also, the synergistic combination was evaluated regarding the prevention of biofilm formation on PTFE and PUR discs. **Methodology:** Susceptibility tests against planktonic and biofilm cells were carried out by broth microdilution. The checkerboard method and time kill assay were used to evaluate the interaction between antifungal agents. Antibiofilm activity on PTFE and PUR material was assessed to quantify the prevention of biofilm formation. **Results:** *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis* showed an ability to form biofilm on both materials. In contrast, *C. parapsilosis* did not demonstrate this ability. Synergistic interactions were observed when PH151 was combined with fluconazole in 77.8% of isolates and this treatment appeared to be concentration and time dependent. On the other hand, an indifferent interaction was predominantly observed with the other combinations. A reduction of more than 50% of the biofilm formation on PUR material was observed using PH151 combined with fluconazole. **Conclusion:** PH151 demonstrated the potential for local treatment use as a combination therapy approach against *Candida* biofilm formation in hemodialysis devices.

Keywords: *Candida*, biofilm, polytetrafluoroethylene, polyurethane, hemodialysis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
2.2.1 Avaliar a capacidade de formação de biofilme de diferentes espécies de <i>Candida</i> em materiais protéticos de polietrafluoretileno e poliuretano utilizados em próteses articulares e cateteres de hemodiálise;	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1. O gênero <i>Candida</i>	19
3.2. Biofilme de <i>Candida</i>	20
3.3. <i>Candida albicans</i>	21
3.4. <i>Candida glabrata</i>	22
3.5. <i>Candida tropicalis</i>	24
3.6. <i>Candida parapsilosis</i>	24
3.7. Candidemia	25
3.8. Biofilme de <i>Candida</i> no contexto da hemodiálise.....	28
3.9. Fármacos utilizados no tratamento de candidemia	32
3.9.1. Polienos.....	32
3.9.2. Azóis.....	33
3.9.3. Equinocandinas	34
3.10. Derivados de 8-hidroxiquinolinas como alternativa de prevenção de candidemia associada a biofilme em dispositivos de hemodiálise	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1. Isolados Fúngicos	39
4.2. Ensaio de formação de biofilme em material PTFE e PUR.....	39
4.3. Teste de susceptibilidade antifúngica de células planctônicas e de biofilme.....	40
4.4. Ensaio de Sinergismo (<i>Checkerboard</i>).....	41
4.5. Ensaio de tempo de morte da combinação (time-kill combination)	41
4.6. Atividade antibiofilme em material de PTFE e PUR	42
5. ARTIGO	43
6. DISCUSSÃO GERAL.....	45

7. CONCLUSÃO.....	51
8. PERSPECTIVAS.....	53
9. REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas sistêmicas são atualmente uma importante problemática de saúde pública global, principalmente quando relacionadas à formação de biofilme em implantes de dispositivos médicos (CAVALHEIRO E TEIXEIRA, 2018). A contaminação destes dispositivos pode ser proveniente de microrganismos da pele e mucosa do paciente durante a implantação, como também das mãos da equipe hospitalar (LU et al., 2014). Apesar da prevalência bacteriana nas infecções sistêmicas, o uso crescente de antibióticos de amplo espectro, de cateteres venosos centrais (CVC) e outros dispositivos endovenosos, aumentou expressivamente a incidência de fungos como o agente causal dessas infecções nas últimas décadas (BHATT et al., 2015).

Em pacientes renais crônicos, a hemodiálise é considerada uma das principais modalidades de terapia de substituição renal (AGARWAL et al., 2019). Nestes pacientes, o uso próteses para construção de fístulas e o uso de cateteres se faz necessário em muitos casos quando a fístula arteriovenosa autóloga não é uma opção viável para o procedimento de hemodiálise (BUGGS et al., 2018; MUREA et al., 2019). Como os pacientes hemodialíticos necessitam do acesso arteriovenoso por meio desses dispositivos permanentemente por longos períodos de tempo, o risco de infecções aumenta consideravelmente (ALLON et al., 2018; FARRINGTON; ALLON, 2019).

Predominantemente, esses processos infecciosos são causados por espécies de *Candida*, embora não incomumente outros gêneros leveduriformes e de fungos filamentosos são também isolados (OLIVEIRA et al., 2018). *Candida albicans* é a espécie mais prevalente em fungemias no mundo todo, no entanto as espécies não *albicans*, como *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, emergiram com rapidez nas duas últimas décadas, principalmente devido a habilidade de formação de biofilme expressa em seus isolados (CUÉLLAR-CRUZ et al., 2018).

No entanto, em vista da dificuldade de combater o biofilme, com consequente menor suscetibilidade aos antifúngicos, muitas vezes há necessidade da retirada

dos dispositivos, o que pode gerar desconforto e, sobretudo, risco para os pacientes (Charette e Melnic, 2018). Além disso, segundo estimativas americanas, um caso de candidemia em um paciente aumenta os gastos hospitalares em aproximadamente \$40.000, e estudos demonstram que quase \$6.5 bilhões são gastos por ano em decorrência de infecções em pacientes causadas por biofilme de origem bacteriana ou fúngica (SILVA et al., 2017).

Diante desse panorama e com o crescente número de pacientes dependentes de próteses articulares e cateteres de hemodiálises, ainda há lacunas nos protocolos clínicos para o manejo de complicações causadas por biofilmes de fungos, pois os sintomas insidiosos podem levar a um tratamento incorreto e com um maior tempo de internação (CAMINS, 2013; RAMANATHAN et al., 2012; SYCHEV et al., 2009; KOUTSERIMPAS et al., 2018). É de consenso mundial hoje a necessidade de mais estudos avaliando novas alternativas de combate a biofilmes de *Candida* nos diferentes dispositivos hospitalares, testando principalmente novas combinações farmacêuticas e, sobretudo novas moléculas antibiofilmes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Pesquisar alternativas de prevenção da formação de biofilme de *Candida* em dispositivos de hemodiálise utilizando derivados de 8-hidroxiquinolinas e antifúngicos atualmente utilizados no tratamento da candidemia.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar a capacidade de formação de biofilme de diferentes espécies de *Candida* em materiais protéticos de polietrafluoretileno e poliuretano utilizados em enxertos e cateteres de hemodiálise;

2.2.2 Avaliar a suscetibilidade *in vitro* das células sésseis e planctônicas de *Candida* provenientes dos materiais, frente aos agentes antifúngicos anfotericina B, fluconazol, caspofungina, e aos derivados de 8-hidroxiquinolinas - PH151 e clioquinol;

2.2.3 Investigar a possível ação sinérgica da combinação entre antifúngicos com clioquinol e PH151

2.2.4 Avaliar se a combinação sinérgica com os derivados da 8-hidroxiquinolina apresenta propriedades fungicidas ou fungistáticas contra espécies de *Candida*

2.2.5 Avaliar a atividade antibiofilme das moléculas presentes na melhor combinação sinérgica antifúngica observada como tratamento dos materiais compostos por polietrafluoretileno e poliuretano

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. O gênero *Candida*

Candida é uma levedura comensal da microbiota endógena de aproximadamente 70% da população humana saudável, colonizando as mucosas orofaríngeas, genitais e gastrointestinais. Também faz parte da colonização deste fungo áreas superficiais, como pele e unhas (PELLON; SADEGHI NASAB; MOYES, 2020; POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015). Apesar de normalmente fazer parte do organismo humano, este microrganismo comumente causa infecções quando condições ambientais e do hospedeiro permitem seu crescimento e invasão tecidual, características que fazem da *Candida* um patógeno oportunista e o gênero de maior prevalência em doenças fúngicas invasivas (FIDEL et al., 2020; GALOCHA et al., 2019). Dentre as condições que levam esse microrganismo a ser patogênico, destacam-se a imunossupressão do hospedeiro, fator que desencadeia o desequilíbrio comensal do fungo dentro de seu hospedeiro, e o uso de cateteres e dispositivos endovenosos, os quais propiciam a disseminação sanguínea levando a candidemia, episódio em que a taxa de mortalidade pode chegar a 50% (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015).

Apesar da *C. albicans* ser a espécie mais prevalente em infecções hospitalares por *Candida*, espécies não-*albicans* vêm cada vez mais sendo isoladas nos ambientes hospitalares. Das aproximadamente 200 espécies de *Candida*, 15 foram isoladas de infecções em humanos e, entre essas, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* são as de maior importância médica. As características morfológicas de cada espécie variam e desempenham um importante papel para a virulência. O dimorfismo característico da maioria das espécies deste gênero resulta no predomínio da forma leveduriforme para a disseminação sanguínea e da forma hifal na invasão tecidual (KADOSH, 2019; POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015; TIMMERMANS et al., 2018). Além disso, o dimorfismo característico de muitas espécies de *Candida* dificulta o reconhecimento fúngico pelo sistema imunológico do hospedeiro. Isso acontece porque, entre os vários mecanismos de evasão da

resposta imune, as formas filamentosas apresentam menos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) em sua superfície celular do que na forma leveduriforme. (PAPPAS et al., 2018).

3.2. Biofilme de *Candida*

Uma característica notória para o perfil virulento de cepas de *Candida* é a capacidade desse microrganismo formar biofilme. A formação de biofilme bacteriano em dispositivos hospitalares já vem sendo amplamente estudada há quase meio século, entretanto, nas últimas duas décadas, uma significativa atenção vem sendo dada ao combate de biofilme por espécies de *Candida*, uma vez que seu surgimento veio fortemente acompanhado de altas taxas de morbidade e mortalidade (GALOCHA et al., 2019; KOJIC; DAROUICHE, 2004). A estrutura do biofilme confere maior resistência à ação antifúngica, tanto em relação às células do sistema imunológico do hospedeiro, como neutrófilos e macrófagos, quanto a fármacos utilizados para o tratamento, como polienos, equinocandinas e azóis, contribuindo, assim, para a patogenicidade e difícil tratamento de doenças causadas por espécies deste gênero (NETT; ANDES, 2020).

O biofilme é formado principalmente por células sésseis e matriz extracelular, essa última composta por proteínas, carboidratos, lipídios e DNA. A matriz funciona como um material polimérico aderente e sugere-se que pode funcionar para degradação de biopolímeros como fonte de energia ou como mecanismo de dispersão celular (LI et al., 2018; NETT; ANDES, 2020). O perfil lipídico é diferenciado nas células do biofilme (células sésseis) apresentando maiores níveis do que nas células livres (planctônicas). Na matriz extracelular, os lipídios são atuantes na manutenção da integridade da membrana plasmática e também promovem a sinalização célula-célula constituindo o sistema *quorum sensing*, contribuindo para a resistência associada a biofilme de *C. albicans* (ALIM; SIRCAIK; PANWAR, 2018). Já a presença dos polissacarídeos glicanas e mananas, carboidratos complexos, além de ser essencial para a formação do biofilme, contribui, também, para o aumento de resistência a antifúngicos como fluconazol, anfotericina B e flucitosina através de um mecanismo de sequestro

envolvendo interações não covalentes entre o polissacarídeo e o antifúngico, diminuindo a efetividade do mesmo (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; NETT; ANDES, 2020a) Além disso, dentro do biofilme, há uma pequena subpopulação de células denominadas células fúngicas persistentes, as quais são altamente resistentes a altas doses de antifúngicos, o que contribui para o difícil tratamento de doenças relacionadas a biofilme (WUYTS; VAN DIJCK; HOLTAPPELS, 2018).

O processo de formação do biofilme é altamente regulado molecularmente e se dá em 4 fases: i) adesão das células leveduriformes sobre uma superfície formando uma camada basal do biofilme; ii) proliferação das células com o aparecimento de hifas e/ou pseudo-hifas, promovendo estabilidade; iii) maturação do biofilme, onde ocorre o espessamento da matriz extracelular e estruturação deste; iv) e, por fim, dispersão, quando há o desprendimento das células do biofilme para outros sítios, processo crítico no contexto das infecções sistêmicas por biofilme de espécies de *Candida* (ALIM; SIRCAIK; PANWAR, 2018; WALL et al., 2019).

