

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONDIÇÕES DE VIDA E SITUAÇÕES
DE SAÚDE NA AMAZÔNIA
(PPGVIDA)**

BRUNA SANTANA GOMES

**LEVEDURAS DE INTERESSE DA SAÚDE PÚBLICA DA COLEÇÃO CFAM
ILMD/FIOCRUZ AMAZÔNIA: SENSIBILIDADE A ANIDULAFUNGINA,
RESISTÊNCIA A FAGOCITOSE E FORMAÇÃO DE BIOFILME**

BRUNA SANTANA GOMES

**LEVEDURAS DE INTERESSE DA SAÚDE PÚBLICA DA COLEÇÃO CFAM
ILMD/FIOCRUZ AMAZÔNIA: SENSIBILIDADE A ANIDULAFUNGINA,
RESISTÊNCIA A FAGOCITOSE E FORMAÇÃO DE BIOFILME**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Orientadora: Profa. Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura

Manaus - AM
2023

FICHA CATALOGRÁFICA

G633I

Gomes, Bruna Santana

Leveduras de interesse da Saúde Pública da coleção CFAM ILMD/ Fiocruz Amazônia: sensibilidade a anidulafungina, resistência a fagocitose e formação de biofilme / Bruna Santana Gomes. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2023.

71 f.

Dissertação (Mestrado em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2023.

Orientadora: Profª. Drª. Ani Beatriz Jackisch Matsuura.

1. Fungo-boca. 2. Candida. 3. Fagocitose. 4. Biofilme I. Título.

CDD 579.5 22. ed.

CDU 616.934:614.21(043.3)

Elaborado por Débora da Silva Rocha – Bibliotecária CRB-11 N° 1223

Bruna Santana Gomes

Leveduras de interesse da saúde pública da coleção CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia:
sensibilidade a anidulafungina, resistência a fagocitose e formação de biofilme

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Aprovada em: 30 de agosto de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Orientadora: Profa. Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura
ILMD/FIOCRUZ

Profa. Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes
ILMD/FIOCRUZ

Profa. Dra. Shirley Maria de Araújo Passo
Universidade do Estado do Amazonas - UEA

Dedico este trabalho a minha família. Pessoas que sempre me incentivaram e apoiaram durante a minha caminhada acadêmica, além de terem me ensinado desde a infância que é o estudo que abre os caminhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por me permitir concluir esta pesquisa, através de todo amor, cuidado e proteção concedidos a mim;

À minha mãe, pai e irmão; por todo amor, apoio e incentivo que me deram ao longo de toda a minha vida acadêmica e profissional. Sem vocês eu não teria conseguido;

À professora Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura, não apenas pela orientação desta pesquisa e por ter me ensinado tanto deste tema; mas também pelo modo como o fez, com compreensão, afeto e ética. Além de toda força e apoio repassados quando os caminhos não estavam trilhando da melhor maneira;

À Dra. Marla Jalene Alves e a equipe do laboratório DMAIS, por toda ajuda, orientação e companheirismo ao longo da fase laboratorial. Sua ajuda foi muito importante para a realização desta pesquisa.

Ao professor Dr. Takeshi Matsuura, professor da Universidade Federal do Amazonas, pelas orientações, ajuda e pelo seu tempo empregado na fase do ensaio de resistência a fagocitose;

Ao Professor Dr. Yury Oliveira Chaves da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Amazônia por ter cedido a linhagem celular de leucemia monocítica humana (THP-1) utilizada nesta pesquisa e Elizângela Farias pela ajuda com os preparos das placas com os THP-1 diferenciados;

À professora Dra. Maria Ivone Lopes, professora da Universidade Federal do Amazonas, pela orientação durante o período de estágio docência;

Ao professor e estatístico Antônio Balieiro, pela contribuição nesta pesquisa através da realização dos testes estatísticos;

Aos professores do Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD, por todo o conhecimento recebido e estimulado ao longo deste curso, com certeza eles fizeram grande diferença no meu modo de ver a saúde pública;

Ao ILMD / FIOCRUZ Amazônia e ao Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia – PPGVIDA, juntamente com seus funcionários. Agradeço a oportunidade de ter feito parte dessa instituição importante e renomada, através do curso Mestrado em Saúde Pública;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM, pelo investimento concedido a essa pesquisa.

“Sede fortes e corajosos; não temais, nem vos espanteis diante deles; porque o Senhor teu Deus é o que vai contigo; não te deixará nem te desampará.”

Deuteronômio 31:6

RESUMO

Fungos na cavidade oral estão geralmente presentes no ser humano na forma comensal, mas podem vir a estabelecer uma infecção. Sabe-se que não depende somente das condições de saúde do paciente, mas que as leveduras participam ativamente desse processo através de mecanismos que são chamados de fatores de virulência. Neste estudo leveduras pertencentes a Coleção CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia provenientes da cavidade oral, foram caracterizadas quanto à formação de biofilme, a susceptibilidade à anidulafungina e resistência à fagocitose. Para a avaliação do biofilme, células foram inoculadas (1 alçada de 10 μ L) em um tubo Falcon contendo 10mL de caldo Sabouraud com glicose a 8% e incubados a 35°C durante 24h. As suspensões foram vertidas, lavadas e coradas com solução a 1% de safranina e então examinados e classificados como negativo (N), positivo forte (PFo), positivo moderado (PM) e positivo fraco (Pfr). Para o teste de susceptibilidade à anidulafungina, foi utilizado Etest seguindo as recomendações do fabricante. Foram testadas 37 leveduras sendo 15 *C. glabrata*, 7 *C. parapsilosis*, 4 *C. tropicalis*, 3 *C. albicans* e 1 *C. metapsilosis*; além de 3 *Kodamaea ohmeri*, 2 *Meyerozyma guilliermondii*, 1 *Meyerozyma caribbica* e 1 *Saccharomyces cerevisiae*. Para o teste de resistência à fagocitose foram utilizadas células THP-1 ativadas (macrófagos) e as 10 cepas que mais se destacaram na formação do biofilme e na falta de sensibilidade ao antifúngico. Houve formação de biofilme por todas as cepas, sendo a *C. tropicalis* (4/4) e *K. ohmeri* (3/3) as mais expressivas com todas suas cepas apresentando resultado PFo. A *C. glabrata* apresentou 6/15 PFo e *C. parapsilosis* apresentou 5/7 cepas PFo. A espécie *M. guilliermondii* apresentou 1/2 cepa PFo. A maioria das leveduras foram sensíveis ao antifúngico com MICs \leq 2 μ g/mL, com exceção de 3 cepas: 1 *C. parapsilosis*, 1 *M. guilliermondii* e 1 *K. ohmeri*. As cepas de *K. ohmeri* também apresentaram as menores médias de células fagocitadas e estatisticamente apresentaram uma resistência à fagocitose semelhante as cepas de espécies comumente envolvidas em fungemia. Apesar da anidulafungina ser um antifúngico de última geração os resultados mostraram cepas com falta de sensibilidade, dessa forma indicando que há a necessidade de avaliação dos antifúngicos para ter a melhor estratégia de tratamento. Portanto, as cepas estudadas são fungos oportunistas que apresentam características de virulência com potencial para a colonização de dispositivos invasivos e merecem atenção, especialmente as cepas de espécies de leveduras consideradas emergentes.

Palavras-chave: Fungo-boca; Candida; Fagocitose; Biofilme.

ABSTRACT

Fungi in the oral cavity are usually present in humans in the commensal form, however they can come to establish an infection. It is known that it does not depend only on the patient's health conditions, but that yeasts actively participate in this process through mechanisms which are called virulence factors. In this study, yeasts from the oral cavity, which belong to the Collection CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia, were characterized in terms of biofilm formation, susceptibility to anidulafungin and resistance to phagocytosis. For the biofilm evaluation, cells were inoculated (1 loop of 10uL) in a Falcon tube containing 10mL of Sabouraud broth with 8% glucose and incubated at 35°C for 24h. The suspensions were poured, washed and stained with 1% safranin solution and then examined and classified as negative (N), strong positive (PFo), moderate positive (PM) and weak positive (Pfr). In order to test the anidulafungin susceptibility, Etest was used following the producer's recommendations. 37 yeasts were tested, being 15 *C. glabrata*, 7 *C. parapsilosis*, 4 *C. tropicalis*, 3 *C. albicans*, 1 *C. metapsilosis*; 3 *Kodamaea ohmeri*, 2 *Meyerozyma guilliermondii*, 1 *Meyerozyma caribbica* and 1 *Saccharomyces cerevisiae*. For the phagocytosis resistance test, activated THP-1 cells (macrophages) and the 10 strains that stood out the most in the biofilm formation and in lack of sensitivity to the antifungal were used. There was biofilm formation by all strains, with *C. tropicalis* and *K. ohmeri* being the most expressive, where all of their strains presented a PFo result. Each of the *C. glabrata* presented 6 PFo strains and *C. parapsilosis* presented 5 PFo strains. The *M. guilliermondii* species presented 1 PFo strain. Most yeasts were sensitive to the antifungal with MICs $\leq 2 \mu\text{g/mL}$, except for 3 strains: 1 *C. parapsilosis*, 1 *M. guilliermondii* and 1 *K. ohmeri*. The *K. ohmeri* strains showed the lowest averages of phagocytized cells and statistically showed a resistance to phagocytosis similar to strains of species commonly involved in fungemia. Although anidulafungin is the first-line therapeutic antifungal option, the results have shown strains with a lack of sensitivity, thus indicating that there is the necessity to evaluate the antifungal agents in order to have the best treatment strategy. Therefore, the studied strains are opportunistic fungi that present virulence characteristics with potential for colonization of invasive devices and deserve attention, especially the strains of yeast species considered emergent.

Keywords: Mouth-fungus; Candida; Phagocytosis; Biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Células de leveduras pertencentes a Coleção CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia aderidas (A) e no interior dos macrófagos (inseridas) (B) (400x) 61

Figura 2 – Blastosporos de *Candida* da Coleção CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia emitindo tubos germinativos no interior ou aderidas a células fagocíticas (400x) 61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01** – Leveduras pertencentes a Coleção CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia identificadas em nível de espécie por sequenciamento da região ITS..... 48
- Tabela 2** – Produção de biofilme das leveduras pertencentes a Coleção CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia..... 49
- Tabela 3** – Produção de biofilme segundo o gênero e espécie das leveduras pertencentes a Coleção CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia 51
- Tabela 4** – Resultado do teste de sensibilidade à anidulafungina por leveduras pertencentes a Coleção CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia..... 55
- Tabela 5** – Resultado do teste de sensibilidade à anidulafungina por espécie de leveduras pertencentes a Coleção CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia..... 56
- Tabela 6** – Média de células fagocitadas por 100 macrófagos THP-1 das leveduras pertencentes a Coleção CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia..... 60

LISTA DE ABREVIATURAS

AM – Amazonas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - American Type Culture Collection (Coleção Americana de Cultura-tipo)

C. albicans – *Candida albicans*

C. glabrata – *Candida glabrata*

C. guilliermondii – *Candida guilliermondii*

C. krusei – *Candida krusei*

C. metapsilosis - *Candida metapsilosis*

C. parapsilosis – *Candida parapsilosis*

C. tropicalis – *Candida tropicalis*

CFAM – Coleção de Fungos do Amazonas

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais)

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfato

FAPEAM - Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

HIV – Human Immuno-Deficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)

ILMD - Instituto Leônidas e Maria Deane

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

ITS – Internal Transcribed Space (espaço Interno Transcrito)

K. ohmeri – *Kodamaea ohmeri*

LTBM – Laboratório Temático da Biologia Molecular

M. caribbica – *Meyerozyma caribbica*

M. guilliermondii – *Meyerozyma guilliermondii*

mG - Micrograma

MIC - Concentração Inibitória Mínima

mL – Mililitro

mM – Milímetro

nG – Nanograma

pb – Pares de Base

PBS – Phosphate Buffered Saline (Solução Salina Tamponada Com Fosfato)

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PMNS – Neutrófilos Polimorfonucleares

PPGVDA – Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia

RCF – Força centrífuga relativa

RPMI - Instituto Roswell Park Memorial (Meio De Cultura)

S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*

SFB – fetal bovine serum (soro fetal bovino)

UBS – Unidade Básica de Saúde

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

YPD – Yeast Peptone Dextrose (meio de cultura)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Micobiota Oral	18
3.2 O gênero <i>Candida</i> e a cavidade oral	19
3.2.1 <i>Candida albicans</i>	21
3.2.2 <i>Candida</i> não- <i>albicans</i>	22
3.2.3 Produção de biofilme como fator de virulência	24
3.2.4 Infecções orais e candidemia	26
3.2.5 <i>Candida</i> em Idosos	28
3.3 Antifúngicos no tratamento de infecções por <i>Candida</i>	29
3.3.1 Antifúngico Anidulafungina	31
3.4 Fagocitose	31
3.4.1 Células fagocíticas: monócitos, macrófagos e células THP-1	31
3.4.2 Mecanismo da Fagocitose	34
3.4.3 Habilidade de leveduras resistirem a fagocitose.....	35
3.5 Importância das leveduras para a saúde pública	36
4. METODOLOGIA	38
4.1 Cepas de leveduras testadas	38
4.2 Reativação dos isolados clínicos	38
4.3 Identificação molecular	39
4.4 Avaliação do fator de virulência: produção de biofilme	40
4.5 Sensibilidade ao antifúngico anidulafungina	40
4.6 Avaliação da habilidade de leveduras resistirem a fagocitose	41
4.6.1 Obtenção e cultivo de THP-1	41
4.6.2 Diferenciação de THP-1	41
4.6.3 Cultivo e preparo das leveduras	42
4.6.4 Processo de fagocitose.....	42
4.6.5 Leitura	42
4.7 Análise dos dados	43

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Avaliação da produção de biofilme	44
5.2 Sensibilidade à anidulafungina.....	50
5.3. Resistência à fagocitose	55
6. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

A cavidade oral do ser humano possui uma microbiota com comunidade de microrganismos comensais ou patogênicos, sendo considerado o segundo local de maior concentração do corpo humano, estando atrás apenas do intestino (GERMANO *et al.*, 2018). Contudo, microrganismos comensais podem provocar patologias quando ocorrem alterações na composição e tamanho das populações microbianas, devido a mudanças nas condições ambientais ou diminuição da imunidade do hospedeiro (AVILA; OJCIUS; YILMAZ, 2009; GERMANO *et al.*, 2018).

As leveduras, principalmente as do gênero *Candida*, são encontradas com frequência na cavidade oral, mas também são entre os fungos as principais causadoras das infecções hospitalares. Em indivíduos com condições saudáveis, *Candida* convive de forma comensal com o hospedeiro, porém havendo quebra do equilíbrio, como no caso de pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI) que possuem outras comorbidades e/ou falha do seu sistema imunológico, essa levedura passa a causar uma infecção (LI *et al.*, 2018). No entanto, sabe-se que não depende somente das condições de saúde do paciente, mas que as leveduras participam ativamente desse processo através de mecanismos que são chamados de fatores de virulência e nele estão incluídos: a produção de enzimas, a formação de biofilme e a atividade hemolítica; além disso, a *Candida* pode possuir habilidade para resistir a fagocitose de células sanguíneas dos hospedeiros. Esses fatores agindo em associação a baixa imunidade do paciente pode levar a candidemia (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Na região Norte do Brasil a *Candida* é o principal agente de infecção primária em pacientes pediátricos internados em UTI, causando fungemia. Em relação ao Amazonas, estudos em Manaus indicaram que 72,8% dos casos de infecção fúngica invasiva eram em pacientes que tinham até 1 ano de idade. Estudos de tipagem molecular indicaram que essas infecções fúngicas eram de origem endógena e não do ambiente hospitalar ou dos profissionais de saúde (CORRÊA, 2014; PEREIRA, 2015).

As Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde são consideradas pela OMS desde o início dos anos 2000 como um problema de saúde pública e programas de

prevenção e controle tem sido estabelecidos (ANVISA, 2014). Nesse sentido, considerando a alta ocorrência de *Candida* causando infecção fúngica invasiva em Manaus, considerando ainda que o antifúngico anidulafungina foi incorporado no SUS para tratamento de candidíase invasiva em 2022, que é um antifúngico não influenciado pela formação de biofilme e que as infecções fúngicas invasivas ocorrem quando há neutropenia, este trabalho foi proposto. Com este estudo da caracterização de aspectos da virulência de leveduras que estão na cavidade oral de indivíduos do Amazonas e sensibilidade à anidulafungina dados regionais foram gerados que poderão contribuir para a gestão da problemática das infecções fúngicas no estado do Amazonas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar leveduras da CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia isoladas da cavidade oral de idosos da comunidade ribeirinha Lago do Limão, Iranduba - AM quanto à apresentação de fatores de virulência e sensibilidade ao antifúngico da classe das equinocandinas incorporado ao SUS em 2022.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar a produção da formação de biofilme “in vitro” de cepas de leveduras da coleção CFAM;
- Determinar a sensibilidade ao antifúngico anidulafungina de cepas de leveduras da coleção CFAM pelo Etest;
- Avaliar a habilidade de cepas de leveduras da coleção CFAM para resistir à fagocitose com a utilização da linhagem celular THP-1.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Micobiota Oral

Existe na cavidade oral, uma microbiota rica e diversa com mais de 500 espécies de microrganismos, estando os fungos dentre eles. Em uma avaliação da microbiota da boca saudável, realizada em 2010, foi mostrada que a cavidade oral aloja mais de 75 gêneros de fungos diferentes e entre os mais comuns estão: *Candida*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Aspergillus* e *Fusarium* (GHANNOUM; MUKHERJEE, 2013).

Enquanto a *Candida* é encontrada frequentemente na cavidade oral de pessoas saudáveis, outras espécies são encontradas mais raramente e logo ocasionam infecções, como a *Saccharomyces* e *Geotrichum*. Outros fungos também são encontrados mais raramente, como os fungos patogênicos *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum*, assim como os fungos normalmente encontrados no ambiente *Aspergillus*, *Mucor* e *Rhizopus* (CASTANHO, 2015).

Monteiro-da-Silva, Araújo e Sampaio-Maia (2014) também encontraram fungos na cavidade oral de 40 indivíduos saudáveis, sendo que os mais encontrados foram: *Candida* (67,5%), *Rhodotorula* (75%), *Penicillium* (85%), *Aspergillus* (75%), *Cladosporium* (72,5%), *Trichoderma* (10%), *Scedosporium* (7,5%), *Alternaria* (5%) e *Rhizopus* (2,5%).

A evolução e aprimoramento das metodologias na área da genômica para a detecção dos microrganismos tem permitido o aumento do conhecimento da microbiota humana. Na pesquisa realizada por Dupuy e colaboradores (2014) foram identificados os fungos *Candida*, *Pichia*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cryptococcus*, *Aureobasidium* e foi identificado pela primeira vez o fungo *Malassezia* como sendo um fungo comensal da cavidade oral e outros quatro gêneros de fungos que comumente são encontrados em plantas ou no solo, sendo eles: *Irpex*, *Cytospora*, *Lenzites* e *Sporobolomyces*.

A micobiota oral possui uma grande importância na saúde do ser humano, já que uma alteração com a ocorrência de um desequilíbrio pode estar ligada ao

desenvolvimento de doenças orais, principalmente quando acomete indivíduos imunocomprometidos ou que possuem outras complicações de saúde (GHANNOUM; MUKHERJEE, 2013).

3.2 O gênero *Candida* e a cavidade oral

A levedura do gênero *Candida* é um dos principais fatores etimológicos de infecções micóticas da cavidade oral (SIMÕES; FONSECAII; FIGUEIRAL, 2013), sendo assim possui uma considerada importância clínica e científica para a saúde pública.

Normalmente, essa levedura do gênero *Candida* está presente de modo comensal nos seres humanos, sem que prejudique ou interfira na saúde ou bem-estar físico das pessoas, como mostra a pesquisa de Queiroz (2021) que usou um grupo controle com 160 indivíduos saudáveis que eram acompanhantes de pacientes que realizavam radioterapia no hospital da Baleia, em Belo Horizonte. Na pesquisa, foram coletadas amostras da região orofaríngea e identificou-se 41 indivíduos com cultivo positivo para *Candida*, com 47 isolados clínicos de diferentes espécies.

Araújo-Passos (2009) determinou a prevalência de diferentes espécies de *Candida* em pacientes atendidos nas UBS's na cidade de Manaus - AM. Foram coletadas amostras da cavidade oral de 594 pacientes, sendo que 50% dos pacientes apresentaram culturas positivas para *Candida*. A espécie *Candida albicans* foi a mais prevalente seguida pela *Candida. parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr* e *Candida glabrata*. Sendo que, 188 dos pacientes usavam prótese dentária e apresentaram prevalência de *Candida* de 75%. Concluiu-se que a prevalência das espécies de *Candida* tanto em pacientes usuários de prótese como em indivíduos com dentição natural foi semelhante a prevalência encontrada em outras regiões do Brasil e outros países.

Alencar (2017) coletou amostras biológicas do palato e de próteses mucossuportadas de 138 idosos residentes de uma comunidade rural de Iranduba - AM. Posteriormente identificou-se as espécies de *Candida* através das características morfológicas das colônias e do meio cromogênico. Do palato foram coletados 66 isolados, sendo *C. albicans* a espécie mais prevalente (49.07%), além de outras

espécies como *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *Candida* spp. Já das próteses, foram coletados 98, sendo *C. albicans* também a mais prevalente (74,07%), encontrando-se também outras espécies como: *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Em alguns pacientes, tanto no palato, quanto nas próteses foram encontrados mais de uma espécie de levedura.

Em um estudo foi realizado no município de Tefé-AM, com idosos de 65 a 74 anos cadastrados na Atenção Básica, coletou-se material biológico com swab's, em visitas domiciliares, que foram semeados em meio CHROMAgar™*Candida*. A ocorrência das espécies foi determinada por meio da coloração e morfologia das colônias. A prevalência de candidíase oral foi encontrada em 20,7% dos idosos. Sendo *C. albicans*: 54.8% (125) e *Candida* não-*albicans*: 45.2% (103). Entre *Candida* não-*albicans*, a *Candida* spp. representou 34.7% (79), a *C. tropicalis*: 8.3% (19) e *C. krusei*: 2.2% (5) (BESSA, 2019).

Wingeter e colaboradores (2007) também determinaram a frequência de leveduras em lavados bucais de 100 indivíduos HIV positivos, onde 58 amostras apresentaram culturas positivas para *Candida* mostrando o grande predomínio desse gênero na cavidade oral. Apenas 20% dos indivíduos com a cultura positiva para a levedura apresentavam sinais ou sintomas para candidíase oral. Essas leveduras podem se tornar infecciosas principalmente quando o hospedeiro apresenta vulnerabilidade do sistema imunológico, como ocorre em indivíduos transplantados, portadores de doenças autoimunes, AIDS, internados em unidades de terapia intensiva, usuários de medicamentos como os corticoides e entre outros; que juntamente com os mecanismos apresentados pelas leveduras do gênero *Candida*, chamados de fatores de virulência, irão propiciar a instalação de doenças no indivíduo. Portanto, a *Candida* pode causar doenças através de invasão tecidual, por indução de estados de hipersensibilidades ou por produção de toxinas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Os fatores de virulência conferem maior patogenicidade e maior processo de colonização da *Candida* na cavidade oral. Os fatores que são identificados em espécies de *Candida* incluem: a aderência às células epiteliais, formação de biofilme e a secreção de hidrolases enzimáticas, entre elas: as proteases, fosfolipases e lipases (CASTELO BRANCO *et al.*, 2012). Diferentes espécies de *Candida* são

capazes de secretar enzimas hidrolíticas para facilitar a fixação ao tecido do hospedeiro e a ruptura da membrana da célula hospedeira, como mucosas e vasos sanguíneos, sendo que as três principais enzimas produzidas são: protease, fosfolipase e hemolisina (TALAPKO *et al.*, 2021).

As proteinases possuem atividade proteolítica, degradando colágeno, queratina e peptídeos localizados na superfície de mucosa; dois tipos de fosfolipases foram detectadas extracelularmente de *C. albicans* que possuem a habilidade de usar os fosfolipídios presentes na membrana das células humanas como substratos; enquanto, as hemolisinas destroem as hemácias com a finalidade de obter ferro, caracterizando-se como atividade hemolítica dessas leveduras (GOULART *et al.*, 2017).

O conhecimento limitado sobre os fatores de virulência acarreta uma patogenicidade intensificada dos agentes etiológicos, já que não há conhecimento suficiente dos mecanismos que eles utilizam para invasão dos hospedeiros. Esse fato dificulta a forma de tratamento das infecções, uma vez que os medicamentos atuam nesses mecanismos de virulência (ROCHA *et al.*, 2021).

3.2.1 *Candida albicans*

A *C. albicans* é a espécie mais comum isolada na cavidade bucal, como mostra o estudo de Queiroz (2021), onde foi constatado que entre 41 indivíduos saudáveis com cultivo positivo para *Candida*, 57,45% dos isolados eram *Candida albicans*. Na amostra estavam incluídos pacientes com câncer de cabeça e pescoço que ainda não tinham iniciado o tratamento de radioterapia, 32 apresentaram cultivo positivo para o gênero *Candida*, sendo que 44,83% eram da espécie *C. albicans*.

Siqueira (2021), também realizou um estudo em um hospital de referência no tratamento de câncer no Amazonas, onde foram coletadas, a partir da cavidade oral, espécimes clínicos de onze pacientes em três intervalos de tempo: antes do tratamento, na segunda semana e na quarta semana de tratamento radioterápico. Considerando a amostra de onze pacientes, *C. albicans* foi a espécie mais isolada sendo identificada em 54,5% das amostras antes, 45,5% na segunda semana e em 54,5% das amostras na quarta semana de tratamento.

Essas evidências são corroboradas através do estudo de Andreola e colaboradores (2016), onde foram identificados 35 isolados clínicos da Coleção de Cultivos Fúngicos pertencente ao Departamento de Odontologia da Faculdade da Serra Gaúcha, onde houve predomínio da espécie *C. albicans* com 27 casos, ou seja, 77% da amostra. Em outra pesquisa, Wingeter e colaboradores (2007) mostraram que entre cinquenta e oito amostras de lavados bucais de indivíduos com HIV positivo com cultura positiva para *Candida*, a *C. albicans* foi a espécie mais frequente com 93% de ocorrência.

Entre as espécies do gênero *Candida*, a espécie *C. albicans* também é considerada uma das mais patogênicas, sendo responsável pela maioria das infecções fúngicas desse gênero, tanto no corpo humano, quanto na cavidade oral (SIMÕES; FONSECAII; FIGUEIRAL, 2013).

A espécie *C. albicans* possui a capacidade de transitar da forma de levedura para sua forma filamentosa, que é a sua forma patogênica, invasiva e capaz de entrar no tecido hospedeiro, assim ocorrendo uma transição na sua fisiopatologia (TALAPKO *et al.*, 2021). Então, a virulência da *C. albicans* é atribuída principalmente à sua capacidade de expressar estruturas, hifas ou pseudo-hifas, que mediam a adesão epitelial, proporcionando uma proteção contra a ação do fluxo salivar; essas hifas são importantes tanto para a penetração da levedura nos tecidos epiteliais, quanto no escape de células fagocitárias como os macrófagos.

3.2.2 *Candida* não-*albicans*

A incidência das infecções provocadas por *Candida* não-*albicans* tem aumentado nos últimos anos. Dentre as espécies de *Candida* não-*albicans*, incluem-se como importantes agentes etiológicos de infecções na cavidade oral: *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida dubliniensis*, bem como *Candida krusei* (GUINEA, 2014; AHANGARKANI *et al.*, 2019).

Em 2007, em um estudo com pacientes com HIV 58 isolados clínicos foram obtidos e somente quatro (7%) deles foram identificados como *Candida* não-*albicans*, sendo duas *C. tropicalis* e duas *C. glabrata* (WINGETER *et al.*, 2007). Contudo, recentemente, em uma outra pesquisa Scamardo e colaboradores (2020) analisaram

os resultados da vigilância de uma UTI neonatal e entre 1.265 neonatos com infecções relacionadas à assistência à saúde, os patógenos mais encontrados em infecções da corrente sanguínea, associadas a dispositivos, foram: a *C. parapsilosis* responsável por 21,8% enquanto a espécie de *C. albicans* representou apenas 4,6% das infecções.

C. parapsilosis é um fungo leveduriforme oportunista causador de infecções sistêmicas, principalmente em doentes oncológicos, doentes internados em unidades de terapia intensiva e em recém-nascidos. Pammi e colaboradores (2013) apontaram a espécie *C. parapsilosis* como um problema significativo, responsável por um terço das infecções neonatais por *Candida*, estimando que 33,7% das infecções neonatais eram causadas por *C. parapsilosis*. A *C. parapsilosis*, como a *C. albicans*, pode ter morfotipos de colônias diferentes, porém essa espécie não produz hifas verdadeiras, podendo formar somente pseudohifas.

Candida metapsilosis é um membro do complexo de espécies de *C. parapsilosis*, no entanto, se trata de um patógeno oportunista raro em humanos, sendo o menos comum entre eles. Isolados do complexo de espécies *C. parapsilosis* são comumente identificados incorretamente, o que pode ter levado a uma subestimação da frequência da espécie *C. metapsilosis*, logo o aumento nos últimos anos de achados clínicos dessa espécie pode ser devido a uma melhor identificação e diferenciação dessas espécies (O'BRIEN *et al.*, 2022).

A espécie *Candida glabrata* é propensa em colonizar indivíduos de idade avançada e está associada a longo tratamento com antibióticos, uso de dispositivos, ventilação mecânica e prematuridade, além de apresentar reduzida sensibilidade aos derivados azólicos (SOUZA *et al.*, 2022).

A *C. tropicalis* é uma espécie que ainda existem poucos dados a respeito de sua virulência, o que justificou um estudo realizado recentemente, onde foram avaliados seus diferentes determinantes de virulência, sendo encontrados: coagulase em 8,9% dos casos isolados de pacientes internados com candidemia, fosfolipase em 11,1%, proteinase em 68,9%, esterase em 95,6%, hemolisina em 97,8%, formação de biofilme em 100% e hidrofobicidade da superfície celular em 100% (SASANI *et al.*, 2021).

Ainda em relação a virulência das espécies, foi avaliado a produção das enzimas proteinase, fosfolipase, gelatinase e hemolisina, em amostras bucais de

Candida isoladas de pacientes com AIDS e indivíduos hígidos, onde *C. albicans* apresentou resultados significativos para a produção de proteinase, em ambos os grupos de indivíduos, e fosfolipase e hemolisina, apenas nos pacientes com AIDS (ORLANDINI *et al.*, 2020). Já as espécies de *Candida* não-*albicans* apresentaram resultados altamente significativos para fosfolipase nos pacientes hígidos. Em relação às enzimas gelatinase e hemolisina, não foram encontradas diferenças significantes entre *C. albicans* e espécies de *Candida* não-*albicans* (CASTELO BRANCO *et al.*, 2012).

3.2.3 Produção de biofilme como fator de virulência

Os biofilmes são constituídos por células imersas em uma matriz polissacarídica, que representa cerca de 85% do volume do biofilme. As leveduras tomam forma de microcolônias dentro da matriz produzida. Logo, os biofilmes são definidos como comunidades microbianas estruturadas que estão aderidas a uma superfície e envoltas de uma matriz de material exopolimérico (RAMAGE *et al.*, 2005). Essa matriz fornece proteção física das células de fatores do sistema imunológico e dificulta a penetração de antibióticos, o que contribui para a resistência a antibióticos. Para suprimir a atividade metabólica dos biofilmes, são necessárias concentrações várias vezes maiores de antifúngicos, portanto, é importante desenvolver novas abordagens para o tratamento de infecções que são acompanhadas de formação de biofilme (SACHIVKINA; PODOPRIGORA; BOKOV, 2021).

A formação do biofilme é composta por 4 fases: aderência, proliferação, maturação e dispersão. Na primeira fase, as células de levedura se ligam à superfície do material e formam uma camada basal que irá ancorar o biofilme à superfície, seguido pela fase de proliferação, caracterizada pelo início da filamentação que é quando surgem hifas e pseudohifas que continuam a se alongar durante todo o processo de desenvolvimento do biofilme formando uma rede complicada. Na fase de maturação, as hifas ficam envoltas por substâncias exopoliméricas autoproduzidas, que atuam mantendo toda a estrutura do biofilme unida. E então, na fase de dispersão, esses biofilmes passarão a liberar continuamente células de levedura com

uma morfologia alongada única que serve para semear novos locais de infecção, garantindo que o ciclo possa ser repetido (WAL *et al.*, 2019).