Desse modo, a problemática relacionada ao biofilme é de grande relevância ao sistema de saúde devido ao aumento de resistência aos antifúngicos e evasão das células do sistema imune causando aumento nas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente entre pacientes neutropênicos e com uso de dispositivos endovenosos, como cateteres e fístulas de uso prolongado (SILVA et al., 2017; WUYTS; VAN DIJCK; HOLTAPPELS, 2018). As características do biofilme diferem de acordo com a espécie do gênero e impactam tanto na epidemiologia das infecções causadas por biofilme de *Candida* quanto no tratamento, visto que nem todas as espécies respondem igualmente à terapia (SILVA et al., 2017).

3.3. *Candida albicans*

Candida albicans é a espécie de *Candida* mais prevalente em infecções hospitalares, é o terceiro patógeno em infecções sistêmicas mais isolado nos Estados Unidos (EUA), bem como o terceiro ou quarto no ranking de prevalência

mundial (PRISTOV; GHANNOUM, 2019; WALL et al., 2019). Além disso, é a espécie com maior capacidade de formar biofilme. O biofilme de *C. albicans* é composto por duas camadas: uma camada fina basal de matriz extracelular contendo células de levedura; e uma camada mais espessa e compacta contendo hifas (SILVA et al., 2017). Sua matriz extracelular é composta por carboidratos, proteínas, fósforo e hexosaminas resultando na estrutura de biofilme mais heterogênea entre as espécies. Em sua formação, apresenta uma fase inicial de desenvolvimento de aproximadamente 11 horas, enquanto a fase de maturação se dá em aproximadamente 38-72 horas (ARAÚJO; HENRIQUES; SILVA, 2017; CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018). O dimorfismo e capacidade de transição morfológica de levedura para hifa e pseudohifas, tanto na invasão tecidual como na formação de biofilme, é um fator que contribui diretamente para a virulência dessa espécie. Em virtude da alta capacidade de formar biofilme, esta espécie é comumente isolada em dispositivos endovenosos, protagonizando, frequentemente, casos de endocardite (PRISTOV; GHANNOUM, 2019; SILVA et al., 2017).

A resistência de *C. albicans* a antifúngicos azólicos depende do tipo de infecção causada pela espécie, sendo que isolados de candidemia tendem a ter um perfil de resistência menor do que isolados de candidíase orofaríngea (WHALEY et al., 2017). Alterações na regulação dos genes “*Candida Drug Resistance*” (CDR) e “*Multi-Drug Resistance*” (MDR), envolvidos no transporte de azóis, contribuem, entre outros fatores genéticos, para a resistência a estes antifúngicos. A superexpressão desses genes resulta em ativação das bombas de efluxo - transportadores de membrana que impedem o acúmulo intracelular de antifúngicos (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018). Já mutações nos genes FKS1 e FKS2 levam a substituições de aminoácidos na enzima β -1,3-D-glucana-sintase, alvo das equinocandinas, resultando em redução da sensibilidade dessa enzima, Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) aumentadas e resistência cruzada entre equinocandinas (PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

3.4. *Candida glabrata*

Candida glabrata é a segunda espécie de *Candida* de maior prevalência em

infecções sistêmicas no mundo, sendo responsável por até 29% dos casos de candidemia. A sua epidemiologia, no entanto, pode variar de acordo com a região. Nos EUA é o segundo patógeno fúngico mais isolado nos casos de candidemia, ao passo que a espécie ocupa o terceiro ou quarto lugar na Ásia (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; GABALDÓN; GÓMEZ-MOLERO; BADER, 2019; KUMAR, K. et al., 2019). Além do seu protagonismo epidemiológico, essa espécie ocupa uma posição filogenética única, já que é a espécie de interesse clínico que mais se difere das outras por ser uma levedura haploide e apresentar apenas uma morfologia, com ausência de hifas e pseudohifas. Seu genoma mais se assemelha à levedura não patogênica *Saccharomyces cerevisiae* e, devido a sua morfologia apenas leveduriforme, era anteriormente denominada *Cryptococcus glabrata* (GABALDÓN; GÓMEZ-MOLERO; BADER, 2019; KUMAR et al., 2019).

Apesar do monomorfismo, a presença de diversos genes envolvidos na expressão de adesinas e a consequente formação de biofilme exercem um papel essencial na virulência (TIMMERMANS et al., 2018). Seu biofilme se apresenta como uma estrutura compacta com alto teor de proteínas e carboidratos, incluindo β -1,3-glicana envolvendo células leveduriformes e sua maturação se dá após 48 horas. Comparando com *C. albicans*, o biofilme de *C. glabrata* tem a metade da espessura e há pequena quantidade de células persistentes (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; KUMAR, K. et al., 2019; WUYTS; VAN DIJCK; HOLTAPPELS, 2018). Em contrapartida, a espécie tem alta capacidade de formar biofilme, sendo comumente isolada em dispositivos hospitalares, principalmente em cateteres de nutrição parenteral (SILVA et al., 2017). Ainda, destaca-se clinicamente devido à sua resistência intrínseca aos antifúngicos azólicos explicada pela alta taxa de expressão de bombas de efluxo causada por uma mutação no gene "*Pleiotropic Drug Resistance*" (PDR1), (GABALDÓN; GÓMEZ-MOLERO; BADER, 2019; KUMAR, K. et al., 2019). Quanto às equinocandinas, têm-se reportado uma diminuição da sensibilidade de cepas de *C. glabrata* nos últimos anos, e isso, em parte, pode ser explicado devido a mutações nos genes FKS, que causam mudança na enzima β -1,3 d glicana sintase, alvo dessa classe de antifúngicos (PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

3.5. *Candida tropicalis*

Assim como as outras espécies não *albicans*, há um aumento de infecções causadas por *C. tropicalis*. Essa é uma espécie de relevante importância clínica, uma vez que é a segunda espécie de *Candida* mais isolada no Brasil e América Latina e comumente isolada em infecções do trato urinário (FORASTIERO et al., 2013; KADOSH; MUNDODI, 2020). Além disso, é considerado um microrganismo osmotolerante, resistindo a ambientes hostis, como alta concentração de sal; também destaca-se por ser a espécie com maior habilidade de adesão depois de *C. albicans*, com a qual possui a maior similaridade genética (ZUZA-ALVES; SILVA-ROCHA; CHAVES, 2017). Ainda se tratando de similaridade com *C. albicans*, as duas são as únicas espécies de interesse clínico que apresentam as três morfologias, porém, em *C. tropicalis*, a transição morfológica não é tão acentuada e depende do meio de crescimento (KADOSH; MUNDODI, 2020; WUYTS; VAN DIJCK; HOLTAPPELS, 2018). Seu biofilme, facilmente formado, se apresenta como uma rede de células de leveduras, pseudohifas e hifas, e apesar de ter um biofilme com matriz extracelular com menor quantidade de proteínas e carboidratos, esse apresenta maior resistência à remoção comparada à *C. albicans*. Tais características são ainda mais agravantes quando se trata de formação de biofilme em dispositivos hospitalares, principalmente em próteses de articulação, onde essa espécie é frequentemente isolada (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; SILVA et al., 2017).

Normalmente *C. tropicalis* era suscetível a todas as classes de antifúngicos, porém, nos últimos anos, têm surgido mais cepas dessa espécie com perfil de resistência, principalmente aos azóis. Isso pode estar ocorrendo devido à superexpressão de genes *ctMDR1* e *ctCDR1*, responsáveis pela produção de bombas de efluxo (FORASTIERO et al., 2013).

3.6. *Candida parapsilosis*

Dependendo da região, *C. parapsilosis* configura como a segunda ou terceira espécie de *Candida* mais isolada em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). No Japão e China, essa espécie é responsável por 20 a 23% das candidemias. Na

América do Norte, *C. parapsilosis* se equipara à *C. glabrata*. Em alguns países da América do Sul, como Venezuela e Colômbia, infecções causadas por *C. parapsilosis* superam às de *C. albicans* (TÓTH et al., 2019). Entre os perfis de pacientes acometidos por infecções causadas por essa espécie, há uma prevalência expressiva em recém nascidos e prematuros, além de pacientes transplantados e em uso de nutrição parenteral (PRISTOV; GHANNOUM, 2019). A contaminação horizontal dessa espécie é comum por, normalmente, fazer parte da microbiota da pele, sendo frequentemente isolada da mão humana. Assim, por consequência, facilmente ocorre a contaminação de dispositivos endovenosos, onde tem habilidade de formar biofilme, contribuindo para as causas de candidemia. Além dos dispositivos, *C. parapsilosis* desenvolve biofilme em superfícies líquidas como nutrição parenteral rica em glicose (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018).

O biofilme formado por essa espécie é o mais compacto e fino entre todas as espécies e compreende uma matriz extracelular composta basicamente por carboidratos e pouco teor de proteínas envolvendo células leveduriformes e pseudohifas (ARAÚJO; HENRIQUES; SILVA, 2017; SILVA et al., 2017). Não há registro de formação de hifas nessa espécie, mas a transição morfológica de levedura para pseudohifa contribui para a virulência de *C. parapsilosis*, já que suas pseudohifas têm maior potencial de evasão dos macrófagos e induz níveis maiores de danos às células do hospedeiro (TÓTH et al., 2019).

Assim como outras *Candidas* não-*albicans*, tem se isolado cada vez mais cepas de *C. parapsilosis* resistentes a azóis, com mecanismos de resistências similares as de outras espécies, tais como superexpressão de bombas de efluxo causada pelo aumento na expressão dos genes CDR1 e MDR1, envolvidos na codificação de transportadores. Quanto às equinocandinas, apesar de *C. parapsilosis* clinicamente ser suscetível, têm se observado altos valores de CIMs, provavelmente relacionado a um polimorfismo natural no gene FKS1 específico nessa espécie (GONÇALVES et al., 2016; PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

3.7. Candidemia

Candidíase invasiva é um quadro no qual há uma infecção profunda causada por *Candida* sp., acometendo diversos órgãos como rins, fígado, baço e coração. Pode resultar de inoculação direta de forma exógena ou pela disseminação sanguínea, principalmente a partir do trato gastrointestinal, onde esse microrganismo é pertencente à microbiota saudável (ENOCH et al., 2017; EPELBAUM; CHASAN, 2017). Já a candidemia é definida pela presença de espécie de *Candida* em amostra de sangue e é a quarta maior causa de infecção sistêmica no mundo atingindo cerca de 750000 casos anualmente (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; VASILEIOU et al., 2018). A taxa de candidemia em UTIs, especialmente UTI cirúrgica, é maior, podendo exceder de dez a vinte vezes comparado aos casos fora desse cenário (EPELBAUM; CHASAN, 2017).

Em relação à epidemiologia das espécies mais responsáveis por candidemia, *C. albicans* ainda é a principal (TÓTH et al., 2019). Porém, nos últimos anos, especialmente em países em desenvolvimento, a taxa de isolamento dessa espécie caiu de 70 para 50% em detrimento do aumento da incidência de espécies não *albicans*. Tal cenário está ocorrendo, provavelmente, devido à pressão seletiva associado ao uso profilático de antifúngicos de primeira linha contra *C. albicans* (KAUR; CHAKRABARTI, 2017; PITARCH; NOMBELA; GIL, 2018). A distribuição das espécies não *albicans*, como já visto, varia conforme a região. *Candida tropicalis* e *C. parapsilosis* destacam-se no Brasil e América Latina, enquanto *C. glabrata* tem maior prevalência nos EUA, Canadá, Norte da Europa e Austrália (EPELBAUM; CHASAN, 2017).