A formação de biofilme é uma propriedade da patogênese de algumas espécies de *Candida*, sendo essas espécies capazes de causar infecções relacionadas com a criação de um biofilme na superfície do hospedeiro ou em superfícies. A *C. parapsilosis* é a espécie fúngica mais associada à formação de biofilme e o aumento de infecções por esta levedura acompanhou o aumento do uso generalizado de dispositivos de implantes médicos, essa sendo uma das principais causas de infecções disseminadas e tornando-se um importante fator de risco para esse gênero (TROFA; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2008; SINGARAVELU; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2013; LARKIN; DHARMAIAH; GHANNOUM, 2018).

A demora para administração de nutrição parenteral também predispõe à formação de biofilmes nos cateteres. Em *C. albicans*, a morfologia do biofilme consiste em uma camada basal de levedura compacta e uma camada de hifas mais espessa, porém menos compacta quando comparado com a *C. parapsilosis* que possui biofilmes mais finos e menos complexos (PAMMI *et al.*, 2013).

O conhecimento limitado sobre os fatores de virulência acarreta uma patogenicidade intensificada dos agentes etiológicos, já que não há conhecimento suficiente dos mecanismos que eles utilizam para invasão dos hospedeiros. Esse fato dificulta a forma de tratamento das infecções, uma vez que os medicamentos atuam nesses mecanismos de virulência. A levedura *C. tropicalis* é um exemplo desse fato tendo poucos dados a respeito de sua virulência, o que justificou um estudo realizado recentemente, onde foi avaliado seus diferentes determinantes de virulência, sendo encontrados formação de biofilme em 100% dos isolados clínicos de *C. tropicalis* (SASANI *et al.*, 2021). O estudo de Atencia-Carrera (2022b) corroborou com o anterior e demonstrou a capacidade de *C. tropicalis* produzir um forte biofilme quando comparado ao de *C. albicans*, além de apresentar um maior crescimento, produção de células viáveis e contagem total de células em biofilmes de *C. tropicalis*. Enquanto os biofilmes formados pela espécie *C. albicans* apresentaram maior área celular, juntamente com uma maior produção de matriz.

3.2.4 Infecções orais e candidemia

A incidência de infecções causadas por espécies de *Candida* tem aumentado consideravelmente nas últimas três décadas, principalmente devido ao aumento da epidemia de AIDS, além de que o aumento da emergência dessas espécies como patógenos humanos pode ser atribuído aos melhores métodos de identificação associado ao grau de doenças dos pacientes, às intervenções a que foram submetidos e aos medicamentos utilizados atualmente (SOUZA *et al.*, 2022).

A *Candida* da espécie *C. albicans* é a mais comum em causar infecção em indivíduos que se encontram com deficiência do sistema imunológico. Mariani, Silva e Carli (2016) realizaram um estudo epidemiológico com 141 pacientes que estavam internados no Hospital da cidade de Passo Fundo/RS para verificar a prevalência de candidíase. Entre eles, 23 pacientes apresentavam candidíase, sendo 7 com candidíase eritematosa, 7 possuíam candidíase pseudomembranosa, 5 tinham queilite angular e 4 eram portadores de candidíase multifocal (infecção mais grave com diferentes tipos de lesões de candidíase em diferentes locais). Os pacientes que possuem esses processos infecciosos podem ter complicações como a disseminação da *Candida*, chamada candidemia. A candidemia se trata de uma infecção invasiva de corrente sanguínea, que acomete principalmente pacientes internados dentro e fora de UTI, que ocasionam morbidade e mortalidade significativas, muito comum no período neonatal (MELO *et al.*, 2009).

Pacientes hospitalares, normalmente encontram-se mais debilitados e durante a internação é fundamental a implementação de cuidados com a higiene oral para evitar surgimento de doenças locais e principalmente sistêmicas (MEIRA *et al.*, 2010). Os pacientes que se encontram em UTI, são aqueles que estão em estado grave, como os que estão com câncer ou doença neurológica crônica, respiratória ou gastrointestinal que estão em ventilação mecânica, especialmente se recebem longos ciclos de antibióticos de amplo espectro (MANTADAKIS; TRAGIANNIDIS, 2019). As leveduras que geralmente estão em comensalismo com o hospedeiro se tornam infecciosas em decorrência de alterações locais e sistêmicas, comuns em pacientes encontrados em UTI, que modificam a microbiota oral; além disso pacientes também

apresentam higienização deficiente, baixo fluxo salivar e constante exposição a leveduras que já estavam no ambiente hospitalar (SIQUEIRA *et al.*, 2014).

A candidemia possui a via endógena como principal via de transmissão, ou seja, cepas colonizadas são capazes de infectar a corrente sanguínea (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; GAMA, 2022). Gama (2022) realizou uma pesquisa sobre a relação entre a microbiota oral e fungemia na cidade de Manaus, no qual encontrou dois pacientes com genótipos de *C. albicans* idênticos em cavidade oral (colonização prévia) e corrente sanguínea, demonstrando que a cavidade oral pode servir como fonte para o acometimento de fungemia.

Os principais fatores de riscos apontados para candidemia em pacientes que estão fora da UTI são: cateter venoso central, nutrição parenteral total e exposição a glicopeptídeos e nitroimidazóis; enquanto para pacientes que estão em UTI incluem: nutrição parenteral total, lesão renal aguda, doença cardíaca, choque séptico prévio e exposição a antibióticos aminoglicosídeos (POISSY *et al.*, 2020).

Pacientes que se encontram em UTI necessitam de cuidados com a higiene oral para minimizar a colonização de patógenos oportunistas, visando reduzir a prevalência de infecções sistêmicas e locais. Porém, não há como padronizar essas técnicas, pois cada paciente é único e apresentam um estado e situação de saúde diferentes. Pode-se usar soluções enzimáticas como a lactoferrina para diminuir a incidência de *C. albicans* na mucosa oral, além de lisozima e lactoperoxidase para melhorar e restaurar a ação antimicrobiana da saliva. A higiene oral com gaze e clorexidina também é altamente recomendada. Outro fator importante é a presença do dentista na UTI que pode realizar um diagnóstico precoce nos casos de candidíase e assim evitar disseminações (SIQUEIRA *et al.*, 2014)

Li e colaboradores (2018) através de uma pesquisa retrospectiva realizada em uma UTI médica/cirúrgica, mostraram que entre 141 pacientes, 44 pacientes foram diagnosticados com infecção fúngica invasiva (31,2%), estando as espécies de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *Candida lusitaniae* presentes entre os casos. Em Guadalajara, uma cidade do México, a espécie *C. albicans* foi responsável pela maior parte de candidemias, representada por 35,3% das infecções, em seguida a *C. parapsilosis* com 30,6%, a *C. glabrata* com 31,8% e ainda ocorreram dois eventos de infecção por *Candida lipolytica* (LONA-REYES *et al.*, 2021).

Em uma metanálise, Pammi e colaboradores (2013) apontaram que a mortalidade neonatal por infecções de *C. albicans* foi de 12,97% e a mortalidade por *Candida* spp. foi de 14,50%, enquanto Silva e Freitas (2021) encontraram em um estudo transversal que incluíam todos os recém-nascidos internados em UTI de um determinado período, 38 casos de candidíase invasiva que resultaram em uma incidência de 2,5% e uma letalidade de 32%.

3.2.5 *Candida* em Idosos

A expectativa de vida dos brasileiros vem aumentando ao longo do tempo. Segundo a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (Pnad Contínua). Em 2012 o percentual de idosos (população com 65 anos ou mais) no Brasil era de 7,7%, em 2022 esse percentual cresceu e estava em 10,5% do total da população, indicando que em dez anos, houve um aumento na proporção de idosos (IBGE, 2022).

A idade é um fator que favorece a presença de candidíase oral principalmente na infância e na senilidade, devido ao sistema imune estar mais susceptível às patologias em tais épocas da vida (MARIANI; SILVA; CARLI, 2016).

Os idosos sofrem com alterações na microbiota oral, causadas após antibioticoterapia de largo espectro prolongada e por fatores locais, como a má higiene oral, xerostomia (síndrome de Sjögren), diabetes mellitus, desnutrição, malignidades hematológicas, doença do vírus da imunodeficiência humana (HIV), imunodeficiências e medicamentos (corticosteroides e imunossupressores) (CAMPO, 2018).

Um número alto de idosos usam próteses dentárias removíveis, total ou parcial, que também são capazes de alterar a microbiota oral. Elas são porosas e permitem o acúmulo de restos alimentares na sua superfície interna, possibilitando a colonização de fungos (GONÇALVES *et al.*, 2011), o que pode causar a doença denominada estomatite protética. A estomatite protética está presente de 60% a 72% dos idosos que usam próteses removíveis e tem como principal fator etiológico a infecção por *Candida* (LEITE; PIVA; MARTINS-FILHO, 2015).

Em uma revisão, em que estavam incluídas pesquisas realizadas de 1997 a 2021, estudou-se as lesões bucais em idosos, sendo que a estomatite protética foi a lesão mais prevalente, seguida por úlceras, queilite angular, hiperplasias e

candidíase eritematosa. A estomatite protética acometeu principalmente as mulheres e o uso de próteses removíveis propiciaram o aparecimento dessas lesões (FREIRE *et al.*, 2023).

Já as infecções invasivas, como a candidemia, tem se tornado um problema frequente em idosos, já que eles são mais propensos a enfrentar terapias quimioterápicas, a usar medicamentos como corticosteroides por um longo período, e tendem a passar por transplantes de órgãos com mais frequência do que o restante da população. Esses procedimentos citados afetam consideravelmente o sistema imunológico; tornando-o baixo, o que deixa os idosos mais suscetíveis a infecções oportunistas (NUCCI; COLOMBO, 2022).

Em um estudo realizado em uma comunidade ribeirinha do Amazonas, foram analisadas 40 leveduras, sendo 21 de amostras coletadas da boca (palato) e 19 de próteses de idosos. Dessas leveduras, 80% eram espécies de *Candida não-albicans*. Ao analisar os fatores de virulência, foi verificado que as leveduras do gênero *Candida* possuem diversos fatores de virulência que podem se apresentar com alta intensidade na presença de alterações da microbiota oral e que em relação à comparação entre as espécies de *Candida* analisadas, as espécies *Candida não-albicans* apresentaram número de fatores de virulência semelhantes ao de *C. albicans*, com alta patogenicidade (SILVA, *et al.*, 2019).

3.3 Antifúngicos no tratamento de infecções por *Candida*

Os antifúngicos utilizados no tratamento de infecções causadas por fungos do gênero *Candida* são divididos em três grupos: polienos, azóis e equinocandinas (LI *et al.*, 2018).

Na classe dos polienos, encontra-se a anfotericina B desoxicolato, que provoca a lise da célula, no entanto, esse medicamento também causa danos a célula do hospedeiro, tendo um grande potencial tóxico. Apesar de ser o fármaco mais efetivo e com amplo espectro para o tratamento, não é a droga de primeira escolha devido a sua alta toxicidade (CAMPOS *et al.*, 2020).

Na primeira geração dos azóis estão presentes o miconazol intravenoso e cetoconazol oral; na segunda geração estão o fluconazol e itraconazol e na terceira

geração estão o voriconazol, posaconazol e isavuconazol. Essas drogas agem bloqueando a síntese do ergosterol, um componente fundamental da membrana celular, causando desregulação na fluidez e perda de integridade da membrana plasmática (PERFECT, 2017; REVIE *et al.*, 2018). Esses antifúngicos possuem boa biodisponibilidade via oral e baixa incidência de efeitos adversos e iniciaram uma nova era no tratamento das infecções fúngicas, porém, nos últimos anos, tem sido observado o isolamento de cepas de leveduras com susceptibilidade diminuída ou resistentes aos antifúngicos (ZARDO; MEZZARI, 2004).

O aumento dos casos de resistência fúngica aos fármacos antifúngicos tem causado grande preocupação. O aumento ocorre devido a capacidade dos fungos de mutação gênica, troca de cepas sensíveis por endógenas resistentes, expressão gênica transitória e alteração celular, que dificulta bastante os mecanismos de ação dos antifúngicos. O uso indiscriminado de medicamentos e interrupção do tratamento também tem grande responsabilidade no aumento do número de espécimes resistentes (CAMPOS *et al.*, 2020)

Esta resistência pode ser clínica ou *in vitro*. A primeira pode ser consequência do baixo nível do fármaco no tecido e no sangue, devido à interação entre os fármacos ou à imunodepressão do paciente. A resistência *in vitro* pode ser do tipo secundária, onde cepas se transformam em resistentes devido ao prévio contato com o antifúngico. É consenso que a resistência ao fármaco depende da interação entre o hospedeiro, o fármaco e o fungo, porém os fatores do paciente são os mais importantes para o surgimento da resistência (ZARDO; MEZZARI, 2004).

Na classe equinocandinas estão a anidulafungina, caspofungina e micafungina e são os antifúngicos lançados mais recentemente. Estas possuem a vantagem de apresentar pouca toxicidade, devido ao seu mecanismo de ação ser o bloqueio da 1,3- β -glucano sintase, proteína essencial na formação da parede celular das leveduras, que está ausente nas células humanas. Atualmente, esses medicamentos são a primeira linha de tratamento para as candidemias (PAPPAS *et al.*, 2016; PERFECT, 2017).

3.3.1 Antifúngico Anidulafungina

A anidulafungina encontra-se na classe das equinocandinas, juntamente com a caspofungina e a micafungina, lançada na indústria nos anos 2000, sendo a classe lançada mais recentemente.

A atividade das equinocandinas, ao contrário do que acontece com a Anfotericina B e os triazóis, não é afetada pela presença de biofilmes, permitindo a sua utilização no tratamento de infecções de pacientes internados em UTI associados a dispositivos protéticos e à utilização de cateteres (ARAÚJO; ESPINEL-INGROFF, 2010; LARKIN; DHARMAIAH; GHANNOUM, 2018).

O antifúngico anidulafungina foi incorporado pelo SUS no dia 09 de junho de 2022 com indicação de uso para pacientes com candidemia e outras formas de candidíase invasiva. Assim, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária sugere anidulafungina como o tratamento de primeira escolha para candidemia, fornecendo uma dose de ataque de 200 mg, seguida em 100 mg/dia. O tratamento deve ser contínuo por 2 semanas após hemoculturas negativas e melhora clínica (geralmente após 5 a 7 dias) (BRASIL, 2022).

Uma das vantagens da anidulafungina é que ela não é metabolizada a nível hepático, sofrendo uma lenta degradação química à temperatura e pH fisiológicos (semivida de degradação é aproximadamente 24h) transformando-se em um péptido de anel aberto sem atividade antifúngica, assim apresentando baixa toxicidade. Outra vantagem é que os antifúngicos agem bloqueando a 1,3- β -glucano sintase, proteína essencial na formação da parede celular, região ausente nas células humanas. Além de apresentarem atividade antifúngica de amplo espectro e maior segurança na sua utilização contínua (PAPPAS *et al.*, 2016; PERFECT, 2017).

3.4 Fagocitose

3.4.1 Células fagocíticas: monócitos, macrófagos e células THP-1

As células sanguíneas são compostas em grande parte pelos chamados glóbulos brancos, que são as células responsáveis pela defesa do organismo contra

microrganismos invasores. Essa parte do sangue engloba as plaquetas e cinco tipos de leucócitos: os monócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos (VIVAS, 2014).

A função imunológica está dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa, sendo que os monócitos e macrófagos fazem parte da resposta imune inata, ou seja, aquela que está presente em todos os indivíduos já no nascimento, independente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores (CRUVINEL *et al.*, 2010).

Os monócitos são células formadas na medula óssea, através da linhagem mieloide/fagocítica mononuclear, originados no sangue que participam da coordenação entre a resposta imune inata e adaptativa. Eles possuem a capacidade de sinalizar a presença e fagocitar microrganismos estranhos, além de acionar as demais células de defesas do organismo (SIEWEKE; ALLEN, 2013).

Os monócitos circulam pela corrente sanguínea temporariamente e possuem uma vida curta, no entanto, quando ocorre uma inflamação ou infecção, eles respondem migrando para o tecido acometido e se diferenciando em macrófagos ou em células dendríticas. Os macrófagos irão desempenhar funções específicas dependendo do microambiente que se encontram, além de serem denominados de acordo com o tecido em questão (GORDON; PLÜDDEMANN; MARTINEZ ESTRADA, 2014).

Ao diferenciar-se em macrófago, a célula passa a possuir um maior número de lisossomos, facilmente identificável, onde se acumulam enzimas hidrolíticas que permitem um aumento da capacidade de realizar fagocitose, que é a sua principal função. Além da fagocitose de patógenos, executam a fagocitose de detritos e células mortas importantes para o mecanismo de reparo tecidual (YANG *et al.*, 2014).

Eles exercem funções essenciais no combate a microrganismos patogênicos no sistema de defesa humano, como a capacidade de síntese de citocinas, que pode resultar em uma imunidade aumentada ou diminuída que depende das características do hospedeiro e do microrganismo (GOW *et al.*, 2011).

Estruturalmente, os macrófagos apresentam uma forma variável, com contornos irregulares, núcleo numa posição descentrada e citoplasma abundante com grau de vacuolização variável, que depende da formação de vesículas da fagocitose (YANG *et al.*, 2014). Em relação ao monócito, o macrófago possui um tamanho maior,

atividade fagocítica mais elevada que depende do seu fenótipo e vida longa, podendo permanecer no tecido por meses ou anos, atuando como sentinelas (PACHECO; CARDOSO, 2012).

Comumente quando é necessário utilizar monócitos e macrófagos em pesquisas e estudos, é utilizada a linhagem de células monocíticas THP-1, proveniente de um paciente com leucemia monocítica aguda. Essas células foram coletadas do sangue periférico do paciente e apresentam baixo estágio de maturação (ALDO *et al.*, 2013).

Apesar dos monócitos estarem presentes no sangue periférico, eles são pouco utilizados devido a sua falta de pureza, variabilidade e disponibilidade, já os macrófagos presentes em tecidos primários são de difícil crescimento e multiplicação *in vitro*, com o uso da THP-1 ou outras linhagens de células monocíticas esses problemas foram eliminados (ALDO *et al.*, 2013).

Apesar de se tratar de células leucêmicas, as células THP-1 não apresentam anormalidades cromossômicas proeminentes (FLEIT; KOBASIUK, 1991), além de se assemelharem a monócitos e macrófagos primários em morfologia e propriedades de diferenciação. Citocinas ou agentes farmacológicos são capazes de induzir fenótipos granulocíticos maduros ou monocíticos maduros nessas células (ALDO *et al.*, 2013).

Quando comparados com as células derivadas do sangue periférico humano, o uso da linhagem de células THP-1 em pesquisas apresenta vantagens como: alta taxa de multiplicação; não há presença de vírus infecciosos ou produtos tóxicos, tornando esta linhagem celular relativamente fácil e segura de usar; linhagem celular imortalizada que pode ser cultivada *in vitro* por aprox. 3 meses sem alterações da sensibilidade e atividade celular, enquanto os monócitos derivados de doadores de sangue periférico requerem mediadores inflamatórios para prevenir a apoptose (CHANPUT; MES; WICHERS, 2014).

As células THP-1 podem ser armazenadas por vários anos quando seguido o protocolo apropriado. Elas possuem um grau de variabilidade mínimo no fenótipo celular, o que facilita a reprodutibilidade dos achados, ao contrário da alta variação de quando é usadas as células fagocíticas de doadores individuais. Logo, a linhagem celular THP-1 é adequada e confiável para estudar as respostas, função e diferenciação de monócitos e macrófagos (CHANPUT; MES; WICHERS, 2014).

3.4.2 Mecanismo da Fagocitose

A fagocitose se caracteriza pelo reconhecimento, através de células especializadas, de organismos invasores e sua posterior destruição intracelular em compartimentos onde atuam enzimas hidrolíticas, esse mecanismo ocorre para defender o corpo contra microrganismos invasores. A fagocitose é realizada pelas células fagocíticas do hospedeiro e é capaz de estimular outras respostas imunes (HAAS, 2007).

A fagocitose é iniciada pela interação de receptores de superfície celular com ligantes encontrados nos microrganismos, como os lipopolissacarídeos ou opsoninas derivadas do hospedeiro. Assim as células fagocíticas reconhecem os invasores para que sejam destruídos, como as demais células do organismo não apresentam esses compostos químicos em sua superfície, elas não são reconhecidas e não sofrem a fagocitose (RUSSELL *et al.*, 2009)

A membrana plasmática emite projeções denominadas pseudópodes, os quais são preenchidos internamente por uma rede filamentosa de actina, que lhes conferem resistência mecânica e sustentação. Os pseudópodes aderem ao material a ser internalizado e vão, passo a passo, envolvendo-o, que se fundem, formando uma grande vesícula (ou vacúolo) que se desprende e penetra no interior da célula. Esse compartimento é denominado fagossomo (SCHADECK; MENDONÇA, 2013).

O fagossomo não tem a habilidade de matar e destruir o patógeno internalizado. Para adquirir essa habilidade ele sofre muitas modificações em um processo denominado de maturação do fagossomo. Através de uma série de fusões com endossomos (organelas ácidas) e com os lisossomos, são descarregadas no fagossomo uma variedade de enzimas hidrolíticas e enzimas que produzem radicais livres, formando o fagolisossomo. As enzimas que compõem o fagolisossomo, no seu conjunto, matam e digerem o material fagocitado. Com essas fusões há também a inserção de uma proteína translocadora de H⁺ denominada ATPase Vacuolar que transporta H⁺ para o interior do fagossomo, o qual torna-se ácido (SCHADECK; MENDONÇA, 2013).

3.4.3 Habilidade de leveduras resistirem a fagocitose

Alguns patógenos intracelulares desenvolveram estruturas e mecanismos que lhes permitem sobreviver à fagocitose. Esses microrganismos utilizam três principais estratégias (SCHADECK; MENDONÇA, 2013):

1. Patógenos que rompem a membrana do fagossomo: Após serem fagocitados eles escapam para o citoplasma, o que os protege contra os agentes fagolisossomais e lhes permite metabolizar nutrientes citoplasmáticos;
2. Patógenos que paralisam a maturação do fagossomo: Ocorre a inibição da fusão dos fagossomos com endossomos e lisossomos, o que impede a morte e degradação destes microrganismos, pois não se encontram com as enzimas lisossomais;
3. Patógenos que são capazes de sobreviver no interior do fagolisossomo ácido (SCHADECK; MENDONÇA, 2013).

A *C. albicans* interage intimamente com células fagocíticas, de forma comensal. No entanto, pensa-se que existe um limite para a quantidade de *C. albicans* que é tolerada pelo hospedeiro (GOW *et al.*, 2011). Quando não há homeostase, os fagócitos reconhecem e ingerem as leveduras infecciosas, e posteriormente, eles podem liberar interleucinas e fator de necrose tumoral dando início a ativação das propriedades antifúngicas de macrófagos e neutrófilos (OLIVER, 2016).

Pode-se mensurar o quanto a levedura é resistente ao ataque de células fagocitárias, com a finalidade de definir a resistência desse patógeno a fagocitose, como ocorreu no estudo, no qual 76 cepas foram submetidas a tipagem ABC e após as suas capacidades fagocíticas por neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) foram avaliadas. O número de células de *C. albicans* fagocitadas por 100 PMNs foi determinado após três horas de incubação de ambas as células. *C. albicans* genótipo A apresentou média de $121,67 \pm 16,06$; genótipo tipo B apresentou $141,33 \pm 14,27$ e *C. albicans* genótipo C apresentou média de $109,93 \pm 12,29$. Quando comparadas, o genótipo C foi significativamente mais resistente ao ataque de células fagocitárias do que os isolados pertencentes ao genótipo A e B (SILVA-ROCHA *et al.*, 2014).

A capacidade fagocítica de jovens e idosos à levedura *C. albicans* por monócitos e macrófagos foram avaliadas, ambas as células foram incubadas com

diferentes proporções de *C. albicans* viáveis (5 células:1 levedura, 1 célula:1 levedura e 1 célula:5 leveduras) por 30min, 2h e 5h e os resultados revelaram que os monócitos e macrófagos oriundos de idosos levam mais tempo para ativar a produção de NO e H₂O₂ que em jovens, mas que possuem o mesmo poder de fagocitose. Entretanto, quando o sistema imune não é capaz de impedir a evolução de infecções fúngicas é necessário o uso de antifúngicos para inibir o crescimento de *C. albicans* (GARDIZANI, 2014).

De acordo com Galocha *et al.* (2019), os mecanismos de invasão de tecido de *C. glabrata* são desconhecidos, embora seja hipotetizado que possivelmente ocorra por indução de endocitose de células hospedeiras. Quanto ao escape de fagócitos, *C. glabrata* aplica uma estratégia de persistência, replicando-se dentro dos fagócitos e, eventualmente, levando à lise celular devido à carga fúngica, em vez de escapar ativamente. *C. glabrata* não parece produzir níveis significativos de atividade de proteinase e dano tecidual. No entanto, possui uma família de proteases aspárticas, que está principalmente associada à remodelação da parede celular e possível evasão imunológica.

3.5 Importância das leveduras para a saúde pública

As infecções relacionadas à *Candida* são consideradas um grave problema de saúde pública, principalmente quando se trata de infecções de corrente sanguíneas e infecções sistêmicas invasivas (CENDEJAS-BUENO *et al.*, 2010; LATOUCHE *et al.*, 1997; LEAW *et al.*, 2006; LIONAKIS; NETEA, 2013).

Em um estudo, realizado em Manaus, foi mostrado a ocorrência dessas infecções em hospitais, nele foram analisadas amostras de 107 pacientes internados em UTI neonatal e UTI pediátrica, de diversos hospitais, sendo que 05 indivíduos apresentaram hemocultura positiva para o gênero *Candida*. As amostras eram provenientes de 04 recém-nascidos prematuros (80%) de uma maternidade pública e 01 criança (20%) advinda de um hospital público infantil. (GAMA, 2022).

Em uma outra pesquisa, também realizada no Amazonas, a incidência de candidemia foi de 2,31 casos por 1000/internações e 0,61 casos por 1000/pacientes ao dia, sendo o gênero *Candida* o segundo maior causador de infecção na corrente

sanguínea, tendo a *C. albicans* como principal espécie causadora das candidemias no Amazonas, seguida por *C. tropicalis*. Os casos foram mais prevalentes no sexo masculino do que no sexo feminino e as crianças foram mais acometidas do que os adultos. A taxa de mortalidade geral foi de 37,21% (CORRÊA, 2014).

A candidemia é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no ambiente hospitalar e há indícios que a epidemiologia da infecção por *Candida* está mudando. Devido a esse fato, é importante que haja pesquisas constantes para que ocorra a diminuição dessas alterações epidemiológicas, que pode ser realizada através de profilaxias antifúngicas atualizadas em pacientes acometidos por diversas doenças que se encontram internados em UTI. Também é necessário estudos sobre os padrões de resistência apresentados por cada espécie do gênero *Candida*, bem como identificar os fatores de risco para que seja permitido deter precocemente estas infecções e assim melhorar o prognóstico dos doentes (BANERJEE; DOMINIC; BALIGA, 2015; NISHIDA *et al.*, 2023). Além da alta taxa de morbidade e mortalidade, uma alta taxa de pacientes pediátricos curados podem ficar com sequelas, incluindo neurológicas (BENJAMIN *et al.*, 2006).

A resistência antifúngica é um problema clínico reconhecido mundialmente, devido a este fato, existe a necessidade da realização de testes de suscetibilidade, para determinar o manejo clínico ideal, estudos epidemiológicos detalhados para a prevenção e contenção de surtos de infecções por *Candida* (LATOUCHE *et al.*, 1997; PFALLER; DIEKEMA, 2004).

A candidemia, rotineiramente, prolonga a duração da internação e aumenta os custos dos cuidados médicos, gerando um tratamento de alto custo para o setor público (BANERJEE; DOMINIC; BALIGA, 2015). Através de estudos dos fatores de virulência, como o de produção de biofilme que está relacionado com infecções de dispositivos médicos, e medicamentos utilizados no tratamento; é possível adotar protocolos profiláticos e de tratamentos adequados e atuais para o controle de infecções que ajudarão a controlar as infecções nosocomiais, como nas UTIs, e resultarão em tratamentos mais rápidos, eficazes e com menores taxas de morbidade e mortalidade.

4. METODOLOGIA

4.1 Cepas de leveduras testadas:

Foram utilizadas 37 leveduras pertencentes ao acervo da Coleção de fungos da Amazônia - CFAM do Instituto Leônidas e Maria Deane / Fiocruz Amazônia provenientes da cavidade oral de idosos da comunidade Lago do Limão, localizada na cidade do Iranduba – Amazonas: *Candida albicans* (CFAM 1458, CFAM 1468, CFAM 1471); *Candida glabrata* (CFAM 1449, CFAM 1451, CFAM 1454, CFAM 1455, CFAM 1461, CFAM 1463, CFAM 1464, CFAM 1465, CFAM 1466, CFAM 1478, CFAM 1479, CFAM 1480, CFAM 1484, CFAM 1486, CFAM 1487); *Candida parapsilosis* (CFAM 1453, CFAM 1456, CFAM 1481, CFAM 1482, CFAM 1483, CFAM 1485, CFAM 1488); *Candida tropicalis* (CFAM 1450, CFAM 1452, CFAM 1457, CFAM 1459); *Meyerozyma guilliermondii* (CFAM 1477 e CFAM 1489); *Meyerozyma caribbica* (CFAM 1476); *Candida metapsilosis* (CFAM 1470); *Saccharomyces cerevisiae* (CFAM 1460); *Candida* sp. (CFAM 1467 e CFAM 1469); *Kodamaea ohmeri* (CFAM 1473).

4.2 Reativação dos isolados clínicos

As cepas estavam conservadas sob-refrigeração a - 20 °C em Sabouraud Dextrose Ágar (SAB) suplementado com glicerol. As amostras foram reativadas em caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD), com temperatura de 37°C durante 48 horas, sob agitação. Finalizado este processo, foi inoculada uma alçada da levedura numa placa Petri contendo meio Sabouraud Dextrose Ágar (SAB), sob as mesmas características de incubação citadas anteriormente por 72h.

Após a reativação as leveduras foram repicadas para placas com meio CHROMagar *Candida* e deixadas incubadas por 48h e a coloração da colônia foi observada.

As duas cepas não identificadas até espécie foram sequenciadas conforme descrito no item 4.3.

4.3 Identificação molecular

As duas cepas não identificadas foram transferidas com auxílio de alça bacteriológica para microtubo contendo 1mL do meio líquido YPD (1% extrato de levedura; 2% glicose; 2% peptona) e foram incubadas a 28°C durante 16 a 24 horas. A extração foi feita com o Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Germany). Após centrifugar a 8000 rpm (5200 RCF) por 1 minuto e desprezar o sobrenadante, foi acrescido ao microtubo 180 µL de tampão de lise (ATL) e pérolas de vidro lavadas em ácido. As células foram rompidas com choque mecânico através de maceração durante 2 minutos e depois procedeu-se a extração genômica com adição de Proteinase K overnight a 56°C. Após, foi adicionado 200 µL de tampão de guanidina (AL) e feita agitação a frio em vórtex por 15s para posterior incubação por 10 min a 72°C, em termobloco. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume, 200 µL, desta vez de etanol e feita a homogeneização em agitador. A mistura foi transferida para as colunas de sílica e centrifugada a 8000 rpm (5200 RCF) por 1 min. O material foi transferido para um novo tubo da coluna e 500 µL do primeiro tampão de lavagem foram adicionados à coluna (AW1), para em seguida, ser centrifugado por 1 min a 8000 rpm (5200 RCF). Novamente procedeu-se a troca do tubo da coluna e 500 µL do segundo tampão de lavagem (AW2) foram adicionados à coluna de sílica, e centrifugado a 14000 rpm (15900 RCF) por 3 min. O DNA foi recuperado com 100 µL de tampão de eluição (AE) próprio do kit, após centrifugação a 8000 rpm (5200 RCF) por 1 min. A coluna foi desprezada e o filtrado armazenado a -20 °C.

Foram utilizados os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3 ') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3 ') para a amplificação da região ITS. As reações foram realizadas em um volume de 25 µL contendo: 10,2 µL de H₂O ultrapura, 2,5 mM de solução tampão, 4 mM de MgCl₂, 5,0 mM de dNTP, 0,5 µM de cada primer, 0,3 U Taq DNA polimerase e 30 ng de DNA. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min e uma extensão final a 72°C por 10 min (TAVERNA *et al.*, 2013).