O estabelecimento dos quadros de candidemia e candidíase invasiva resultam em alta mortalidade entre os pacientes, com taxas que variam de 36 a 63% (VASILEIOU et al., 2018). Os fatores de risco podem estar relacionados tanto ao hospedeiro quanto aos cuidados médicos. Em pacientes críticos, a deficiência do sistema imune e o colapso da barreira entérica, como ocorre após cirurgia abdominal, configura em um dos maiores fatores de risco para o estabelecimento de candidemia (EPELBAUM; CHASAN, 2017). As condições clínicas mais predisponentes são pancreatite necrosante, doenças hematológicas malignas, tumores sólidos, neutropenia, insuficiência renal crônica e candidemia prévia,

sendo os pacientes com idade avançada e neonatos os mais vulneráveis. Outros importantes fatores de risco são transplante de órgãos, hemodiálise, quimioterapia, longa permanência em UTIs, ventilação mecânica, uso de corticoides e antibióticos de amplo espectro e permanência de dispositivos endovenosos como cateter venoso central, nutrição parenteral total e cateter urinário (KAUR; CHAKRABARTI, 2017).

Além da alta morbidade e mortalidade, candidemia e candidíase invasiva também geram impacto econômico por prolongar o tempo de internação, em aproximadamente 13 dias, em pacientes de UTI e aumento com despesas de tratamento antifúngico (EPELBAUM; CHASAN, 2017). Uma revisão sistemática de WAN ISMAIL et al. (2020) reuniu oito estudos conduzidos nos EUA, Austrália, Reino Unido e Alemanha e avaliou que o custo por paciente com candidemia é de \$48.487 a \$157.574 e o custo médio por hospitalização associado a candidemia gira em torno de \$10.216 a \$37.715. Já em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, a estimativa precisa do ônus financeiro em torno da candidemia não é possível pois não há estudos sistemáticos de vigilância suficientes (KAUR; CHAKRABARTI, 2017).

A redução da mortalidade e dos custos de internação e tratamento dependem do diagnóstico precoce. Porém, ou os sintomas são similares aos de bacteremia, confundindo a equipe médica, ou eles são sutis e insidiosos. Além disso, para a hemocultura, padrão ouro de diagnóstico, é necessário grande volume de amostra - em torno de 5 mL- o que pode tornar-se um problema em casos de neonatos. Também é desvantagem da hemocultura o tempo de processamento para o resultado, que varia entre 14 e 72 horas dependendo da espécie. Ainda, cerca de 50% das culturas resultam negativo para candidíase invasiva (CLANCY; NGUYEN, 2018; KAUR; CHAKRABARTI, 2017). Além do método de diagnóstico laboratorial através da cultura e testes de medidas de biomarcadores, existem as tecnologias líderes, em que se destacam os métodos moleculares e proteômicos. Nesse último, MALDI-TOF MS surgiu recentemente como uma relevante tecnologia para identificação de microrganismos, incluindo espécies de *Candida*, através de um sistema de espectrometria de massas, com a vantagem de apresentar um rápido tempo de identificação (aproximadamente

10 a 30 minutos). No entanto, esse teste depende de amostra de hemocultura positiva prévia e instrumentação altamente custosa, realidade que pode ser distante na rotina de hospitais em países em desenvolvimento (PITARCH; NOMBELA; GIL, 2018).

3.8. Biofilme de *Candida* no contexto da hemodiálise

Estima-se que dois terços dos pacientes com doença renal crônica necessitam realizar hemodiálise. O Brasil é o terceiro país com mais pacientes em diálise, com 126.593 paciente registrados em 2017 (THOMÉ et al., 2019). Nos EUA, 80% dos pacientes que iniciaram a hemodiálise, tiveram implantes com cateter. Desses, 21% continuaram com cateter por pelo menos um ano após o início do tratamento (FISHER et al., 2020). Septicemia relacionada à hemodiálise, de modo geral, é a segunda causa de morte entre pacientes com doença renal terminal, seguida de eventos cardiovasculares (CAMINS, 2013). Pacientes em hemodiálise necessitam de um acesso vascular que permita a conexão da circulação do paciente ao circuito externo de hemodiálise (DAS NEVES et al., 2011). O uso da fistula arteriovenosa autóloga (FAV) (Figura 1a) é considerado padrão ouro para esse acesso, mas, em casos de pacientes sem acesso anatômico adequado, é indicado o uso de enxertos protéticos de polietrafluoretano (PTFE) (Figura 1b) (BUGGS et al., 2018; JADLOWIEC et al., 2016). Como se faz necessário um período em média de 6 semanas para a maturação da fístula, se torna necessário um acesso temporário, onde uma cânula percutânea é colocada em veias intra-torácicas, por via subclávia ou jugular, ou ainda por veia femoral (QURESHI; ABID, 2010).

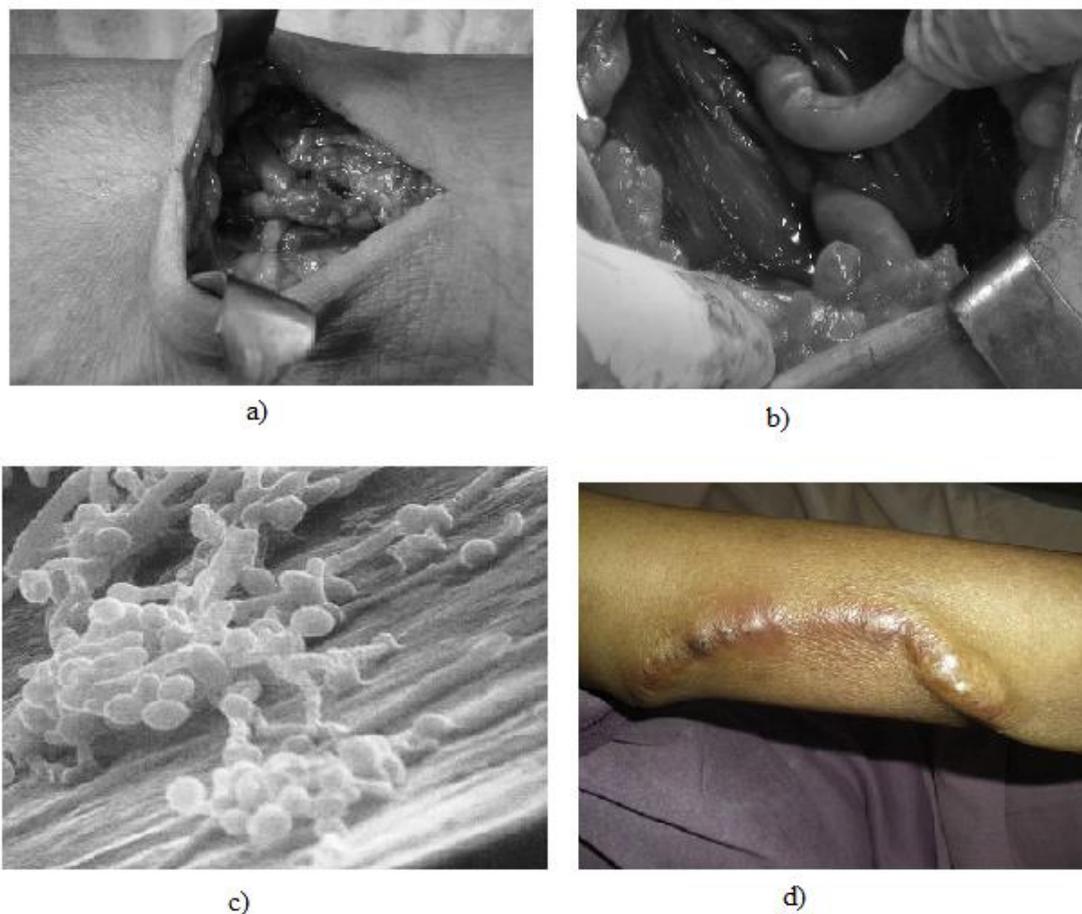


Figura 1: a) Aspecto intraoperatório; FAV rádio-cefálica confeccionada (Adaptado de DAS NEVES et al., 2011). b) FAV fêmoro-femoral com prótese de PTFE (Adaptado de DAS NEVES et al., 2011). c) Microscopia eletrônica de Varredura de biofilme de *C. albicans* formado em superfície de cateter vascular (Adaptado de KOJIC; DAROUICHE, 2004). d) Edema em enxerto de PTFE (Adaptado de HUANG et al., 2016).

Porém, em alguns países em desenvolvimento, como o Brasil, há um atraso na construção das FAV, o que leva ao uso prolongado de cateter venoso central (CVC) para hemodiálise (Figura 2) (ANDREOTTI et al., 2016). Além disso, nos EUA, em média, 110.000 pessoas iniciam hemodiálise anualmente, sendo que 80% utilizam CVC por imaturidade da FAV ou outros problemas de acesso a construção das FAV (ALLON et al., 2018). Por exemplo, em pacientes idosos, com mais de 70 anos, o procedimento para construção de FAV parece não oferecer os mesmos benefícios do que para jovens e adultos (JADLOWIEC et al., 2016).

Uma das consequências desse prolongado cateterismo é infecção por *Candida*,

principalmente devido ao perfil tipicamente formador de biofilme das espécies desse gênero fúngico, consideradas muitas vezes como normal da microbiota da pele (ANDREOTTI et al., 2016; VON EIFF et al., 2005). Os blastoconídios planctônicos aderem a superfícies do CVC e produzem uma matriz estrutural formada por polímeros extracelulares que dificultam a penetração e ação de antifúngicos, diminuindo sua sensibilidade e, por consequência, aumentando sua resistência (Figura 3) (COBRADO et al., 2017). Apesar de ser mais comum a formação de biofilme em CVC tunelizados, já há relatos de caso envolvendo candidemia proveniente de biofilme em enxertos de PTFE (CLANCY; NGUYEN, 2018; HUANG et al., 2016; MIN KIM et al., 2018).

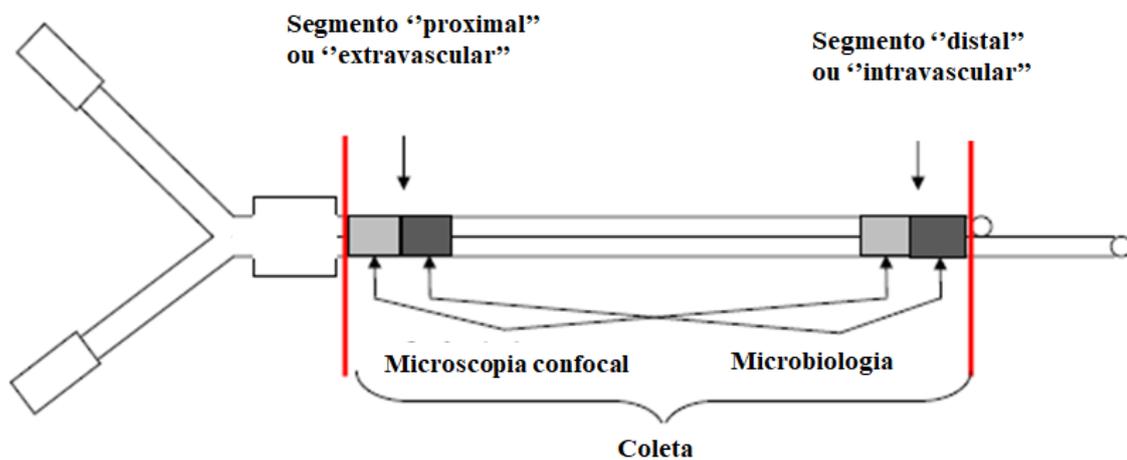


Figura 2: Segmentos do cateter de hemodiálise (Adaptado de RAMANATHAN et al., 2012).

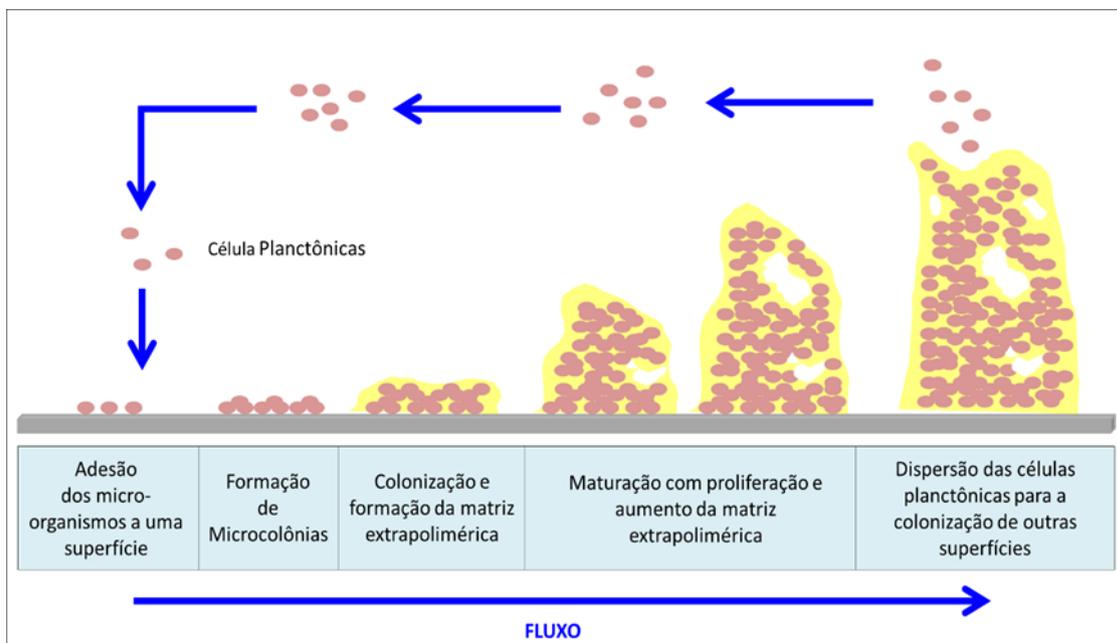


Figura 3: Etapas da formação do biofilme (Pippi et al, 2018). Imagem autorizada pelo autor.

Infecções da corrente sanguínea relacionadas aos cateteres resultam em complicações sistêmicas, gerando impacto no tempo de hospitalização e aumento da morbimortalidade. Segundo a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA), a febre constitui um dos sinais clínicos para infecções sanguíneas relacionadas a cateter. Porém, a temperatura basal de pacientes dialíticos é menor comparada a pacientes com função renal normal e, por isso, esse sinal clínico pode passar despercebido pela equipe médica, dificultando o diagnóstico. Ainda, não há consenso de validação para a hemocultura quantitativa e tempo para positivar um resultado nos pacientes em hemodiálise (ALLON et al., 2018).

Em se tratando de pacientes hemodialíticos, não há consenso sobre profilaxia voltada para os dispositivos utilizados, principalmente em casos que a retirada desses não pode ser realizada quando a infecção está instalada. A retirada do cateter, apesar de ser recomendado, pode ser prejudicial para pacientes com

vasculopatias, além de poder causar dano aos vasos sanguíneos quando um novo acesso for criado, aumentando os riscos de complicações (JANUM; AFSHARI, 2016). Paul Dimondi *et al.* (2014) relataram o uso de anfotericina B lipossomal em cateter já infectado de paciente em hemodiálise juntamente com terapia oral de fluconazol com sucesso, porém admitem problemas relacionados à anfotericina B como estabilidade, incompatibilidade e custo.

3.9. Fármacos utilizados no tratamento de candidemia

A implementação do adequado tratamento frente ao correto e precoce diagnóstico bem como prevenção de contaminação com medidas de higiene por parte da equipe hospitalar são essenciais para a redução da mortalidade causada por candidíase invasiva. Três principais classes de fármacos antifúngicos são utilizadas no combate a essa condição: polienos, azóis e equinocandinas (BASSETTI *et al.*, 2019; BEN-AMI, 2018; KAUR; CHAKRABARTI, 2017).

3.9.1. Polienos

Anfotericina B é um fármaco pertencente a classe dos polienos, primeiros antifúngicos de uso clínico (CAMPOY; ADRIO, 2017). Seu mecanismo de ação se dá pela ligação ao ergosterol formando poros que levam à ruptura na membrana plasmática e extravasamento do conteúdo intracelular vital para a célula fúngica (CHATELON *et al.*, 2019). Possui amplo espectro de ação fungicida, maior taxa de efeito de tempo de morte celular entre as classes antifúngicas e há poucos relatos de padrões de cepas de *Candida* resistentes a esse fármaco. Além disso, possui alta penetração no líquido cefalorraquidiano e pulmonar (BASSETTI *et al.*, 2019; KEANE *et al.*, 2018). Porém, devido à alta hidrofobicidade e baixa absorção no trato gastrointestinal, sua administração se restringe a via parenteral. Possui ligeira afinidade pelo colesterol humano levando a alta toxicidade, principalmente nefrotoxicidade, a qual está associada a mortalidade, sendo expressamente contraindicada em pacientes com doenças renais e em tratamento de hemodiálise (CAMPOY; ADRIO, 2017; CHATELON *et al.*, 2019). Devido a isso, guias da Sociedade Europeia de Microbiologia

Clínica e Doenças Infecciosas (ESCMID) e a Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA), recomendam a anfotericina B como agente antifúngico de segunda linha. Fórmulas lipossomais do fármaco têm substituído anfotericina B desoxicolato diminuindo assim seu perfil toxicológico (BASSETTI et al., 2019; KEANE et al., 2018).

3.9.2. Azóis

Já a classe dos azóis atua dentro da célula fúngica inibindo a enzima lanosterol-14- α -desmetilase, que tem fundamental papel na formação do ergosterol - principal componente da membrana fúngica. (PAPPAS et al., 2018). Além disso, o bloqueio da formação de ergosterol causa o acúmulo de precursores que são convertidos em 14- α -metilsteróis, tóxicos à célula fúngica (BERSANI et al., 2019). São fármacos fungistáticos, impedindo o crescimento celular e replicação fúngica. Devido ao seu perfil farmacológico, os azóis inibem vários complexos enzimáticos de citocromo P450, influenciando na metabolização de diversos fármacos e aumentando as interações medicamentosas (CHATELON et al., 2019). Fluconazol é o principal fármaco da primeira geração de triazóis, sendo muito utilizado na clínica, inclusive no tratamento de candidemia, destacando-se pela sua boa tolerabilidade, com perfil farmacocinético e farmacodinâmico bem conhecidos (CAMPOY; ADRIO, 2017; CHATELON et al., 2019; PAPPAS et al., 2018). A limitação no uso do fluconazol, no entanto, tem se tornado maior frente ao expressivo surgimento de cepas com perfil de resistência, principalmente entre as espécies não *albicas* (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018). Sendo assim, apesar de ser utilizado como terapia primária na América Latina, recomenda-se que fluconazol seja administrado como medida de desescalamento, após o uso inicial de uma equinocandina, ou então que seu uso em monoterapia seja utilizado apenas em situações não críticas e em pacientes cujas cepas isoladas possuam perfil de sensibilidade (BASSETTI et al., 2019; CAMPOY; ADRIO, 2017; KAUR; CHAKRABARTI, 2017; NUCCI et al., 2013). Voriconazol é o triazol de segunda geração aprovado para o tratamento de candidemia. Possui amplo espectro de ação e estudos clínicos demonstram ser mais efetivo do que fluconazol e tão efetivo quanto anfotericina B (BEN-AMI, 2018). Porém, devido a variabilidade

genética do gene CYP2C19, a metabolização do fármaco varia entre os pacientes, necessitando, portanto, monitoramento terapêutico da concentração sérica. Ainda, muitas cepas de *Candida* com perfil de resistência ao fluconazol apresentam resistência cruzada ao voriconazol (PATEL; CARVER; ESCHENAUER, 2018). Outros azóis como pozaconazol, itraconazol e isavuconazol não são aprovados para infecções sistêmicas por *Candida* (BASSETTI et al., 2019; PATEL; CARVER; ESCHENAUER, 2018).

3.9.3. Equinocandinas

Diferentemente dos azóis e polienos que têm seu mecanismo de ação voltado para o ergosterol, sendo considerados antifúngicos de membrana, a classe das equinocandinas tem como alvo final a parede celular através da inibição da enzima 1,3- β -D-glicana sintase (CHATELON et al., 2019). Essa enzima-alvo não está presente em células de mamíferos e, por isso, fármacos dessa classe possuem, em geral, bom perfil de segurança com menores efeitos tóxicos (CAMPOY; ADRIO, 2017). Anidulafungina, caspofungina e micafungina fazem parte dessa classe e estão disponíveis apenas na forma intravenosa. Apesar disso, são efetivos e seguros, mostrando mais resultados clínicos positivos na redução da mortalidade comparado com fármacos azóis e anfotericina B (EPELBAUM; CHASAN, 2017; PAPPAS et al., 2018). Essas características fazem das equinocandinas fármacos de primeira linha no tratamento da candidíase invasiva. No entanto, apesar de a maioria das espécies de *Candida* não apresentarem perfil de resistência frente a esses fármacos, tem se notado que cepas de *C. parapsilosis* possuem valores de concentrações inibitórias mínimas (CIMs) maiores do que todas as outras espécies (BASSETTI et al., 2019).

A duração do tratamento recomendado é de, em média, 14 dias após a primeira cultura negativa com a recomendação de uso de uma equinocandina como primeira linha de tratamento incluindo uma transição (desescalamento) para fluconazol com tempo de uso que varia para cada paciente (PAPPAS et al., 2018). O controle da fonte contaminante também é essencial para o efetivo tratamento de candidemias. Por isso, apesar de a remoção de CVC parecer

controversa, ela deve ser tentada em pacientes com candidemia (BASSETTI et al., 2019). Diretrizes atualizadas pela Sociedade de Doenças Infecciosas da América e Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica em 2016 e 2019, respectivamente, vão de encontro ao uso de antifúngicos como forma de profilaxia e recomendam o uso de terapia empírica apenas em pacientes com altos riscos de desenvolvimento de candidíase invasiva (CHATELON et al., 2019).

A resistência de espécies de *Candida* relacionada a biofilme é um desafio para o tratamento de candidemia. No biofilme existe tanto a resistência ligada às células planctônicas quanto aos mecanismos do próprio biofilme que envolvem a produção da matriz extracelular, o sistema *quorum sensing* e células persistentes, já mencionados anteriormente. Em casos de candidemia relacionada a biofilme de *Candida* em cateteres, a remoção do dispositivo é indicada. Equinocandinas têm se mostrado superiores em relação a outras classes de antifúngicos no combate às células planctônicas de espécies de *Candida*. Porém, existem diferenças específicas no biofilme de cada espécie que fazem com que os valores de CIM variem demasiadamente para cada espécie. Por exemplo, caspofungina pode apresentar CIM de até 64 mg/L frente a células sésseis de *C. parapsilosis* e 2 mg/L frente a biofilme de *C. albicans* (BOUZA; GUINEA; GUEMBE, 2014; KATRAGKOU; ROILIDES; WALSH, 2015).