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain em tampão TBE 1x, juntamente com

marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen™) e corante 6x Orange Loading Dye, visualizados em um transiluminador de luz UV.

A purificação do DNA amplificado foi feita de acordo com protocolo do kit de purificação de DNA (PROMEGA). As reações de sequenciamento foram feitas utilizando-se o kit “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems) de acordo com instruções do fabricante. Os produtos da PCR foram sequenciados na direção forward e reverse utilizando os mesmos primers da amplificação inicial. A eletroforese capilar foi realizada em sequenciador ABI 3130 Genetic Analyzer no Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM) no INPA.

A similaridade das sequências foi obtida usando a ferramenta de alinhamento de sequência do Fungal Biodiversity Centre no site da CBS (cbs.knaw.nl/collections/BioloMICSSequences.aspx) da Holanda.

4.4 Avaliação do fator de virulência: produção de biofilme

Uma alçada de 10µl de células de leveduras crescidas a 24h em ágar Sabouraud Dextrose foi inoculada em um tubo de poliestireno Falcon contendo 10ml de caldo de Sabouraud suplementado com glicose a 8%. Os tubos foram incubados a 35 ° C durante 24 h.

Após esse período, os tubos com a suspensão de células foram vertidos e lavados com água destilada duas vezes e depois coradas com solução a 1% de safranina.

Os tubos foram examinados quanto à presença da camada viscosa e classificados como negativa, positiva fraca, positiva moderada e forte positivo. Cada uma das amostras foi testada três vezes e cada tubo foi lido por dois observadores (BRANCHINI *et al.*, 1994; OZKAN *et al.* 2005; PEREIRA, 2015).

4.5 Sensibilidade ao antifúngico anidulafungina

A análise do perfil de sensibilidade ao antifúngico anidulafungina foi realizada de acordo com a técnica Etest (AB BIODISK, Solna, Suécia). As leveduras foram suspendidas em uma solução salina a 0,85% com sua turbidez ajustada na escala 0,5

de MacFarland. Após esse procedimento, 500 µl dessa suspensão foi semeada em três direções em placa de Petri contendo meio Ágar RPMI 1640 (1,5%) com 2% de glucose, com o auxílio de um swab estéril. Aguardou-se então o período de 15 minutos para evitar o excesso de líquido no meio e aplicaram-se as fitas Etest, colocando primeiramente na placa de Petri a região da fita com menor concentração de antifúngico. Por fim, incubou-se a 35°C por 24 a 48 horas. O antifúngico testado foi a anidulafungina (0,002 ~ 32 µg/ml) e o valor da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de ≤ 2 foi usado para cepas que apresentam sensibilidade e > 2 para cepas não-suscetíveis. O valor considerado para cada cepa foi o presente no local de intersecção do halo de inibição (elipse). Para o controle de qualidade foi utilizada a cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019^a, que possui valores de referência de MIC (mg/L) 0.5 e intervalo de 0.125 - 1.0 para o antifúngico anidulafungina.

O perfil de sensibilidade foi classificado como sensível (S) e não-suscetível (NS). As instruções para verificação de suscetibilidade *in vitro* de espécies de *Candida* foram adaptadas do documento M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

4.6 Avaliação da habilidade de leveduras resistirem a fagocitose

4.6.1 Obtenção e cultivo de THP-1

A linhagem celular de leucemia monocítica humana (THP-1) utilizada foi cedida gentilmente pelo Dr. Yury Oliveira Chaves do ILMD– FIOCRUZ Amazônia. Ela foi cultivada em meio RPMI 1640 com glutamina (Gibco), 10% de SFB (Gibco) e em atmosfera umidificada, a 37°C e 5% de CO₂, com troca de meio a cada dois dias. Todos os ensaios foram realizados a partir de confluência celular de 80%.

4.6.2 Diferenciação de THP-1

Para a diferenciação em macrófagos, as células THP-1 foram incubadas com 10 ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich) diluído em meio RPMI (Gibco), em placas de seis poços (Kasvi) a uma concentração de 5×10^5

células/poço ou em placas de 100 mm (Corning) com 3×10^6 de células, durante 48h, tempo necessário para que a THP-1 adquira completamente o fenótipo e funcionalidade de macrófago (LUND *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2007). Após a diferenciação, o meio contendo PMA foi substituído por um meio RPMI completo, e então foram preenchidos 44 poços, de uma placa de 96 poços, com 50 μ l de células THP-1 na concentração de 100 mil células por mL.

4.6.3 Cultivo e preparo das leveduras

Foram selecionadas 1 cepa de cada uma das 10 espécies diferentes de leveduras desse estudo. Nas espécies com mais cepas foram selecionadas as que, em testes anteriores, apresentaram alto poder de virulência. As leveduras foram cultivadas em meio Agar Sabouraud por 24h, após foram suspensas em 4ml de salina 0,85% para obtenção de uma suspensão na concentração de 5×10^5 leveduras/mL. Após, as células foram lavadas, centrifugadas e ressuspensas em PBS.

4.6.4 Processo de fagocitose

A suspensão de leveduras foi adicionada ao poço contendo as células THP-1 ativadas (macrófagos), na concentração de 5×10^5 células/mL, na proporção de 1:1. Foi realizado o controle do experimento somente com poços contendo suspensão de leveduras, e com poços contendo apenas THP-1 ativadas.

A placa foi incubada por 4 horas no escuro a 37°C e 5% de CO₂ para que ocorresse o processo de fagocitose. Após o período foi adicionado formalina 10% na proporção de 1:1 nos poços para cessar a fagocitose.

4.6.5 Leitura

A fagocitose da levedura foi estabelecida contando em triplicata o número de leveduras dentro ou aderidas em 100 macrófagos na câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico (400 X de magnificação) (SILVA-ROCHA *et al.*, 2014).

4.7 Análise dos dados

Os resultados dos experimentos foram registrados em uma planilha de coleta desenvolvida no programa Microsoft Excel®, contendo as variáveis a serem estudadas. Posteriormente o ensaio de fagocitose foi analisado no software estatístico R na versão 4.1.3 e o nível de significância utilizado foi de 0.05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testadas 37 cepas da CFAM do ILMD – FIOCRUZ Amazônia, conforme tabela 1. Alguns isolados clínicos presentes na pesquisa foram identificados na sua forma teleomorfa: *Meyerozyma guilliermondii*, *Meyerozyma caribbica* e *Kodamaea ohmeri* que possui os nomes anamorfos, respectivamente: *Candida guilliermondii*, *Candida fermentati* e *Candida guilliermondii* var *membranifaciens*.

Nesta pesquisa foram realizados 3 experimentos: Fator de virulência – produção de biofilme; sensibilidade ao antifúngico anidulafungia e resistência de leveduras a fagocitose.

Para os testes de produção de biofilme e sensibilidade ao antifúngico anidulafungia foram utilizadas as 37 cepas. Para o teste e resistência a fagocitose foram selecionadas 10 cepas, de acordo com o critério de quais haviam apresentado maior poder de virulência.

Através da identificação molecular foi constatado que as duas cepas *Candida* sp. (CFAM 1467) e *Candida* sp. (CFAM 1469) são *Kodamaea ohmeri*. Como essa identificação ocorreu após a conclusão dos testes as 3 cepas de *K. ohmeri* entraram no experimento de fagocitose.

Tabela 01 - Leveduras pertencentes a Coleção CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia identificadas em nível de espécie por sequenciamento da região ITS.

Cepa	% Identidade / Similaridade	Número de acesso das cepas referência
<i>Kodamaea ohmeri</i> (CFAM 1467)	NCBI (99,76%) / CBS-KNAW (99,78%)	MF599713.1 /CNRMA7.872
<i>Kodamaea ohmeri</i> (CFAM 1469)	NCBI (99,28%) / CBS-KNAW (97,99%)	MF599713.1 /CNRMA7.872

5.1 Avaliação da produção de biofilme

Houve formação de biofilme por todas as cepas, sendo a *C. tropicalis* e a *K. ohmeri* as mais expressivas com todas suas cepas apresentando resultado positivo forte. A *C. parapsilosis* apresentou 6 cepas positivo forte. A espécie *M. guilliermondii*

apresentou 1 cepa Positivo Forte e *C. glabrata* 6 cepas Positivo Forte, como mostra a tabela 2.

Tabela 2 – Produção de biofilme das leveduras pertencentes a Coleção CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia.

Código	Espécie	Negativo	Positivo Fraco	Positivo Moderado	Positivo Forte
CFAM 1449	<i>C. glabrata</i>	-	-	Moderado	-
CFAM 1450	<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	Forte
CFAM 1451	<i>C. glabrata</i>	-	-	Moderado	-
CFAM 1452	<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	Forte
CFAM 1453	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	Forte
CFAM 1454	<i>C. glabrata</i>	-	-	Moderado	-
CFAM 1455	<i>C. glabrata</i>	-	-	Moderado	-
CFAM 1456	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	Fraco	-
CFAM 1457	<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	Forte
CFAM 1458	<i>C. albicans</i>	-	Fraco	-	-
CFAM 1459	<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	Forte
CFAM 1460	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	Moderado	-
CFAM 1461	<i>C. glabrata</i>	-	-	Moderado	-
CFAM 1463	<i>C. glabrata</i>	-	Fraco	-	-
CFAM 1464	<i>C. glabrata</i>	-	-	Moderado	-
CFAM 1465	<i>C. glabrata</i>	-	-	Moderado	-
CFAM 1466	<i>C. glabrata</i>	-	-	Moderado	-
CFAM 1467	<i>K. ohmeri</i>	-	-	-	Forte
CFAM 1468	<i>C. albicans</i>	-	-	Moderado	-
CFAM 1469	<i>K. ohmeri</i>	-	-	-	Forte
CFAM 1470	<i>C. metapsilosis</i>	-	Fraco	-	-
CFAM 1471	<i>C. albicans</i>	-	-	Moderado	-
CFAM 1473	<i>K. ohmeri</i>	-	-	-	Forte
CFAM 1476	<i>M. caribbica</i>	-	Fraco	-	-
CFAM 1477	<i>M. guilliermondii</i>	-	-	-	Forte
CFAM 1478	<i>C. glabrata</i>	-	-	-	Forte
CFAM 1479	<i>C. glabrata</i>	-	-	-	Forte
CFAM 1480	<i>C. glabrata</i>	-	-	-	Forte
CFAM 1481	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	Forte
CFAM 1482	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	Forte
Continuação da tabela 2					
Código	Espécie	Negativo	Positivo Fraco	Positivo Moderado	Positivo Forte
CFAM 1483	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	Moderado	-
CFAM 1484	<i>C. glabrata</i>	-	-	-	Forte
CFAM 1485	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	Forte
CFAM 1486	<i>C. glabrata</i>	-	-	-	Forte
CFAM 1487	<i>C. glabrata</i>	-	-	-	Forte
CFAM 1488	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	Forte

CFAM 1489 *M. guilliermondii* - - Moderado -

Na tabela 3, os resultados demonstraram que todas as espécies de *Candida* estudadas nessa pesquisa são capazes de produzir biofilme, sendo que 33 cepas foram classificadas como formadoras de biofilme moderados e fortes, fato que deve ser visto com preocupação, já que a propensão desses isolados para formar biofilme em soluções contendo glicose sugere que essa característica pode contribuir para a capacidade de *Candida spp.* aderir a dispositivos médicos e causar infecções (BRANCHINI *et al.*, 1994). Além de que as células fúngicas inseridas nos biofilmes são protegidas de estresses ambientais, incluindo defesas imunológicas do hospedeiro e tratamentos antifúngicos. Tal fato, impacta negativamente o manejo de pacientes com essas infecções, pois ocorre o aumento da resistência dessas células dentro dos biofilmes. Essas leveduras também são capazes de se dispersarem do biofilme e se tornarem responsáveis pela instalação de candidemia, grave infecção sistêmica, que acomete principalmente os pacientes imunocomprometidos (WALL *et al.*, 2019).

Tabela 3 – Produção de biofilme segundo o gênero e espécie das leveduras pertencentes a Coleção CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia.

Espécie (número de cepas)	Negativo n (%)	Positivo Fraco n (%)	Positivo Moderado n (%)	Positivo Forte n (%)
<i>C. glabrata</i> (15)	-	1 (6,7%)	8 (53,3%)	6 (40%)
<i>C. parapsilosis</i> (7)	-	1 (14,3%)	1 (14,3%)	5 (71,4%)
<i>C. tropicalis</i> (4)	-	-	-	4 (100%)
<i>C. albicans</i> (3)	-	1 (33,3%)	2 (66,7%)	-
<i>M. guilliermondii</i> (2)	-	-	1 (50%)	1 (50%)
<i>C. metapsilosis</i> (1)	-	1 (100%)	-	-
<i>S. cerevisiae</i> (1)	-	-	1 (100%)	-
<i>M. caribbica</i> (1)	-	1 (100%)	-	-
<i>K. ohmeri</i> (3)	-	-	-	3 (100%)
TOTAL	-	5 (13,5%)	13 (35,1%)	19 (51,4%)

Os biofilmes de *Candida* possuem características de desenvolvimento únicas com várias particularidades, tornando a sua formação em biomateriais implantados um processo altamente significativo clinicamente. Para o tratamento dessa formação de biofilme nestes dispositivos, muitas vezes é necessário a remoção desse dispositivo infectado através de cirurgias ou procedimentos invasivos, já que as intervenções terapêuticas raramente alcançam a cura clínica e dados de pesquisas tem mostrado que mesmo após o início da terapia adequada no tratamento dessas infecções, esses biofilmes colaboram com a manutenção da infecção positiva na corrente sanguínea por até 3 semanas. Mesmo com os tratamentos existentes, as taxas de mortalidade associadas a esses tipos de infecções permanecem altas (PEREIRA, 2015; RAMAGE; MARTÁNEZ; LÁPEZ-RIBOT, 2006).

Pereira (2015) ao caracterizar 94 isolados clínicos, provenientes de pacientes com hemocultura positivas para *Candida* de unidades hospitalares de Manaus, encontrou uma taxa de apenas 34% para formação de biofilme, divergindo desta pesquisa que encontrou em 100% da amostra. E dentre essas 32 cepas (34%) isoladas por Pereira (2015), 18,1% foram classificadas como fortemente positivas. Na espécie *C. albicans*, composta por 33 cepas, apenas em 3 (9,09%) houve formação de biofilme; fato esse que difere desta pesquisa, já que dentre 3 isolados dessa espécie encontrou produção de biofilme fracamente positivo para 1 cepa e moderadamente positivo para 2 isolados.

Banerjee, Dominic e Baliga (2015) identificaram casos de candidemia, sendo que em um total de 80 casos, 19 eram de pacientes acima de 60 anos e o fator de risco observado como mais importante foi o uso de dispositivos de acesso vascular. Entre 80 cepas de *Candida* isoladas de sangue a produção de biofilme foi encontrada em 31 cepas (38,75%), sendo que *Candida não-albicans* representou 83,87% dos casos. Entre 12 isolados de *C. tropicalis*, 8 (66,67%) foram capazes de produzir biofilme; de 22 cepas de *C. glabrata*, 9 (40,91%) formaram biofilme e entre 22 *C. albicans*, apenas 5 (22,73%) tiveram resultado positivo. Estes dados fornecem evidências de que a maioria das espécies de *Candida não-albicans*, isoladas de sangue humano têm a capacidade de produzir quantidade significativa de biofilme, sugerindo que a produção de biofilme é mais importante para cepas *não-albicans* e

que *C. albicans* possui mecanismos diferentes da produção de biofilme para estabelecer infecções da corrente sanguínea.

A espécie *C. tropicalis* tem seu biofilme caracterizado por cadeias de células com quantidades finas, mas grandes e matriz extracelular com baixas quantidades de carboidratos e proteínas. Possui uma rede densa de células de leveduras com diferentes morfologias filamentosas (ATIENCIA-CARRERA *et al.*, 2022a).