3.10. Derivados de 8-hidroxiquinolinas como alternativa de prevenção de candidemia associada a biofilme em dispositivos de hemodiálise

A identificação e controle da fonte de infecção é essencial para definir a conduta clínica apropriada frente ao episódio de candidemia. No entanto, não há consenso sobre a retirada do cateter venoso central quando a candidemia está estabelecida. Enquanto algumas diretrizes clínicas recomendam fortemente a retirada do cateter o mais cedo possível, estudos incluindo ensaios clínicos randomizados parecem refutar essa recomendação. NUCCI et al. (2010) não observaram benefício da retirada de CVC no sucesso do tratamento, sobrevivência, taxa de persistência ou recorrência e tempo de erradicação

micológica em ensaio clínico randomizado com 842 pacientes com candidemia. Além disso, a retirada de cateter em pacientes críticos aumenta o risco de complicações sérias, geram desconforto e é contraindicado dependendo da condição clínica do paciente (BASSETTI et al., 2019; BEN-AMI, 2018; CHARETTE; MELNIC, 2018)

Como a presença de biofilme em implantes de dispositivos médicos representa fator de risco para o desenvolvimento de infecções sistêmicas, medidas profiláticas devem ser implementadas (CATEAU; RODIER, 2012). Nesse contexto, devido à alta taxa de desfechos clínicos problemáticos quando o cateter não é removido, o manejo da terapia antifúngica no cateter, mundialmente conhecida como “antifungal catheter lock therapy” (AFLT), ou terapia de bloqueio, tem sido usado para prevenir a perda do acesso. O principal objetivo é entregar uma solução com propriedades antifúngicas na concentração ideal e capaz de esterilizar o lúmen do dispositivo (PAUL DIMONDI et al., 2014b). No entanto, comparado a soluções antibacterianas, são limitadas as experiências clínicas e estudos científicos com uso de soluções como terapia de bloqueio em cateteres para a prevenção e erradicação de espécies de *Candida* nesses dispositivos (BEN-AMI, 2018; CATEAU; RODIER, 2012). (ÍÑIGO; POZO, 2018; KATRAGKOU; ROILIDES; WALSH, 2015). No presente cenário, o desenvolvimento de estudos que promovam alternativas para prevenir o desfecho clínico de candidemia e o aumento da mortalidade se faz necessário.

8-Hidroxiquinolinas e seus derivados pertencem ao grupo das quinolinas, uma classe química que consiste em uma porção heterocíclica versátil e amplamente estudada para diversas condições clínicas. Recentemente, esse grupo tem também sido investigado para o tratamento da COVID-19 (causada pelo novo coronavírus SARS-CoV-2), utilizando os fármacos cloroquina e hidroxicloroquina (DEVAUX et al., 2020; KUMAR, P., 2020; SINGH, A. K. et al., 2020; TOURET; DE LAMBALLERIE, 2020). As 8-hidroxiquinolina e seus derivados bioativos têm sido alvo de pesquisas devido à propriedade de forte quelação de metais através de átomos de oxigênio e nitrogênio. O motivo do interesse no estudo desses compostos advém também de descobertas recentes de outras propriedades de um antigo fármaco comercialmente disponível dessa classe: o clioquinol (5-cloro-

7-iodo-8-hidroxiquinolina)(CHERDTRAKULKIAT; BOONPANGRAK; SINTHUPOOM, 2016).

O clioquinol foi desenvolvido em 1899 para o uso como antisséptico tópico. Posteriormente, teve, por muitos anos, seu uso direcionado para o tratamento de infecções no trato gastrointestinal causadas por protozoários. Em 1970, teve seu uso banido devido a uma síndrome conhecida como neuropatia mielo-óptica subaguda (SMON) restrita à população japonesa e observada no período de 1958 e 1970. A correlação e causalidade foram confirmadas devido ao aparecimento de pigmento verde identificado como quelato de ferro de clioquinol na língua de pacientes que utilizavam o medicamento e desenvolveram os sintomas da neuropatia (PEREZ; SKLAR; CHIGAEV, 2019). Mecanismos de toxicidade propuseram que o clioquinol diminui a disponibilidade de vitamina B12 resultando nos sintomas da neuropatia. Como em outros países SMON não foi detectada em pacientes em uso de clioquinol, sugeriu-se como explicação que a população japonesa é endemicamente deficiente em vitamina B12 e que a sua suplementação evitaria esse desfecho clínico. Atualmente ele é aprovado para uso tópico contra infecções, mas há estudos que sustentam seu uso em processos neurodegenerativos tendo sido pesquisado em ensaio clínico contra a doença de Alzheimer (SINGH et al., 2019). Clioquinol e outros derivados da 8-hidroxiquinolina têm sido alvo de pesquisas e já foram apontados como agentes antimicrobianos, antioxidantes, anticancerígenos e anti-inflamatórios (CHERDTRAKULKIAT; BOONPANGRAK; SINTHUPOOM, 2016; PRACHAYASITTIKUL et al., 2013).

Dentro do contexto de estratégias de combate a infecções fúngicas, clioquinol e derivados da 8-hidroxiquinolina têm sido alvo de pesquisas voltadas para a micologia clínica com planejamento de síntese e modificações estruturais (JOAQUIM et al., 2019). Clioquinol e derivados ácidos sulfônicos da 8-hidroxiquinolina apresentaram atividade relevante contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporium canis* e *M. gypseum* em trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa (PIPPI, et al., 2017). A conversão de derivados ácido sulfônicos em sulfonamidas favoreceu a atividade antifúngica e resultou em derivados com alta

atividade. Ainda, os derivados sulfonamidas da 8-hidroxiquinolina foram avaliados para o tratamento tópico contra dermatomicoses e candidíase, com o desenvolvimento de nanoemulsão (PIPPI et al., 2020), mostrando resultado promissores. Além disso, clioquinol também mostrou-se eficaz na erradicação de biofilme de *Candida* em dispositivo intrauterino (DIU) (PIPPI et al., 2018).

Desse modo, deve-se considerar as dificuldades impostas pelo desenvolvimento de biofilme em dispositivos médicos e suas implicações na taxa de mortalidade e elevação de custos hospitalares devido ao desenvolvimento de candidemia. Atentar-se aos pacientes dialíticos é essencial, pois, além de haver poucos estudos envolvendo o combate de biofilme em fístulas e cateteres, estes dispositivos são de uso prolongado, aumentando os riscos de contaminação e infecção. Uma vez que não há diretrizes e protocolos de manejos preventivos para o controle da possível fonte de infecção – dispositivos médicos, faz-se necessário a busca de alternativas eficazes ao combate do biofilme nos materiais. Como mencionado anteriormente, as 8-hidroxiquinolinas têm sido estudadas pelo nosso grupo e se mostraram promissoras tanto frente a células planctônicas quanto a células sésseis de *Candida* sp. Por isso, esses derivados têm um potencial uso clínico como antifúngico e, portanto, serão mais bem explorados aqui.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Isolados Fúngicos

Os testes de formação de biofilme foram realizados usando três isolados de cada espécie de *Candida* estudada: *C. albicans* (CA 01, CA 02, CA DEB23), *C. tropicalis* (ATCC750, CT 72A, CT RL15) *C. glabrata* (CG DEN08, CG RL37m, CG RL106) e *C. parapsilosis* (CP RL112, ATCC22019, CP RL32). Todos os isolados estão depositados na Coleção de Micologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil) e foram obtidos na ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA) e em amostras clínicas.

4.2. Ensaio de formação de biofilme em material PTFE e PUR

Primeiramente, um tarugo de PTFE (NACIONAL) foi cortado em discos de 16,30 mm de diâmetro e 10,02 mm de espessura. Um tarugo de PUR (DUROPRENE15) foi cortado em discos de 9,90 mm de diâmetro e 4,18 mm de espessura. Os cortes foram realizados no Centro de Tecnologia do Departamento de Siderurgia da Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Células de *Candida*, cultivadas por 24 horas em ágar sabouraud dextrose (SDA) (Sigma-Aldrich), foram ressuspensas na concentração de 10^6 UFC/mL em solução salina. Uma diluição 1:10 desta suspensão foi feita pela adição de 1 mL de suspensão fúngica a 9 mL de Caldo de Soja Tríptico (TSB) (Sigma-Aldrich). Os discos de PTFE e PUR foram colocados nessa suspensão de levedura por 48 horas a 35°C para permitir a formação de biofilme. Após esse tempo, os discos foram lavados três vezes com água estéril para remoção das células não aderidas. Posteriormente, os discos foram adicionados a outro frasco com 20 mL de água peptonada, e as células aderidas foram removidas do dispositivo por sonicação a uma frequência de 40 KHz por 30 min. A fase aquosa sonicada foi diluída em série 10 vezes (até 10^{-3}) com solução salina e 10 μ L de cada diluição foram semeados em placas de SDA, que foram incubadas por 24 horas a 35°C. Em seguida, o UFC (unidades formadoras de colônia) por disco foi determinado. Todas as diluições e

contagens foram feitas em triplicado. A análise estatística foi realizada com ANOVA uma via, bem como o teste de comparações múltiplas de Tukey. $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises foram realizadas pelo software Minitab versão 17.0 (Minitab Inc., State College, PA).

4.3. Teste de susceptibilidade antifúngica de células planctônicas e de biofilme

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) do composto PH151, clioquinol e fármacos antifúngicos para células planctônicas e células de biofilme, formadas usando a metodologia acima, em PTFE foram determinadas usando o método de microdiluição em caldo, de acordo com o Método M27-A3. Diluições seriadas de duas vezes foram feitas em um meio RPMI 1640 e o intervalo de teste final de concentrações foi: 0,125-64 $\mu\text{g/mL}$ para PH151, 0,0625-32 $\mu\text{g/mL}$ para clioquinol, 1-512 $\mu\text{g/mL}$ para fluconazol 0,03125-16 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B e 0,000375–2 $\mu\text{g/mL}$ para caspofungina. Os experimentos foram realizados em triplicata. CIMs foram definidos como a concentração mais baixa de compostos em que os microrganismos testados não demonstraram crescimento visível ao longo de 48 horas. Os critérios interpretativos dos CIMs foram examinados nos pontos de corte contidos no documento M27-A3 (CLSI, 2012) e nas atualizações presentes no documento M27-S4 (CLSI, 2012). Para obter as células viáveis utilizadas neste experimento, espécies de *Candida* foram cultivadas em SDA por 24 horas a 35 ° C. Em seguida, as células foram suspensas em solução salina estéril 0,85% e ajustadas em espectrofotômetro (GT220, Global Trade Technology) no comprimento de onda de 530 nm, a fim de obter transmitância equivalente à escala 0,5 de McFarland (1×10^6 a 5×10^6 unidades formadoras de colônia por mL ou UFC/mL). A suspensão de trabalho fúngica foi preparada fazendo uma diluição 1:50 seguida de uma diluição 1:20 em caldo RPMI 1640, resultando em uma concentração de 1 a 5×10^3 UFC / mL. Quanto às células de biofilme, após o ensaio de formação de biofilme, colônias formadas em discos de PTFE foram coletadas e utilizadas neste experimento de susceptibilidade antifúngica da mesma forma que para as células planctônicas, mencionadas acima.

4.4. Ensaio de *Checkerboard*

A interação entre clioquinol e PH151 junto com cada droga antifúngica comercial foi avaliada para nove isolados de biofilme de *Candida* formados em PTFE usando o método *Checkerboard*. O ensaio levou a quarenta e nove combinações de concentrações diferentes entre derivados de 8-hidroxiquinolina e agentes antifúngicos em concentrações de CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4 e CIMx8. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e incubados a 35 ° C por 48 horas. O efeito das combinações foi classificado pela determinação do índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) expresso como a soma das concentrações inibitórias fracionárias (CIF), conforme definido pela seguinte equação:

$$ICIF = CIF_A + CIF_B = \frac{CIM_A \text{ em combinação}}{CIM_A \text{ sozinho}} + \frac{CIM_B \text{ em combinação}}{CIM_B \text{ sozinho}}$$

Em que:

ICIF ≤ 0,5 = sinergismo

0,5 < ICIF < 4 = Indiferença

ICIF > 4 = Antagonismo

4.5. Ensaio de tempo de morte da combinação (time-kill combination)

Uma curva de eliminação de tempo (UFC em função do tempo) foi usada para examinar a taxa e a extensão da redução celular em um isolado de biofilme de *Candida* formado em PTFE, CT RL15, quando tratado com PH151 e fluconazol sozinho e em combinação sinérgica. As concentrações testadas foram: CIMs de agentes antifúngicos isolados (PH151 a 4 µg/mL e fluconazol a 512 µg/mL), CIMs obtidos em combinação (PH151 a 0,5 µg/mL e fluconazol a 8 µg / mL) e a combinação sinérgica (PH151 a 0,5 µg/mL + fluconazol a 8 µg/mL). Uma concentração de 1x10⁶ células/mL de células de biofilme de *C. tropicalis* CT RL15 foi usada neste experimento. Um inóculo sem tratamento serviu como controle de crescimento. Os experimentos foram realizados em triplicata e

incubados a 35°C. Alíquotas de 100 µL foram coletadas em 0, 6, 12, 24 e 48 horas, e diluídas em uma série de 10 (até 10⁻³) com água estéril, a seguir, 10 µL diretamente das soluções de teste e cada diluição foi semeada em placas SDA e incubadas a 35 ° C por 48 horas. Após esse período, as unidades formadoras de colônias foram contadas. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de duas vias, bem como o teste de comparações múltiplas de Bonferroni. P ≤ 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. As análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism versão 5.0.

4.6. Atividade antibiofilme em material de PTFE e PUR

Primeiro, os discos de PTFE e PUR foram imersos em uma solução de 30 mL de água estéril junto com a combinação de PH151 e fluconazol (PH151 a 0,5 µg/mL + fluconazol a 8 µg/mL) e armazenado por 24 horas na geladeira (temperatura em torno de 4°C). Em seguida, o teste de formação do biofilme foi realizado conforme descrito anteriormente e os discos, previamente esterilizados e tratados com a solução teste, foram imersos na suspensão celular por 48 horas, a uma temperatura de 35 ° C, para avaliação da capacidade de formação do biofilme. A confirmação da formação do biofilme ocorreu pela contagem das células do biofilme, por diluição seriada, após a remoção das células aderentes por sonicação. O controle da técnica foi feita com os discos que não haviam sido tratados com a solução antifúngica. A análise estatística foi realizada com ANOVA one-way, bem como o teste de comparações múltiplas de Tukey. P ≤ 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. As análises foram realizadas por meio do software Minitab versão 17.0 (Minitab Inc., State College, PA).

5. ARTIGO

O artigo intitulado “8-Hydroxyquinoline-5-(N-4-chlorophenyl) sulfonamide and fluconazole combination as a preventive strategy against *Candida* biofilm in hemodialysis devices” foi publicado na “Journal of Medical Microbiology”.

O Capítulo 5 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 44 – 67.

da Rocha LF, Pippi B, Joaquim AR, de Andrade SF, Fuentefria AM. 8-hydroxyquinoline-5-(N-4-chlorophenyl) sulfonamide and fluconazole combination as a preventive strategy for *Candida* biofilm in haemodialysis devices. J Med Microbiol. 2021 Jul;70(7). doi: 10.1099/jmm.0.001377. PMID: 34259620.

6. DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho foi abordado o papel do biofilme de *Candida* como causadora de infecções sistêmicas em pacientes com insuficiência renal que necessitam realizar hemodiálise como terapia de substituição renal. Além disso, foi proposta uma estratégia de prevenção a formação de biofilme nos principais dispositivos utilizados nesses pacientes.

O biofilme é uma estrutura complexa de importância clínica, impactando no aumento da mortalidade e custos de hospitalizações, principalmente devido à dificuldade de sua remoção e ao desenvolvimento de candidemia (EPELBAUM; CHASAN, 2017; NETT; ANDES, 2020a; WAN ISMAIL et al., 2020). Quando as células de *Candida* presentes no biofilme maduro se desprendem do material implantado no paciente, ocorre a dispersão para outros sítios que podem culminar em sua chegada na corrente sanguínea, levando ao quadro de candidíase invasiva ou sistêmica (IMBERT; RAMMAERT, 2018). Apesar do manejo da infecção sistêmica normalmente envolver a remoção do implante contaminado, o tratamento da candidemia causado por biofilme ainda é dificultado porque as células que o compõem são naturalmente mais resistentes à maioria dos fármacos antifúngicos utilizados nessa condição clínica, mesmo quando desprendidas da matriz extracelular (SILVA et al., 2017; WUYTS; VAN DIJCK; HOLTAPPELS, 2018).

A problemática relacionada ao biofilme é ainda mais preocupante em se tratando de dispositivos implantados ou endovenosos utilizados a longo prazo. Pacientes hemodialíticos fazem uso constante ou de longa permanência de enxerto arteriovenoso de PTFE e cateter de poliuretano, respectivamente, quando a construção de FAV não é possível (AGARWAL et al., 2019; CAMINS, 2013). Considerando que no Brasil há um atraso na construção das FAV, o número de pacientes em uso de cateter venoso central acompanham o aumento no risco de desenvolvimento de infecção (ANDREOTTI et al., 2016). O tipo de superfície é um dos fatores que contribuem para a formação de biofilme, além do tempo de uso e manipulação incorreta (IMBERT; RAMMAERT, 2018; RUPP; KARNATAK, 2018).

Nesse trabalho, então, foi avaliada e quantificada a capacidade de formação de biofilme das espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* em superfícies dos materiais poliuretano e polietrafluoretileno, materiais componentes de cateteres e fístulas protéticas, respectivamente. Foi observado que houve maior formação de biofilme das espécies de *Candida* em poliuretano do que em PTFE, já que dos nove isolados utilizados neste experimento, cinco resultaram em maiores contagens de colônias provenientes dos discos de poliuretano e apenas um isolado, o isolado CTRL 15, formou mais biofilme nos discos de PTFE. Esse resultado, além de outros fatores, como as próprias características dos dispositivos e tempo de permanência deles, pode explicar o fato de que mais infecções causadas por biofilme microbiano estão relacionadas a cateter do que a fístulas protéticas (COENTRÃO et al., 2012; FARRINGTON; ALLON, 2019; MARTIN et al., 2020).

No Brasil e América Latina, *C. parapsilosis* configura uma das principais espécies isoladas do sangue de pacientes internados em UTI em uso de cateteres e neonatos. Em alguns países latino-americanos, a prevalência dessa espécie supera a de *C. albicans*, como Venezuela e Colômbia (ANTINORI et al., 2016; TÓTH et al., 2019). Curiosamente, entretanto, *C. parapsilosis* foi a única espécie cujos isolados não demonstraram habilidade de formar biofilme na superfície dos materiais de poliuretano e PTFE nos ensaios de formação de biofilme. Nossa hipótese é a de que, apesar de essa espécie ser comumente encontrada na microbiota da pele humana, e então mais relacionada à contaminação dos dispositivos hospitalares, a capacidade de manutenção do biofilme seja inferior à de outras espécies, já que sua estrutura de biofilme é a mais fina e compacta entre as espécies de *Candida* de interesse clínico (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; SILVA et al., 2017). Apesar disso, podemos observar através dos ensaios de formação de biofilme, que as outras espécies de *Candida* utilizadas nesse ensaio estão em consonância com a epidemiologia clínica, principalmente em se tratando do poliuretano, onde *C. glabrata* formou mais biofilme, seguida de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Apesar de *C. albicans* permanecer como a espécie de *Candida* mais isolada em ambientes hospitalares, *C. glabrata* é a espécie não-*albicans* de maior prevalência mundial (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; GABALDÓN; GÓMEZ-MOLERO; BADER, 2019).

As soluções antimicrobianas de bloqueio nos dispositivos médicos fazem parte de medidas profiláticas e de tratamento local contra microrganismos oportunistas. Ao impregnar o lúmen de um cateter com essa solução de bloqueio, que pode ser antibiótica ou não-antibiótica reduz-se a incidência de infecções relacionadas a cateter de hemodiálise (ARECHABALA et al., 2018). Além disso, a inibição da formação de biofilme microbiano, como tratamento preventivo, poupa a retirada do dispositivo do paciente. Essa é uma medida importante principalmente para os pacientes hemodialíticos porque estes permanecem com a fistula protética ou cateter constantemente ou por longos períodos (AGARWAL et al., 2019; ALLON et al., 2018). Soluções contendo antimicrobianos como vancomicina, amicacina, gentamicina, cefazolina têm sido utilizados em ensaios clínicos de avaliação de eficácia antibiofilme bacteriano (ACCESS, 2016; ARECHABALA et al., 2018). Pesquisas envolvendo terapia de bloqueio com soluções antifúngicas, por outro lado, são mais escassas e experiências clínicas relatadas na literatura demonstram limitadas e não padronizadas técnicas de preparo e escolha de antifúngicos para o manejo de candidemia associada ao cateter. Dentre os antifúngicos de escolha para a terapia de bloqueio a cateter, anfotericina B tem sido o mais utilizado, mas seu uso deve ter cautela devido às inúmeras incompatibilidades (BEN-AMI, 2018; PAUL DIMONDI et al., 2014a).

Considerando a falta de protocolos clínicos, a toxicidade e instabilidade de certos fármacos antifúngicos, como a anfotericina B e o perfil de resistência de cepas de *Candida*, a busca e pesquisa por novas alternativas que impeçam a formação de biofilme, disseminação sanguínea e preserve o dispositivo implantado no paciente hemodialítico é necessária para melhorar a qualidade de vida desses pacientes e diminuir custos de reinternações e procedimentos adicionais. Neste trabalho, observamos resultados motivadores e promissores envolvendo uma combinação de uma molécula sintética e um fármaco antifúngico comercial: PH151 e fluconazol. Ao avaliarmos a combinação sinérgica com atividade antibiofilme, observamos a prevenção da formação de biofilme em mais de 50% em poliuretano com baixa dosagem sinérgica. A proteção contra a formação de biofilme em PTFE se demonstrou pela inibição em 32,79% da formação de biofilme comparada ao controle, o que pode ser explicado, em parte pelo fato de que o material que compõe o dispositivo também é um fator a ser considerado

para evitar a formação de biofilme de *Candida* e microbiano de modo geral.

A terapia sinérgica se apresenta como uma estratégia de combate à resistência fúngica aos antifúngicos comerciais comumente usados nas infecções causadas por espécies de *Candida*, já que a falha terapêutica, muitas vezes atrelada ao perfil mais resistente das células sésseis desprendidas do biofilme, é uma problemática que impacta no aumento da morbi-mortalidade e dos custos consequentes do prolongamento de internações (FUENTEFRÍA et al., 2018). Por isso, ao avaliarmos o potencial sinérgico da terapia de interesse, utilizamos células provenientes de biofilme, previamente formado em PTFE, o que mimetizaria as circunstâncias clínicas, onde as células de *Candida* se desprendem do biofilme formado no dispositivo implantado no paciente e se disseminam podendo atingir a corrente sanguínea. Combinações sinérgicas têm sido utilizadas na terapia clínica farmacológica contra infecções sistêmicas. A terapia combinada de anfotericina B e flucitosina é indicada para o tratamento de aspergilose, criptococose e, em alguns casos, candidíase sistêmica (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020). Caspofungina associada a voriconazol também é utilizado para melhores resultados contra infecção causada por *Aspergillus* sp. (BELLMANN; SMUSZKIEWICZ, 2017). Quanto ao tratamento local antibiofilme, deve-se levar em conta o potencial de inibição da adesão microbiana à superfície; interferência no desenvolvimento do biofilme; e desagregação da matriz extracelular que compõe o biofilme (FRANCOLINI; DONELLI, 2010). A terapia combinada tem como vantagens, através de diferentes mecanismos de ação e/alvo das substâncias envolvidas, o aumento do espectro e potência da atividade antifúngica; menor dosagem, podendo prevenir efeitos tóxicos decorrentes da dose usual em determinadas condições clínicas; e redução do risco de desenvolvimento de resistência fúngica (BINK, 2011; FRANCOLINI; DONELLI, 2010; FUENTEFRÍA et al., 2018).