Nesta pesquisa, 4 cepas (100%) da espécie *C. tropicalis* mostraram um resultado fortemente positivo para formação de biofilme. Souza e colaboradores (2023) corroboram ao concluir no seu estudo que *C. tropicalis* é considerado um proeminente produtor de biofilme em comparação com outras espécies patogênicas de *Candida* e ainda deixam evidente que os fatores que influenciam a adesão e formação de biofilme em *C. tropicalis* incluem o ambiente e as condições de cultivo, mudança fenotípica. Ainda vale ressaltar que o crescimento do biofilme é acompanhado de resistência aos antifúngicos, principalmente aos azólicos, já que a presença de material da matriz é um importante mecanismo de resistência do biofilme nesta espécie (SOUZA *et al.*, 2023).

Outro estudo, ao avaliar o biofilme de *C. tropicalis* e *C. albicans* também demonstrou que *C. tropicalis* possui a capacidade de produzir um forte biofilme. No estudo, ainda se comparou o ciclo de vida do biofilme das duas espécies. Estes biofilmes foram analisados por até 96h e os resultados evidenciaram um maior crescimento de biofilme, produção de células viáveis e contagem total de células em *C. tropicalis*, entretanto, os biofilmes de *C. albicans* apresentaram maior área celular e maior produção de matriz celular (ATIENCIA-CARRERA *et al.*, 2022b).

Corroborando com estes dados, Martins e colaboradores (2016), ao estudarem a colonização de próteses dentárias por *Candida*, obtiveram um total de 56 isolados clínicos. A maioria se tratava de *Candida* da espécie *albicans* (35; 63%), seguido por, *C. tropicalis* (8; 14%), *C. glabrata* (7; 13%), *C. rugosa* (3; 5%), *C. parapsilosis* (2; 3%) e *C. krusei* (1; 2%). Na avaliação dos biofilmes, um total de 48 cepas foram capazes de gerar biofilmes, sendo que *C. tropicalis* em monocultivo ou co-cultivado com *C. albicans* formou biofilmes mais densos. Pereira (2015) encontrou na sua pesquisa realizada em hospitais de Manaus, 21 leveduras de *C. tropicalis* (70%) sendo

classificadas como fortemente positivas para formação de biofilme, sendo essa espécie a mais expressiva neste fator de virulência.

No entanto, Tulasidas e colaboradores (2018) avaliaram a produção de biofilme de 74 isolados obtidos de hemoculturas de pacientes com candidemia, que compreendeu 27 isolados clínicos de *C. tropicalis* (36,4%), e esta cepa apesar de apresentar um resultado positivo para formação de biofilme conforme as pesquisas citadas anteriormente, esta produção foi classificada apenas como moderada.

Em uma metanálise, a espécie *C. tropicalis* mostrou-se como a mais prevalente, seguindo por *C. krusei* e *C. glabrata*, como o segundo e terceiro mais prevalentes. A *C. glabrata* é comumente associada a infecções entre pacientes com nutrição parenteral total, doença periodontal, feridas cirúrgicas associadas à ventilação e que não cicatrizam, devido ao poder de produzir alto teor de proteína e carboidrato. Essa espécie forma biofilmes estruturados em multicamadas de blastosporos com alta coesão entre eles, mas é conhecida como a espécie que desenvolve menos biofilme (ATIENCIA-CARRERA *et al.*, 2022a).

Contudo, divergindo dessa afirmação, dentre os 15 isolados clínicos de *C. glabrata* desta pesquisa, 14 deles apresentaram-se como moderadamente e altamente positivos para formação de biofilme, sendo apenas 1 cepa classificada como positiva fraca.

A espécie *Candida parapsilosis* é um importante patógeno nosocomial que pode proliferar em altas concentrações de glicose e formar biofilmes em materiais protéticos (BRANCHINI *et al.*, 1994). Entre as 7 cepas da espécie de *C. parapsilosis* avaliadas nesta pesquisa, 5 (71,4%) apresentaram resultado fortemente positivo para formação de biofilme, 1 (14,3%) apresentou-se como moderadamente positivo e a outra cepa como fracamente positivo.

No estudo de Branchini *et al.* (1994) onde foram selecionados 31 isolados de *C. parapsilosis* de pacientes com infecções de corrente sanguínea ou de cateter e investigado a produção de biofilme através da mesma técnica utilizada nesse trabalho, foram encontrados resultados semelhantes com o desta pesquisa, com o percentual de 80% para as cepas que produziram biofilme, sendo que 67% dos isolados foram identificados como moderadamente a fortemente positivos e apenas 13% foram fracamente positivos, enquanto 20% não eram produtores de biofilme. Entretanto, em

uma dissertação em que foi utilizada a mesma técnica, realizada no estado do Amazonas, entre 16 isolados de *C. parapsilosis*, foi encontrado apenas 3 cepas (18,75%) capazes de formar biofilme (PEREIRA, 2015).

5.2 Concentração inibitória mínima (MIC)

Foram realizados testes de sensibilidade a antifúngicos (E-TEST) em 37 leveduras. O antifúngico testado foi a anidulafungina, do grupo das equinocandinas. De 37 leveduras, 3 (8,1%) apresentaram-se como não-suscetível ao antifúngico testado, como detalhado na tabela 4.

Tabela 4 – Resultado do teste de sensibilidade a anidulafungina por leveduras pertencentes a Coleção CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia.

Código	Espécie	MIC (µg/mL)	
CFAM 1449	<i>C. glabrata</i>	< 0.002	S
CFAM 1450	<i>C. tropicalis</i>	< 0.002	S
CFAM 1451	<i>C. glabrata</i>	< 0.002	S
CFAM 1452	<i>C. tropicalis</i>	< 0.002	S
CFAM 1453	<i>C. parapsilosis</i>	0.38	S
CFAM 1454	<i>C. glabrata</i>	< 0.002	S
CFAM 1455	<i>C. glabrata</i>	> 0.002	S
CFAM 1456	<i>C. parapsilosis</i>	0.047	S
CFAM 1457	<i>C. tropicalis</i>	< 0.002	S
CFAM 1458	<i>C. albicans</i>	< 0.002	S
CFAM 1459	<i>C. tropicalis</i>	< 0.002	S
CFAM 1460	<i>S. cerevisiae</i>	< 0.002	S
CFAM 1461	<i>C. glabrata</i>	0.002	S
CFAM 1463	<i>C. glabrata</i>	0.032	S
CFAM 1464	<i>C. glabrata</i>	< 0.002	S
CFAM 1465	<i>C. glabrata</i>	0.002	S
CFAM 1466	<i>C. glabrata</i>	0.004	S
CFAM 1467	<i>K. ohmeri</i>	> 32	NS
CFAM 1468	<i>C. albicans</i>	< 0.002	S
CFAM 1469	<i>K. ohmeri</i>	0.002	S
CFAM 1470	<i>C. metapsilosis</i>	0.006	S
CFAM 1471	<i>C. albicans</i>	< 0.002	S
CFAM 1473	<i>K. ohmeri</i>	< 0.002	S
CFAM 1476	<i>M. caribbica</i>	1.5	S
CFAM 1477	<i>M. guilliermondii</i>	1.0	S
CFAM 1478	<i>C. glabrata</i>	< 0.002	S

CFAM 1479	<i>C. glabrata</i>	< 0.002	S
CFAM 1480	<i>C. glabrata</i>	< 0.002	S
CFAM 1481	<i>C. parapsilosis</i>	0.064	S
CFAM 1482	<i>C. parapsilosis</i>	< 0.002	S
CFAM 1483	<i>C. parapsilosis</i>	0.064	S
CFAM 1484	<i>C. glabrata</i>	< 0.002	S
CFAM 1485	<i>C. parapsilosis</i>	0.047	S
CFAM 1486	<i>C. glabrata</i>	< 0.02	S
CFAM 1487	<i>C. glabrata</i>	< 0.002	S
CFAM 1488	<i>C. parapsilosis</i>	> 32	NS
CFAM 1489	<i>M. guilliermondii</i>	> 32	NS
ATCC 22019 ^a	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	S

Legenda: MICs = Concentrações inibitórias mínimas; S = sensível; NS = não suscetível.

Ao analisar a tabela 4, percebemos que a maioria das leveduras (91,9%) mostraram ter sensibilidade ao antifúngico anidulafungina, sendo que 100% das cepas das espécies *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. metapsilosis* apresentaram essa característica. Entretanto, um isolado clínico da espécie *C. parapsilosis* apresentou-se como não-suscetível ao antifúngico, enquanto 6 cepas desta espécie apresentaram sensibilidade; um isolado de *M. guilliermondii* e um isolado de *K. ohmeri* também não apresentaram suscetibilidade a anidulafungina.

Tabela 5 – Resultado do teste de sensibilidade a anidulafungina por espécie de leveduras pertencentes a Coleção CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia.

Espécie (número de cepas)	MICs (µg/mL)	S	NS
<i>C. glabrata</i> (15)	< 0.002 ~ 0.032	15	-
<i>C. parapsilosis</i> (7)	< 0.002 ~ <32	6	1
<i>C. tropicalis</i> (4)	> 0.002	4	-
<i>C. albicans</i> (3)	> 0.002	3	-
<i>M. guilliermondii</i> (2)	1.0 ~ <32	1	1
<i>C. metapsilosis</i> (1)	0.006	1	-
<i>S. cerevisiae</i> (1)	< 0.002	1	-
<i>M. caribbica</i> (1)	1.5	1	-
<i>K. ohmeri</i> (3)	< 0.002 ~ <32	2	1
TOTAL		34	3

Legenda: MICs = Concentração inibitória mínima; S = sensível; NS = não suscetível.

Vale ressaltar que as cepas utilizadas nesta pesquisa foram provenientes de idosos que moram em uma comunidade ribeirinha do Amazonas, lugar isolado, de difícil acesso e que muitas vezes não chega o diagnóstico e tratamento correto para diversas enfermidades. Além das tradições e costumes típicos que possuem, utilizando muitas vezes medicamentos naturais para os tratamentos de doenças. Entretanto, esses fatores não impediram que encontrássemos cepas não-suscetíveis a anidulafungina, medicamento considerado de última geração, utilizado no tratamento de candidemias.

O relatório da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (Conitec) (BRASIL, 2022), mostrou ao implementar a anidulafungina no SUS, que há evidência moderada favorável ao uso da tecnologia anidulafungina para a eficácia absoluta/chance de ser a melhor droga quando comparada a anfotericina B no tratamento da candidíase invasiva. Além disso, o relatório da Conitec cita que a anidulafungina possui menor incidência de efeitos adversos, assim diminuindo a quantidade de casos que terão os tratamentos descontinuados devido a estes efeitos.

Uma revisão mostrou que a anidulafungina pode ser utilizada em tratamento ligados a dispositivos hospitalares, como os cateteres, uma vez que foi mensurada a atividade da anidulafungina em biofilmes de 24h de maturação. Em 47 isolados de *Candida* spp. (25 *C. albicans*, 16 *C. tropicalis*, 5 *C. dubliniensis* e 1 *C. parapsilosis*), a média do MIC para os biofilmes foi de 0,325 para *C. albicans*, 2 para *C. parapsilosis* e de 0,5µg/ml para *C. dubliniensis*. A anidulafungina não apresentou atividade no biofilme de *C. tropicalis* (PEMÁN; CANTÓN; VALENTÍN, 2008).

A revisão mencionada acima corrobora com esta ao encontrar uma alta quantidade de cepas sensíveis a anidulafungina, no entanto as cepas encontradas como não-suscetíveis são diferentes quando comparadas as espécies das encontradas neste trabalho. A pesquisa de Berrio e Colaboradores (2017), também concorda com este estudo, ao encontrar suscetibilidade à anidulafungina por Etest na maioria dos isolados (93,9%), nela foi utilizado 147 isolados de pacientes com candidemia, obtidos em 15 hospitais de Medellin, sendo *C. albicans* 40,8% da amostra, seguida de *C. parapsilosis* com 23,1% e *C. tropicalis* com 17%.

Ainda corroborando com esses dados, Sutcu e colaboradores (2017) encontraram resistência nos resultados de sua pesquisa para o antifúngico

anidulafungina. Dentre 9 isolados clínicos que incluíam 4 *C. albicans*, 2 *C. parapsilosis*, 2 *C. tropicalis* e 1 *Candida lusitanae*, a cepa da espécie *C. lusitanae* demonstrou ter resistência a esse antifúngico.

Ao contrário dessa pesquisa, um estudo laboratorial prospectiva e observacional, realizada nos anos de 2007 até 2014 sobre infecções da corrente sanguínea por *Candida* do complexo *parapsilosis* não encontrou nenhuma cepa com resistência ao antifúngico anidulafungina ou aos outros antifúngicos da classe das equinocandinas, sugerindo que essas cepas são altamente suscetíveis a esse antifúngico (LOVERO *et al.*, 2016). Outro trabalho que incluiu 37 isolados clínicos de *C. parapsilosis*, 33,64% da amostra da pesquisa, mostrou que 100% dessas cepas apresentavam suscetibilidade a anidulafungina (CHEN *et al.*, 2021).

Em um experimento, onde foi simulada uma infecção em cateter (em animais) por duas cepas de *C. parapsilosis*, a anidulafungina apresentou reduções significativas da infecção em relação a anfotericina B ($P \leq 0,05$) e foi o único medicamento a alcançar culturas negativas provenientes da ponta do cateter (BASAS *et al.*, 2016).

Uma cepa de *K. ohmeri*, dentre as 3 estudadas nessa pesquisa, obteve um MIC maior que 32 e não apresentou suscetibilidade a anidulafungina. Em uma revisão que incluiu toda literatura publicada até março/2021 de quatro bancos de dados (PubMed, Embase, Web of Science e CNKI), foram encontrados 5 pacientes em que se realizou o teste de sensibilidade ao antifúngico anidulafungina, sendo que o MIC desses isolados clínicos variaram de 0,06 a 1mg/L, apresentando sensibilidade a esse medicamento (ZHOU *et al.*, 2021). Ainda há poucos estudos que investigam a eficácia clínica das equinocandinas, principalmente sobre a anidulafungina, em pacientes com infecções por *K. ohmeri*, porém há relatos de sucesso em tratamentos utilizando caspofungina e micafungina, sugerindo essa classe como uma boa alternativa de tratamento (BISWAL *et al.*, 2015).

Ainda nesta pesquisa, foi encontrada uma cepa de *M. guilliermondii* com MIC maior que 32 µg/mL, ou seja, não suscetível a anidulafungina. Em uma pesquisa, em que se testou a suscetibilidade *in vitro* de 11 leveduras do complexo *C. guilliermondii* de isolados de candidemia em um hospital, encontrou-se uma levedura com MIC maior que 8mg/L indicando não suscetibilidade ao antifúngico anidulafungina (LIU *et*

al., 2019). Pfaller e colaboradores (2005) mostraram que esse complexo é um dos menos suscetíveis a anidulafungina e entre 57 isolados resistentes ao fluconazol testados, uma taxa de 7% não apresentou suscetibilidade quando expostos a 2 µg/mL desse antifúngico.

No entanto, em uma pesquisa retrospectiva realizada nos Estados Unidos utilizando isolados de fungemia da corrente sanguínea, não foi encontrado resistência a esse antifúngico e nem a classe de equinocandinas (JUNG *et al.*, 2015). Marcos-Zambrano e colaboradores (2017) estudaram 22 casos de candidemia, causados pelo complexo *C. guilliermondii*, e não encontraram cepas resistentes a anidulafungina e micafungina, mas quando essas cepas foram comparadas com as de *C. albicans*, notou-se que o complexo *C. guilliermondii* possuem MICs maiores.

Os isolados clínicos desta pesquisa são compostos por 40,54% pela espécie *C. glabrata* e 100% das cepas dessa espécie apresentaram suscetibilidade ao antifúngico, embora essa espécie tenha sido relatada em outros estudos como a que apresenta maior resistência as equinocandinas. Entretanto, ela tem demonstrado resistência, particularmente, em pacientes gravemente enfermos que recebem essa terapia a longo prazo e assim ganham resistência (ARENDRUP; PERLIN, 2014; SHIELDS *et al.*, 2013). Em uma pesquisa que incluiu 9 cepas de *C. glabrata*, 8,18% dos isolados, 1 cepa não apresentou suscetibilidade aos antifúngicos da classe das equinocandinas: anidulafungina, caspofungina e micafungina (CHEN *et al.*, 2021).

Como mostra a pesquisa de Alexander e colaboradores (2013), que isolou 313 cepas de 293 casos de candidemia por *C. glabrata* e constatou que a resistência às equinocandinas aumentou de 4,9% para 12,3% entre 2001 e 2010 para essa espécie, sendo que o maior preditor para a resistência foi a uso anterior de equinocandinas. No entanto, Aigner e colaboradores (2017) encontraram apenas 1 isolado da espécie *C. glabrata* apresentando resistência, dentre 104 cepas de *Candida* obtidos de hemoculturas de um hospital na Áustria.