Os derivados de 8-hidroxiquinolina vêm sendo estudados pelo nosso grupo de pesquisa com resultados promissores de atividade antibiofilme de *Candida* utilizando o clioquinol em dispositivos intrauterinos (PIPPI, Bruna et al., 2018). Recentemente demonstramos que o clioquinol em uma combinação tripla sinérgica com ciclopirox e terbinafina foi eficaz contra células planctônicas dos

dermatófitos *N. gypsea*, *M. canis*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* (COSTA et al., 2020). Nesse trabalho, corroboramos o potencial antifúngico desses compostos através do ensaio de avaliação da susceptibilidade das células planctônicas e das sésseis e o composto PH151 se destacou por mostrar boa atividade antifúngica contra células de biofilme, com valores de MIC entre 1 e 4 µg/mL. Assim, com resultados prévios motivadores, nesse trabalho avaliamos combinações entre fármacos comerciais e os derivados de 8-hidroxiquinolina clioquinol e PH15. No entanto, o clioquinol em associação não demonstrou resultados tão promissores para biofilme de *Candida* quanto contra os dermatófitos do estudo pévio. Em vez disso, observamos que a combinação de PH151 + fluconazol se mostrou sinérgica para 77.8% dos isolados, resultado superior às outras combinações.

Através do ensaio de tempo de morte, a combinação PH151 (0.5 µg/mL) + fluconazol (8 µg/mL) possibilitou melhora na atividade antifúngica contra a cepa CT RL15, com resultado estatisticamente superior comparado com os antifúngicos sozinhos na mesma concentração, exceto para PH151 na concentração 4 µg/mL, em que não houve diferença estatística. Nesse caso, o benefício da associação sinérgica se dá por possibilitar o mesmo resultado utilizando menores doses dos compostos, com perfil fungistático de tempo e concentração dependentes na morte fúngica. Tais resultados confirmam o sinergismo observado e sustentam a hipótese já confirmada por estudos anteriores do grupo, em que foi demonstrado que o PH151 age na parede celular (PIPPI, B. et al., 2020a). É sabido que o fluconazol deve ser internalizado na célula fúngica para agir na parede celular através da inibição da formação de ergosterol (BERSANI et al., 2019; MCCARTY; PAPPAS, 2016). Sendo assim, é provável que o sinergismo entre as duas substâncias se dê com o PH151 agindo como um facilitador para a penetração do fluconazol na célula fúngica. Além disso, PH151 age também inibindo a formação de pseudohifas, o que contribuiria e explicaria a ação antibiofilme dessa molécula (PIPPI, et al., 2020b). Outro benefício da associação em estudo foi pela baixa dosagem dos compostos em relação a alguns estudos de investigação de compostos sinérgicos contra biofilme de *Candida*. Obtivemos atividade antibiofilme ainda na escala de µg, contrapondo resultados de associações antibiofilme de *Candida* como doxiciclina

(1–64 mg/mL) com fluconazol 64–512 mg/mL (GAO et al., 2013); caspofungina 2 mg/L com micafungina 5 mg/L (CATEAU; RODIER; IMBERT, 2008); e o alcalóide palmatina (8-256 µg/mL) com fluconazol (64-256 µg/mL) (WANG et al., 2018).

A prevenção da formação de biofilme de *Candida* em cateter e fístulas protéticas utilizadas pelos pacientes em hemodiálise causa impacto positivo na vida desses indivíduos por minimizar o risco de infecção disseminada e a retirada desses implantes (AGARWAL et al., 2019; ALLON et al., 2018). Nesse trabalho, uma alternativa antibiofilme foi desenvolvida de modo que o dispositivo implantado seja preservado utilizando a combinação de uma molécula promissora (PH151) com um antifúngico comercial (fluconazol), e essa estratégia impediu a formação de biofilme nas superfícies de PUR em mais de 50%.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados, pode-se inferir que:

- ✓ As espécies de *C. albicans* (CA 01, CA 02, CA DEB23), *C. tropicalis* (ATCC750, CT 72A, CT RL15) e *C. glabrata* (CG DEN08, CG RL37m, CG RL106) tiveram habilidade de formar biofilme em poliuretano e em PTFE. Nenhuma espécie de *C. parapsilosis* (CP RL112, ATCC22019, CP RL32) formou biofilme nos materiais.
- ✓ De modo geral, os derivados de 8-hidroxiquinolina PH151 e clioquinol se confirmaram como agentes com relevante atividade antifúngica tanto para as células planctônicas, quanto para as células de biofilme provenientes dos materiais. O teste de susceptibilidade frente aos antifúngicos comerciais anfotericina B, fluconazol e caspofungina demonstrou um maior perfil de resistência das células sésseis em comparação com as células planctônicas especialmente quando fluconazol é utilizado.
- ✓ Dentre as combinações das moléculas com os antifúngicos comerciais, PH151 e fluconazol mostrou-se a mais promissora por se mostrar uma associação com atividade antifúngica sinérgica contra 77,8% dos isolados avaliados. O efeito fungistático apresentado foi dependente da concentração dos compostos e do tempo de tratamento;
- ✓ A combinação sinérgica PH151 (0.5 µg/mL) + fluconazol (8 µg/mL) preveniu em 50% a formação de biofilme em poliuretano. A proteção contra a formação de biofilme em PTFE se demonstrou pela inibição em 32,79% da formação de biofilme comparada ao controle.
- ✓ Tais resultados corroboram os estudos anteriores que elegeram os derivados 8-hidroxiquinolina, em especial o PH151 como agentes antifúngicos promissores no combate a infecções locais e sistêmicas. O uso de uma combinação sinérgica com fluconazol potencializa essa atividade ao mesmo tempo que possibilita menores doses e maior custo-

benefício para o paciente e para o sistema de saúde, reduzindo o impacto econômico decorrente de episódios de candidemia relacionados a biofilme de *candida* em dispositivos de hemodiálise.

8. PERSPECTIVAS

Com o propósito de buscar alternativas utilizando novos compostos com atividade antibiofilme de *Candida*, o presente trabalho gerou resultados que indicam a eficácia de uma terapia combinada sinérgica utilizando o derivado quinolínico PH151 sobre próteses e cateteres de hemodiálise. Levando em consideração o contexto da problemática apresentada aqui e diante dos resultados deste trabalho e de anteriores a este realizados pelo nosso grupo que comprovam a atividade antifúngica com baixa toxicidade da molécula PH151, temos perspectivas de continuar a investigação sobre a combinação com fluconazol como um tratamento profilático antibiofilme de *Candida*.

Assim, nosso grupo de pesquisa visa realizar mais experimentos, como a microscopia eletrônica de varredura para avaliação do dano causado pela associação sobre o biofilme no cateter. Apesar de a molécula PH151 ter tido sua avaliação toxicológica previamente testada com bons resultados, consideramos importante a avaliação de toxicidade *in vitro* e *in vivo* do potencial irritativo da combinação, visto que o dispositivo implantado ficará em contato com a pele do paciente por longos períodos. Pretendemos ainda dar continuidade na análise de mecanismo de ação, tanto do PH151, quanto da combinação eleita aqui.

Por fim, com os resultados das pesquisas propostas corroborando os resultados prévios, temos o intuito de desenvolver, no futuro, um filme de quitosana com os compostos ligados quimicamente com finalidade de revestimento do dispositivo.

9. REFERÊNCIAS

ACCESS, C. V. Antibiotic Lock Therapy for Catheter Related Blood Stream Infections. **Children's Health Queensland Hospital and Health Service**, v. 2, p. 1–9, 2016.

AGARWAL, A. K. et al. Innovations in vascular access for hemodialysis. **Kidney International**, v. 95, n. 5, p. 1053–1063, maio 2019.

ALIM, D.; SIRCAIK, S.; PANWAR, S. L. The significance of lipids to biofilm formation in *Candida albicans*: An emerging perspective. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, 2018.

ALLON, M. et al. Recommended clinical trial end points for dialysis catheters. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 3, p. 495–500, 2018.

ANDREOTTI, R. et al. Hemodialysis With Extended Central Venous Catheter Use. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 33, n. 2, p. 2–5, 2016.

ANTINORI, S. et al. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. **European Journal of Internal Medicine**, v. 34, p. 21–28, 2016.

ARAÚJO, D.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network Genes. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 62–75, 2017.

ARECHABALA, M. C. et al. **Antimicrobial lock solutions for preventing catheter-related infections in haemodialysis. Cochrane Database of Systematic Reviews**. [S.l: s.n.], 2018

BASSETTI, M. et al. Diagnosis and Treatment of Candidemia in the Intensive Care Unit. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 40, n. 4, p. 524–539, 2019.

BELLMANN, R.; SMUSZKIEWICZ, P. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients. **Infection**, v. 45, n. 6, p. 737–779, 2017.

BEN-AMI, R. Treatment of invasive candidiasis: A narrative review. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, 2018.

BERSANI, I. et al. Antifungal drugs for invasive candida infections (ICI) in neonates: Future perspectives. **Frontiers in Pediatrics**, v. 7, n. SEP, p. 1–10, 2019.

BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 312, 2020.

BINK, A. Anti-Biofilm Strategies: How to Eradicate Candida Biofilms? **The Open Mycology Journal**, v. 5, n. 1, p. 29–38, 2011.

BOUZA, E.; GUINEA, J.; GUEMBE, M. The role of antifungals against Candida biofilm in catheter-related candidemia. **Antibiotics**, v. 4, n. 1, p. 1–17, 2014.

BUGGS, J. et al. Effective arteriovenous fistula alternative for hemodialysis access. **American Journal of Surgery**, v. 216, n. 6, p. 1144–1147, 2018.

CAMINS, B. C. Prevention and treatment of hemodialysis-related bloodstream infections. **Seminars in Dialysis**, v. 26, n. 4, p. 476–481, 2013.

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

CATEAU, E.; RODIER, M. associées aux cathéters Quelle place pour. v. 28, p. 740–745, 2012.

CATEAU, E.; RODIER, M. H.; IMBERT, C. In vitro efficacies of caspofungin or micafungin catheter lock solutions on *Candida albicans* biofilm growth. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 1, p. 153–155, 2008.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. Candida Biofilms: Threats, challenges, and promising

strategies. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. FEB, p. 1–15, 2018.

CHARETTE, R. S.; MELNIC, C. M. Two-Stage Revision Arthroplasty for the Treatment of Prosthetic Joint Infection. **Current Reviews in Musculoskeletal Medicine**, v. 11, n. 3, p. 332–340, 2018.

CHATELON, J. et al. Choosing the Right Antifungal Agent in ICU Patients. **Advances in Therapy**, v. 36, n. 12, p. 3308–3320, 2019.

CHERDTRAKULKIAT, R.; BOONPANGRAK, S.; SINTHUPOOM, N. Derivatives (halogen , nitro and amino) of 8-hydroxyquinoline with highly potent antimicrobial and antioxidant activities. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 6, p. 135–141, 2016.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Diagnosing invasive candidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1–26, 2018.