Quanto a efetividade dos tratamentos utilizando a anidulafungina, ao comparar a anidulafungina, micafungina, caspofungina e fluconazol em pacientes com candidemia em UTI's a anidulafungina foi a mais eficaz e resultou em mais sucessos terapêuticos (68,81%) do que a micafungina (65,27%), caspofungina (64,23%) ou fluconazol (49,08%), além que de acordo com o estudo econômico, a anidulafungina

produziu economia em comparação com micafungina e caspofungina nestes pacientes adultos (GRAU *et al.*, 2015).

5.3. Resistência a fagocitose

Para o ensaio de resistência a fagocitose, foram selecionadas 10 cepas, sendo uma de cada espécie, representadas na tabela 6, com exceção da *K. ohmeri* conforme justificativa relatada anteriormente. Essas cepas já foram caracterizadas para a produção de enzimas e resistência a antifúngicos azólicos e AMB por Goiabeira (2022) cujos resultados também foram levados em consideração na análise, juntamente com os testes realizados nesta pesquisa.

Tabela 6 – Média de células fagocitadas por 100 macrófagos THP-1 das leveduras pertencentes a Coleção CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia.

Código	Espécies	Média de leveduras fagocitadas por 100 macrófagos (desvio padrão)	
CFAM 1468	<i>C. albicans</i>	35,6 ^a	(± 4,0)
CFAM 1478	<i>C. glabrata</i>	56,6 ^a	(± 24,9)
CFAM 1488	<i>C. parapsilosis</i>	55,6 ^a	(± 13,3)
CFAM 1459	<i>C. tropicalis</i>	55,0 ^{ab}	(± 14,1)
CFAM 1469	<i>K. ohmeri</i>	21,0 ^{ab}	(± 7,0)
CFAM 1467	<i>K. ohmeri.</i>	20,0 ^{ab}	(± 4,5)
CFAM 1473	<i>K. ohmeri</i>	26,0 ^{ab}	(± 8,7)
CFAM 1476	<i>M. caribbica</i>	41,3 ^{ab}	(± 10,0)
CFAM 1489	<i>M. guilliermondii</i>	33,3 ^b	(± 9,8)
CFAM 1460	<i>S. cerevisiae</i>	45,3 ^b	(± 1,5)

Na tabela 6, quando analisamos as letras encontradas em cada cepa, podemos observar que algumas apresentam diferença estatisticamente significativa entre si. Letras iguais significam que são semelhantes entre si e letras distintas apontam diferenças. Ainda é possível visualizar, na tabela 6, que a cepa de *C. glabrata* possui a maior média, com o maior número de leveduras aderidas (figura 1A) ou inseridas (figura 1B) nos macrófagos, seguido de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, o que significa que possuem menor resistência a fagocitose. Essas cepas não diferem entre si, juntamente com as cepas da *M. caribbica*, *C. albicans* e *K. ohmeri*. Contudo, essas 3 primeiras cepas citadas diferem estatisticamente de *M. guilliermondii* e *S. cerevisiae*.

A cepa da *M. caribbica*, *C. albicans* e as três *K. ohmeri* também não diferem estatisticamente entre si e nem das cepas *M. guilliermondii* e *S. cerevisiae*. As cepas de *K. ohmeri* apresentaram as menores médias de leveduras fagocitadas por 100 macrófagos, significando que essas cepas possuem maior resistência a fagocitose.

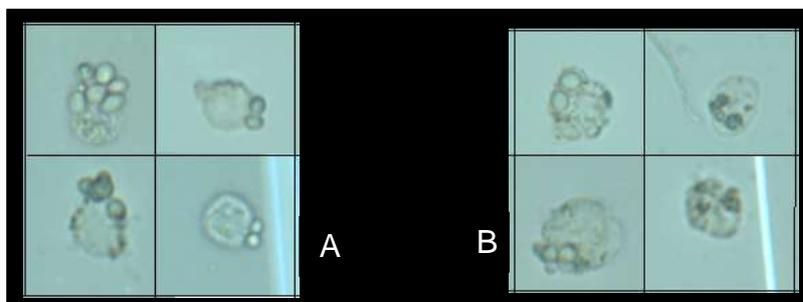


Figura 1 – Células de leveduras pertencentes a Coleção CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia aderidas (A) e no interior dos macrófagos (inseridas) (B) (400x).

Durante a análise microscópica das cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram observadas a emissão de filamentos, como mostra a figura 2. De acordo com Silva (2013), essa característica de filamentação auxilia a redução do ataque das células fagocíticas, causando a evasão do sistema imune. No entanto, em nossa pesquisa *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* apresentaram médias altas para fagocitose de leveduras, indicando que apresentam baixa resistência a fagocitose, quando comparadas a outras leveduras como *M. guilliermondii* e *S. cerevisiae*.

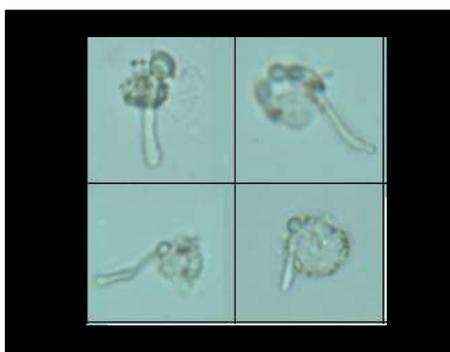


Figura 2 – Blastosporos de *Candida* da Coleção CFAM ILMD/Fiocruz Amazônia emitindo tubos germinativos no interior ou aderidas a células fagocíticas (400x).

A presença de hifas é considerada um fator de virulência, porém existem outros fatores, como a produção das enzimas: fosfolipase, protease, hemolisina e urease, além da formação de biofilme, que já foi discutido nesta pesquisa. Esses outros fatores de virulência foram apresentados na pesquisa de Goiabeira (2022) para essas cepas. Nela foi mostrado que uma das cepas com uma das maiores médias, *C. parapsilosis* não apresentou produção de nenhuma enzima, mostrando que com apenas a capacidade de produzir hifas não é possível resistir a fagocitose no ensaio. No entanto, o isolado de *C. tropicalis*, outra cepa com a capacidade de emitir filamentos, foi capaz de produzir hemolisina (muito forte) e protease (forte) e mesmo assim apresentou baixa resistência a fagocitose.

Já a cepa de *C. albicans* foi capaz de produzir fosfolipase e hemolisina e essas produções foram classificadas como uma atividade muito forte (GOIABEIRA, 2022). Essa cepa foi a única entre as 3 com a capacidade de produzir fosfolipase, enzima responsável por usar os fosfolipídios presentes na membrana das células humanas como substratos, e apresentou média menor de resistência a fagocitose quando comparada com *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, porém sem diferença estatisticamente significativa entre elas.

As cepas de *K. ohmeri* apresentaram as menores médias, tendo um maior poder de resistir a fagocitose, porém sem diferença significativa entre elas e outras cepas. Ao analisar a produção de enzimas, elas apresentam em comum a capacidade de produzir hemolisina, a cepa CFAM 1467 com classificação forte e as demais muito forte. Elas não foram capazes de produzir outro tipo de enzima, com exceção da cepa CFAM 1469, que produziu protease (muito forte) (GOIABEIRA, 2022).

O isolado de *C. glabrata*, apresentou uma média alta de 56,6, com baixo poder de escapar das células fagocíticas, diferindo estatisticamente de *M. guilliermondii* e *S. cerevisiae*. Galocha e colaboradores (2019) apontam que essa espécie escapa de células fagocíticas através de uma estratégia de persistência, replicando-se dentro dos fagócitos e, eventualmente, levando à morte celular devido à carga fúngica, em vez de escapar ativamente por meio de enzimas. A *C. glabrata* é considerada uma das espécies *Candida* não-*albicans* mais comuns nos episódios de infecções da corrente sanguínea por *Candida*, responsável por 13% a 29% das candidemias (SOUZA *et al.*, 2022).

Uma cepa de *K. ohmeri* (anamorfa *C. guilliermondii* var *membranifaciens*), obteve uma média de 26, enquanto as outras obtiveram 20 e 21; médias baixas quando comparadas com as demais. Essa espécie tem sido considerada um patógeno emergente com várias infecções invasivas relatadas nos últimos anos. Em uma revisão entre infecções por *K. ohmeri* as infecções invasivas representaram a maioria: 62 casos de 67 (92,5%). Entre as infecções invasivas, 46 eram fungemia (74,2%). Dentre todos os casos, 31 (46,3%) dos pacientes haviam sido implantados com pelo menos um tipo de cateter e 15 (22,4%) dos pacientes receberam traqueostomia ou ventilação mecânica, além de estarem sob terapia imunossupressora, recebendo quimioterápicos e corticosteróides. A prematuridade também foi um importante fator de risco para neonatos, onde 10 (90,9%) dos neonatos nascidos prematuros desenvolveram infecções esporádicas por *K. ohmeri* (ZHOU *et al.*, 2021).

Ainda há relatos de dois surtos de infecções por *K. ohmeri*, incluindo um na China, onde houve o acometimento de 6 neonatos prematuros por fungemia, e outro na Turquia, onde houve o acometimento de 2 crianças por fungemia (OTAG *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2012). Em 2020, surgiu o primeiro relato de caso de fungemia causada por essa levedura no estado do Amazonas, a paciente se tratava de uma criança de 3 anos, do gênero feminino, que se encontrava internada em um hospital da rede privada da cidade de Manaus. A infecção foi identificada após o uso de um cateter venoso central para realização de terapia antimicrobiana, o tratamento da infecção invasiva foi realizado com o medicamento anfotericina B desoxicolato e o dispositivo médico foi removido (NASCIMENTO *et al.*, 2020).

As espécies *M. guilliermondii* (anamorfa *C. guilliermondii*) e *M. caribbica* (anamorfa *C. fermentati*) fazem parte do complexo *Candida guilliermondii*. *C. guilliermondii* também é considerada um patógeno emergente, sendo que no Brasil já é considerada como causadora de até 10% dos casos das candidemias. A maior preocupação em relação a essa espécie é por ela possuir suscetibilidade diminuída aos tratamentos realizados por medicamentos polienos (anfotericina B) e azóis (fluconazol e itraconazol) (SANDVEN, 2000). Nesse ensaio, *M. guilliermondii* apresentou uma média intermediária de 33,3 e apresentou diferença estatística significativa com *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, apresentando poder de resistir a fagocitose.

O isolado de *Meyerozyma caribbica* (anamorfa *Candida fermentati*) obteve a média de 41,3, não apresentou diferença significativa entre as outras cepas, e de acordo com Goiabeira (2022) ela não tem a capacidade de produzir nenhuma enzima. Essa espécie é considerada menos frequente em infecções e parece não apresentar resistência a antifúngicos, diferente de *M. guilliermondii* (PFALLER *et al.*, 2006).

As infecções de corrente sanguínea pela espécie *S. cerevisiae* em UTI são consideradas raras, sendo chamada por SILVA e colaboradores (2011), em um caso descrito no Rio de Janeiro, como atípica. Nesse relato houve associação dessa levedura com uma do gênero *Candida*, que normalmente acarreta alta taxa de mortalidade. Os fatores de risco são comuns ao das candidemias, mas na fungemia por *S. cerevisiae*, um fator de risco exclusivo é a utilização prévia do probiótico *Saccharomyces boulardii*, utilizado no tratamento de diarreias. No ensaio de fagocitose realizado neste estudo, essa cepa apresentou média de 45,3, diferindo estatisticamente de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Além de ter a capacidade de produzir fosfolipase, protease e hemolisina, todas com atividade muito forte (GOIABEIRA, 2021).

6. CONCLUSÃO

As cepas estudadas são leveduras oportunistas com características de virulência e, portanto, merecem atenção especialmente as cepas de espécies de leveduras consideradas emergentes:

- Os resultados mostraram que entre as leveduras testadas há fortes produtoras de biofilme que indica que essas cepas têm potencial para a colonização de dispositivos invasivos.
- Apesar da anidulafungina ser um antifúngico de última geração, os resultados mostraram cepas que não foram suscetíveis, corroborando que há a necessidade de avaliação dos antifúngicos sempre que há a infecção para ter a melhor estratégia de tratamento.
- O teste de fagocitose mostrou que as cepas de *Kodamaea ohmeri* analisadas apresentaram as menores médias de células fagocitadas e estatisticamente apresentaram uma resistência a fagocitose semelhante as cepas de espécies comumente envolvidas em fungemia.

REFERÊNCIAS

AHANGARKANI, F. et al. Candidemia due to *Candida guilliermondii* in an immunocompromised infant: a case report and review of literature. **Current Medical Mycology**, 12 mar. 2019.

AIGNER, M. et al. Etest and Sensititre YeastOne Susceptibility Testing of Echinocandins against *Candida* Species from a Single Center in Austria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 8, p. e00512-17, ago. 2017.

ALDO, P. B. et al. Effect of Culture Conditions on the Phenotype of THP-1 Monocyte Cell Line. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 70, n. 1, p. 80–86, jul. 2013.

ALENCAR, Carol Falcão de Carvalho. **Condições de saúde bucal da população idosa em uma comunidade rural do Amazonas**. 2018. 104 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, 2018.

ALEXANDER, B. D. et al. Increasing Echinocandin Resistance in *Candida glabrata*: Clinical Failure Correlates With Presence of FKS Mutations and Elevated Minimum Inhibitory Concentrations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 12, p. 1724–1732, 15 jun. 2013.

ANDREOLA, P. et al. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 45, n. 4, p. 219–226, 1 set. 2016.

ARAUJO, R.; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal Resistance: Cellular and Molecular Mechanisms. Em: AHMAD, I. et al. (Eds.). **Combating Fungal Infections**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 125–145.

ARAÚJO-PASSOS, Shirley Maria de. **Prevalência de *Candida* spp. na cavidade oral de pacientes com e sem prótese dentária atendidos nas Unidades Básicas de Saúde da cidade de Manaus-Am**. 2009. 118 f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias da Amazônia) - Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz; Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

ARENDRUP, M. C.; PERLIN, D. S. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 484–492, dez. 2014.

ATIENCIA-CARRERA, M. B. et al. Evaluation of the biofilm life cycle between *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 953168, 18 ago. 2022b.

ATIENCIA-CARRERA, M. B. et al. Prevalence of biofilms in *Candida* spp. bloodstream infections: A meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 17, n. 2, p. e0263522, 3 fev. 2022a.

AVILA, M.; OJCIUS, D. M.; YILMAZ, Ö. The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. **DNA and Cell Biology**, v. 28, n. 8, p. 405–411, ago. 2009.

BANERJEE, B.; DOMINIC R.M, S.; BALIGA, S. Clinico-microbiological study of candidemia in a tertiary care hospital of southern part of India. **Iran J Microbiol.**, v. 7, n. 1, p. 55–61, fev. 2015.

BASAS, J. et al. Efficacy of anidulafungin in the treatment of experimental *Candida parapsilosis* catheter infection using an antifungal-lock technique. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 10, p. 2895–2901, out. 2016.

BENJAMIN, D. K. *et al.* Neonatal Candidiasis Among Extremely Low Birth Weight Infants: Risk Factors, Mortality Rates, and Neurodevelopmental Outcomes at 18 to 22 Months. **Pediatrics**, v. 117, n. 1, p. 84–92, 1 jan. 2006.

BERRIO, I. et al. Comparative study of *Candida* spp. isolates: Identification and echinocandin susceptibility in isolates obtained from blood cultures in 15 hospitals in Medellín, Colombia. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 13, p. 254–260, jun. 2018.

BESSA, Ellen Roberta Lima. **Estudo Comparativo das Condições Clínicas e Microbiológicas da Saúde Bucal de Idosos Residentes em Áreas Rurais e Urbanas no Município de Tefé – Amazonas**. 2019. 132 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, 2019.

BISWAL, D. et al. *Kodameae ohmeri* – An Emerging Yeast: Two Cases and Literature Review. **JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH**, 2015.

BRANCHINI, M. L. *et al.* Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 452–456, fev. 1994.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Documento de referência para o Programa Nacional de Segurança do Paciente**. Brasília, 2014.
BRASIL. Ministério da Saúde. **Relatório de recomendação: Anidulafungina para tratamento de pacientes com candidíase invasiva**. [Brasília]: MS, 2022.