COBRADO, L. et al. Anti-Candida activity of antimicrobial impregnated central venous catheters. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 1–7, 2017.

COENTRÃO, L. et al. Effects of starting hemodialysis with an arteriovenous fistula or central venous catheter compared with peritoneal dialysis: A retrospective cohort study. **BMC Nephrology**, v. 13, n. 1, 2012.

COSTA, B. et al. In vitro antidermatophytic synergism of double and triple combination of clioquinol with ciclopirox and terbinafine. **Mycoses**, p. myc.13127, 7 jul. 2020.

DAS NEVES, M. A. et al. Avaliação da perviedade precoce das fístulas arteriovenosas para hemodiálise. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 10, n. 2, p. 105–109, 2011.

DEVAUX, C. A. et al. New insights on the antiviral effects of chloroquine against coronavirus: what to expect for COVID-19? **International Journal of Antimicrobial Agents**, p. 105938, 12 mar. 2020.

ENOCH, D. A. et al. The changing epidemiology of invasive fungal infections. **Methods Mol. Biol.** [S.I.]: Humana Press Inc., 2017. v. 1508. p. 17–65.

EPELBAUM, O.; CHASAN, R. Candidemia in the Intensive Care Unit. **Clinics in Chest Medicine**, v. 38, n. 3, p. 493–509, 2017.

FARRINGTON, C. A.; ALLON, M. Management of the hemodialysis patient with catheter-related bloodstream infection. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 4, p. 611–613, 2019.

FIDEL, P. L. et al. Applying the Host-Microbe Damage Response Framework to Candida Pathogenesis: Current and Prospective Strategies to Reduce Damage. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 35, 2020.

FISHER, M. et al. Prevention of Bloodstream Infections in Patients Undergoing Hemodialysis. v. 2, 2020.

FORASTIERO, A. et al. Candida tropicalis antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4769–4781, 2013.

FRANCOLINI, I.; DONELLI, G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 227–238, 2010.

FUENTEFRÍA, A. M. et al. **Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance.** **Letters in Applied Microbiology**. [S.I.]: Blackwell Publishing Ltd. , 1 jan. 2018

GABALDÓN, T.; GÓMEZ-MOLERO, E.; BADER, O. Molecular Typing of Candida glabrata. **Mycopathologia**, v. 0123456789, 2019.

GALOCHA, M. et al. Divergent approaches to virulence in *C. Albicans* and *C. Glabrata*: Two sides of the same coin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2019.

GAO, Y. et al. Synergistic effect of doxycycline and fluconazole against *Candida albicans* biofilms and the impact of calcium channel blockers. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 5, p. 453–462, 2013.

GONÇALVES, S. S. et al. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. **Mycoses**, v. 59, n. 4, p. 198–219, 2016.

HUANG, H. L. et al. Arteriovenous graft infection caused by *Candida glabrata*: A case report and literature review. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 49, n. 2, p. 300–304, 2016.

IMBERT, C.; RAMMAERT, B. What could be the role of antifungal lock-solutions? From bench to bedside. **Pathogens**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2018.

ÍÑIGO, M.; POZO, J. L. Del. Practical approach by type of pathogens Fungal biofilms : From bench to bedside. **Revista Espanola De Quimioterapia**, v. 31, n. suppl 1, p. 35–38, 2018.

JADLOWIEC, C. C. et al. Hemodialysis Access in the Elderly: Outcomes among Patients Older than Seventy. **Annals of Vascular Surgery**, v. 31, p. 77–84, 2016.

JANUM, S.; AFSHARI, Central venous catheter (CVC) removal for patients of all ages with candidaemia. **Cochrane Database Syst Rev**. v 11;7(7) , 2016

JOAQUIM, A. R. et al. Rapid tools to gain insights into the interaction dynamics of new 8-hydroxyquinolines with few fungal lines. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 93, n. 6, p. 1186–1196, 2019.

KADOSH, D. Regulatory mechanisms controlling morphology and pathogenesis in *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 27–34, 2019.

KADOSH, D.; MUNDODI, V. A re-evaluation of the relationship between morphology and pathogenicity in *Candida* species. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 16–18, 2020.

KATRAGKOU, A.; ROILIDES, E.; WALSH, T. J. Role of Echinocandins in Fungal Biofilm-Related Disease: Vascular Catheter-Related Infections, Immunomodulation, and Mucosal Surfaces. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. Suppl 6, p. S622–S629, 2015.

KAUR, H.; CHAKRABARTI, A. Strategies to reduce mortality in adult and neonatal candidemia in developing countries. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 3, 2017.

KEANE, S. et al. Systematic review on the first line treatment of amphotericin B in critically ill adults with candidemia or invasive candidiasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 16, n. 11, p. 839–847, 2018.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. *Candida* Infections of Medical Devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 255–267, 2004.

KUMAR, K. et al. *Candida glabrata*: A lot more than meets the eye. **Microorganisms**, v. 7, n. 2, p. 1–22, 2019.

KUMAR, P. **A review on quinoline derivatives as anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) agents.** **BMC Chemistry**. [S.I.]: Springer International Publishing.

LI, W. S. et al. The impact of biofilm formation on the persistence of candidemia. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUN, p. 1–10, 2018.

MARTIN, K. et al. Clinical Outcomes and Risk Factors for Tunneled Hemodialysis Catheter-Related Bloodstream Infections. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 19–22, 2020.

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 103–124, 2016.

MIN KIM, S. et al. How to treat arteriovenous graft infection: total versus partial graft excision. **Journal of Vascular Access**, v. 19, n. 2, p. 125–130, 2018.

MUREA, M. et al. Vascular access for hemodialysis: A perpetual challenge. **Seminars in Dialysis**, v. 32, n. 6, p. 527–534, 2019.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Contributions of the biofilm matrix to candida pathogenesis. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 33–38, 2020a.

NUCCI, M. et al. Early Removal of Central Venous Catheter in Patients with Candidemia Does Not Improve Outcome: Analysis of 842 Patients from 2 Randomized Clinical Trials. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 3, p. 295–303, ago. 2010.

NUCCI, M. et al . Recomendaciones para el manejo de la candidemia en adultos en América Latina. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, n. 3, p. 179–188, 2013.

PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. May, p. 1–20, 2018.

PATEL, T. S.; CARVER, P. L.; ESCHENAUER, G. A. Are in vitro susceptibilities to azole antifungals predictive of clinical outcome in the treatment of candidemia? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1–10, 2018.

PAUL DIMONDI, V. et al. Antifungal catheter lock therapy for the management of a persistent *Candida albicans* bloodstream infection in an adult receiving hemodialysis. **Pharmacotherapy**, v. 34, n. 7, 2014a.

PAUL DIMONDI, V. et al. Antifungal Catheter Lock Therapy for the Management of a Persistent *Candida albicans* Bloodstream Infection in an Adult Receiving Hemodialysis. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 34, n. 7, p. e120–e127, jul. 2014b.

PELLON, A.; SADEGHI NASAB, S. D.; MOYES, D. L. New Insights in *Candida*

albicans Innate Immunity at the Mucosa: Toxins, Epithelium, Metabolism, and Beyond. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. March, p. 81, 2020.

PEREZ, D. R.; SKLAR, L. A.; CHIGAEV, A. **Clioquinol: To harm or heal. Pharmacology and Therapeutics.** [

PIPPI, B. et al. 8-Hydroxyquinoline-5-sulfonamides are promising antifungal candidates for the topical treatment of dermatomycosis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 4, p. 1038–1049, 1 abr. 2020a.

PIPPI, B; JOAQUIM, A; LOPES, W et al. 8-Hydroxyquinoline-5-sulfonamides are promising antifungal candidates for the topical treatment of dermatomycosis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 4, p. 1038–1049, 1 abr. 2020b.

PIPPI, B et al. Clioquinol is a promising preventive morphological switching compound in the treatment of Candida infections linked to the use of intrauterine devices. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 1655–1663, 2018.

PIPPI, B et al. Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Hits for Antifungal Drug Design. **Medical Mycology**, v. 55, n. 7, p. 763–773, 2017.

PITARCH, A.; NOMBELA, C.; GIL, C. Diagnosis of Invasive Candidiasis: From Gold Standard Methods to Promising Leading-edge Technologies. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 16, p. 1375–1392, 2018.

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. **Candida survival strategies.** [S.l.]: Elsevier Ltd, 2015. v. 91.

PRACHAYASITTIKUL, V. et al. **8-Hydroxyquinolines: A review of their metal chelating properties and medicinal applications.** **Drug Design, Development and Therapy.** [S.l.: s.n.], 2013

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p.

792–798, 2019.

QURESHI, A. L.; ABID, K. Frequency of catheter related infections in haemodialysed uraemic patients. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 60, n. 8, p. 671–675, 2010.

RAMANATHAN, V. et al. Characteristics of biofilm on tunneled cuffed hemodialysis catheters in the presence and absence of clinical infection. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 60, n. 6, p. 976–982, 2012.

RUPP, M. E.; KARNATAK, R. **Intravascular Catheter–Related Bloodstream Infections. Infectious Disease Clinics of North America**. [S.l.]: W.B. Saunders.

SAMPSON, E. L.; JENAGARATNAM, L.; MCSHANE, R. **Metal protein attenuating compounds for the treatment of Alzheimer’s dementia. Cochrane Database of Systematic Reviews**. [S.l.: s.n.], 2014

SILVA, S. et al. Candida species biofilms’ antifungal resistance. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, 2017.

SINGH, A. K. et al. Chloroquine and hydroxychloroquine in the treatment of COVID-19 with or without diabetes: A systematic search and a narrative review with a special reference to India and other developing countries. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 14, n. 3, p. 241–246, 1 maio 2020.

SINGH, Y. P. et al. **A review on iron chelators as potential therapeutic agents for the treatment of Alzheimer’s and Parkinson’s diseases. Molecular Diversity**. [S.l.]: Springer International Publishing.

THOMÉ, F. S. et al. Brazilian chronic dialysis survey 2017. **Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia**, v. 41, n. 2, p. 208–214, 1 abr. 2019.

TIMMERMANS, B. et al. Adhesins in candida glabrata. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 1–16, 2018.

TÓTH, R. et al. Candida parapsilosis: From genes to the bedside. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 1–38, 2019.

TOURET, F.; DE LAMBALLERIE, X. **Of chloroquine and COVID-19. Antiviral Research**. [S.l.]: Elsevier B.V. , 1 maio 2020

VASILEIOU, E. et al. Invasive candidiasis and candidemia in pediatric and neonatal patients: A review of current guidelines. **Current Medical Mycology**, v. 4, n. 3, p. 28–33, 2018.

VON EIFF, C. et al. Infections associated with medical devices: Pathogenesis, management and prophylaxis. **Drugs**, v. 65, n. 2, p. 179–214, 2005.

WALL, G. et al. Candida albicans biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 1–6, 2019.

WAN ISMAIL, W. N. A. et al. The Economic Burden of Candidemia and Invasive Candidiasis: A Systematic Review. **Value in Health Regional Issues**, v. 21, p. 53–58, 2020.

WANG, T. et al. Strong Synergism of Palmatine and Fluconazole/Itraconazole Against Planktonic and Biofilm Cells of Candida Species and Efflux-Associated Antifungal Mechanism. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. December, p. 1–12, 2018.

WHALEY, S. G. et al. Azole antifungal resistance in Candida albicans and emerging non-albicans Candida Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JAN, p. 1–12, 2017.

WUYTS, J.; VAN DIJCK, P.; HOLTAPPELS, M. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 10, p. 1–14, 2018.

ZUZA-ALVES, D. L.; SILVA-ROCHA, W. P.; CHAVES, G. M. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 1–25, 2017.