CAMPO, M. Características do Microbioma Bucal Humano. **J Dent Pub H**, v. 9, n. 2, p. 145–155, 2018.

CAMPOS, T. *et al.* Avaliação do comportamento de leveduras do gênero *Candida* a fármacos antifúngicos. **Revista Ciencia & Inovação - FAM**, v. 5, n. 1, jun. 2020.

CASTANHO, J. C. P. **A diabetes mellitus e o microbioma oral**. Orientador: Nuno Taveira. 2015. Dissertação (Mestrado em Medicina Dentária) – Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, 2015.

CASTELO BRANCO, P. V. G. *et al.* PREVALÊNCIA E PRODUÇÃO DE EXOENZIMAS POR ESPÉCIES DE *Candida* PROVENIENTES DA MUCOSA BUCAL DE PACIENTES COM AIDS E INDIVÍDUOS HÍGIDOS. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 4, 18 dez. 2012.

CENDEJAS-BUENO, E. *et al.* Identification of Pathogenic Rare Yeast Species in Clinical Samples: Comparison between Phenotypical and Molecular Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1895–1899, maio 2010.

CHANPUT, W.; MES, J. J.; WICHERS, H. J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 37–45, nov. 2014.

CHEN, J. *et al.* Molecular Epidemiology, Antifungal Susceptibility, and Virulence Evaluation of *Candida* Isolates Causing Invasive Infection in a Tertiary Care Teaching Hospital. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 721439, 15 set. 2021.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599–607, out. 2003.

CORRÊA, Marcelo Augusto da Eira. **Estudo da incidência de candidemia e diversidade genética de *Candida* em pessoas internadas em Unidades Hospitalares de Manaus - Amazonas**. 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

CRUVINEL, W. D. M. *et al.* Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434–447, ago. 2010.

DUPUY, A. K. *et al.* Redefining the Human Oral Mycobiome with Improved Practices in Amplicon-based Taxonomy: Discovery of *Malassezia* as a Prominent Commensal. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e90899, 10 mar. 2014.

FLEIT, H. B.; KOBASIUK, C. D. The Human Monocyte-Like Cell Line THP-1 Expresses FcγRI and FcγRII. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 49, n. 6, p. 556–565, 1 jun. 1991.

FREIRE, J. C. G. *et al.* Lesões orais em Idosos usuários de prótese dentária: uma revisão de escopo. **Revista de Enfermagem e Atenção à Saúde**, v. 12, n. 1, 3 abr. 2023.

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, p. 2345, 11 maio 2019.

GAMA, Thais Moreira. **Micobiota oral e fungemia: análise da possível relação em pacientes neonatais e pediátricos internados em UTI**. 2022. 137 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, 2022.

GARDIZANI, T. P. **Imunossenescência e *Candida albicans*: avaliação da capacidade fagocítica e produção intracelular de substâncias microbidas por monócitos e macrófagos**. Orientador: Vanessa Souza Lara. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2014.

GERMANO, V. E. *et al.* MICROORGANISMOS HABITANTES DA CAVIDADE ORAL E SUA RELAÇÃO COM PATOLOGIAS ORAIS E SISTÊMICAS: REVISÃO DE LITERATURA. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 16, n. 2, p. 91–99, 2018.

GHANNOUM, M. A.; MUKHERJEE, P. K. The Human Mycobiome and its Impact on Health and Disease. **Current Fungal Infection Reports**, v. 7, n. 4, p. 345–350, dez. 2013.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225–234, jun. 2010.

GOIABEIRA, Clarice Virginia Santos. **Fatores de virulência e sensibilidade a antifúngicos de espécies de leveduras clínicas e ambientais da comunidade ribeirinha Lago do Limão – Iranduba-AM**. 2022. 52 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, 2022.

GONÇALVES, L. F. *et al.* Higienização de Próteses Totais e Parciais Removíveis. **R bras ci Saúde**, v. 15, n. 1, p. 87–94, 2011.

GORDON, S.; PLÜDDEMANN, A.; MARTINEZ ESTRADA, F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. **Immunological Reviews**, v. 262, n. 1, p. 36–55, nov. 2014.

GOULART, L. *et al.* Fatores de Virulência de *Candida albicans* Isoladas da Mucosa Oral de Pacientes HIV Positivo. **REVISTA INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE E BIOLÓGICAS – RICSBS**, v. 1, n. 01, 6 dez. 2017.

GOW, N. A. R. *et al.* *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 112–122, fev. 2012.

GRAU, S. *et al.* Cost-effectiveness of three echinocandins and fluconazole in the treatment of candidemia and/or invasive candidiasis in nonneutropenic adult patients. **ClinicoEconomics and Outcomes Research**, p. 527, out. 2015.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 5–10, jun. 2014.

HAAS, A. The Phagosome: Compartment with a License to Kill. **Traffic**, v. 8, n. 4, p. 311–330, abr. 2007.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios. Rio de Janeiro: IBGE, 2022.

JUNG, D. S. *et al.* Uncommon *Candida* Species Fungemia among Cancer Patients, Houston, Texas, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 11, out. 2015.

LARKIN, E. L.; DHARMAIAH, S.; GHANNOUM, M. A. Biofilms and beyond: expanding echinocandin utility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. suppl_1, p. i73–i81, 1 jan. 2018.

LATOUCHE, G. N. *et al.* Comparison of use of phenotypic and genotypic characteristics for identification of species of the anamorph genus *Candida* and related teleomorph yeast species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 12, p. 3171–3180, dez. 1997.

LEAW, S. N. *et al.* Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 693–699, mar. 2006.

LEITE, D. P.; PIVA, M. R.; MARTINS-FILHO, P. R. S. Identificação das espécies de *Candida* em portadores de estomatite protética e avaliação da susceptibilidade ao miconazol e à terapia fotodinâmica. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 44, n. 1, p. 12–17, fev. 2015.

LI, F. *et al.* A Risk Prediction Model for Invasive Fungal Disease in Critically Ill Patients in the Intensive Care Unit. **Asian Nursing Research**, v. 12, n. 4, p. 299–303, dez. 2018.

LIONAKIS, M. S.; NETEA, M. G. *Candida* and Host Determinants of Susceptibility to Invasive Candidiasis. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, p. e1003079, 3 jan. 2013.

LIU, C. *et al.* Clinical features and homological analysis of *Pichia ohmeri*-caused hospital-acquired fungemia in premature infants. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 4, n. 93, p. 285–288, 2013.

LIU, W.-L. *et al.* Clinical manifestations of candidemia caused by uncommon *Candida* species and antifungal susceptibility of the isolates in a regional hospital in Taiwan, 2007–2014. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 52, n. 4, p. 612–619, ago. 2019.

LONA-REYES, J. C. *et al.* Incidencia y factores asociados a candidiasis invasiva en una unidad de cuidados intensivos neonatales de México. **Anales de Pediatría**, v. 97, n. 2, p. 79–86, ago. 2022.

LOVERO, G. *et al.* Molecular Identification and Echinocandin Susceptibility of *Candida parapsilosis* Complex Bloodstream Isolates in Italy, 2007–2014. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0150218, 26 fev. 2016.

LUND, M. E. *et al.* The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. **Journal of Immunological Methods**, v. 430, p. 64–70, mar. 2016.

MANTADAKIS, E.; TRAGIANNIDIS, A. Invasive Fungal Infections in the Pediatric Intensive Care Unit. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 38, n. 9, p. e216–e218, set. 2019.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J. *et al.* *Candida guilliermondii* Complex Is Characterized by High Antifungal Resistance but Low Mortality in 22 Cases of Candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7, p. e00099-17, jul. 2017.

MARIANI, T.; SILVA, S.; CARLI, J. Prevalência de candidose bucal em pacientes hospitalizados e avaliação de fatores de risco. **Salusvita**, v. 35, n. 3, p. 379–537, abr. 2016.

MARTINS, C. H. G. *et al.* *Candida/Candida* biofilms. First description of dual-species *Candida albicans/C. rugosa* biofilm. **Fungal Biology**, v. 120, n. 4, p. 530–537, abr. 2016.

MELO, L. L. S. D. *et al.* Flora fúngica no ambiente da Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica e Neonatal em hospital terciário. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 27, n. 3, p. 303–308, set. 2009.

MONTEIRO-DA-SILVA, F.; ARAUJO, R.; SAMPAIO-MAIA, B. Interindividual variability and intraindividual stability of oral fungal microbiota over time. **Medical Mycology**, v. 52, n. 5, p. 498–505, 1 jul. 2014.

NASCIMENTO, V. *et al.* Fungemia due to the rare fungal pathogen *Kodamaea ohmeri* in a pediatric patient in Amazonia. **Scientia Amazonia**, v. 9, n. 1, p. 11–15, 2020.

NISHIDA, R. *et al.* Breakthrough candidemia with hematological disease: Results from a single-center retrospective study in Japan, 2009–2020. **Medical Mycology**, v. 61, n. 6, p. myad056, 5 jun. 2023.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. Risk Factors for Breakthrough Candidemia. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 209–211, mar. 2002.

O'BRIEN, C. E. *et al.* Identification of a novel *Candida metapsilosis* isolate reveals multiple hybridization events. **G3 Genes|Genomes|Genetics**, v. 12, n. 1, p. jkab367, 4 jan. 2022.

OLIVER, J. C. **Análise da expressão gênica diferencial de aspartato proteases secretadas (SAP2 e SAP4) por *Candida albicans* exposta a concentrações subinibitórias de antifúngicos e contato com macrófagos.** Orientador: Amanda Latercia Tranches Dias. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2016.

ORLANDINI, R. K. *et al.* Are *Candida albicans* isolates from the oral cavity of HIV-infected patients more virulent than from non-HIV-infected patients? Systematic review and meta-analysis. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104477, dez. 2020.

OTAG, F. *et al.* An outbreak of *Pichia ohmeri* infection in the paediatric intensive care unit: case reports and review of the literature. **Mycoses**, v. 48, n. 4, p. 265–269, jul. 2005.

OZKAN, S. *et al.* Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 3, p. 319–324, maio 2005.

PACHECO, F.; CARDOSO, E. Imunidade Inata e inflamação. Em: **Fundamentos de Imunologia**. 2. ed. Lisboa: LIDEL-Edições Técnicas, 2012. p. 57–102.

PAMMI, M. *et al.* *Candida parapsilosis* Is a Significant Neonatalpa Pathogen: A Systematic Review and Meta-analysis. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 5, p. e206–e216, maio 2013.

PAPPAS, P. G. *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1–e50, 15 fev. 2016.

PARK, E. K. *et al.* Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. **Inflammation Research**, v. 56, n. 1, p. 45–50, jan. 2007.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; VALENTÍN, A. Actividad de la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 2, p. 124–128, jun. 2008.

PEREIRA, Vivian do Nascimento. **Perfil epidemiológico de pacientes com candidemias em 11 hospitais de Manaus e avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos e fatores de virulência de *Candida spp.*** 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 9, p. 603–616, set. 2017.

PFALLER, M. A. et al. *Candida guilliermondii*, an Opportunistic Fungal Pathogen with Decreased Susceptibility to Fluconazole: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3551–3556, out. 2006.

PFALLER, M. A. et al. In Vitro Activities of Anidulafungin against More than 2,500 Clinical Isolates of *Candida* spp., Including 315 Isolates Resistant to Fluconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5425–5427, nov. 2005.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Rare and Emerging Opportunistic Fungal Pathogens: Concern for Resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4419–4431, out. 2004.

POISSY, J. et al. Risk factors for candidemia: a prospective matched case-control study. **Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 109, dez. 2020.

QUEIROZ, Izabella Nobre. **Diversidade de *Candida* spp. na cavidade oral em pacientes com Câncer de Cabeça e Pescoço em tratamento radioterápico**. 2021. 97 f. Dissertação (Mestrado em Infectologia e Medicina Tropical) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte, 2021.

RAMAGE, G. et al. *Candida* Biofilms: an Update. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 4, p. 633–638, abr. 2005.

RAMAGE, G.; MARTÁNEZ, J. P.; LÃ³PEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 7, p. 979–986, nov. 2006.

REVIE, N. M. et al. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 70–76, out. 2018.

ROCHA, W. R. V. D. et al. Gênero *Candida* - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e43910414283, 17 abr. 2021.

RUSSELL, D. G. et al. The macrophage marches on its phagosome: dynamic assays of phagosome function. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 8, p. 594–600, ago. 2009.

SACHIVKINA, N.; PODOPRIGORA, I.; BOKOV, D. Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida glabrata* biofilms, and response to farnesol. **Veterinary World**, p. 1608–1614, 22 jun. 2021.

SANDVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Rev Iberoam Micol**, n. 17, p. 73–81, 2000.

SASANI, E. *et al.* Virulence Factors and Azole-Resistant Mechanism of *Candida Tropicalis* Isolated from Candidemia. **Mycopathologia**, v. 186, n. 6, p. 847–856, dez. 2021.

SCAMARDO, M. S. *et al.* Trends, risk factors and outcomes of healthcare-associated infections in a neonatal intensive care unit in Italy during 2013–2017. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 46, n. 1, p. 34, dez. 2020.

SCHADECK, R.; MENDONÇA, M. Aprendendo com Macrófagos: fagocitose e outras coisas. **NUEPE**, p. 02–15, 2013.

SHIELDS, R. K. *et al.* Caspofungin MICs Correlate with Treatment Outcomes among Patients with *Candida glabrata* Invasive Candidiasis and Prior Echinocandin Exposure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3528–3535, ago. 2013.

SIEWEKE, M. H.; ALLEN, J. E. Beyond Stem Cells: Self-Renewal of Differentiated Macrophages. **Science**, v. 342, n. 6161, p. 1242974, 22 nov. 2013.

SILVA, D. M. D. *et al.* Virulence factors of *Candida* species from the oral mucosa and prostheses of elderly people from a riverside community in the Amazon state, Brazil. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 48, p. e20190094, 2019.

SILVA, F. H. A. D. *et al.* Infecção por *Saccharomyces cerevisiae*: uma infecção atípica em UTI. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 1, p. 108–111, mar. 2011.

SILVA, H. Y. W.; FREITAS, F. T. D. M. Invasive candidiasis in a Brazilian neonatal intensive care unit. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 21, n. 2, p. 547–552, jun. 2021.

SILVA, Walicyranison Plinio da. **Características genotípicas e fenotípicas de *Candida Albicans* isoladas da cavidade bucal de pacientes transplantados renais com ênfase na ação do extrato bruto de *Eugenia uniflora* em fatores de virulência**. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado em Bioanálises e Medicamentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

SILVA-ROCHA, W. P. *et al.* *Candida* species distribution, genotyping and virulence factors of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil. **BMC Oral Health**, v. 14, n. 1, p. 20, dez. 2014.

SIMÕES, R.; FONSECAII, P.; FIGUEIRAL, M. H. Infecções por *Candida* spp na Cavidade Oral. **Odontol. Clín.-Cient. (Online)**, v. 12, n. 1, p. 19–22, mar. 2013.

SINGARAVELU, K.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, J. D. Genetic determinants of virulence – *Candida parapsilosis*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 16–21, jan. 2014.

SIQUEIRA, Giselle Diniz Guimarães. **Fatores de virulência de Candida em pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados em um centro de referência do estado do Amazonas**. 2021. 90 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, 2021.

SIQUEIRA, J. *et al.* Candidíase oral em pacientes internados em UTI. **Revista brasileira de Odontologia**, v. 71, n. 2, p. 176–9, dez. 2014.

SOUZA, C. M. *et al.* Adhesion and biofilm formation by the opportunistic pathogen *Candida tropicalis*: what do we know? **Canadian Journal of Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 207–218, 1 jun. 2023.

SOUZA, J. D. S. *et al.* A incidência de doenças causada por leveduras *Candida albicans*, *glabrata* e *tropicalis*: The incidence of diseases caused by yeast *Candida albicans*, *glabrata* and *tropicalis*. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 11, p. 76325–76338, 30 nov. 2022.

SUTCU, M. *et al.* Evaluation of *Candida* species and antifungal susceptibilities among children with invasive candidiasis. **Türk Pediatri Arşivi**, v. 52, n. 3, p. 145–153, 11 out. 2017.

TALAPKO, J. *et al.* *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 79, 22 jan. 2021.

TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606–625, out. 2008.

TULASIDAS, S. *et al.* A study on biofilm production and antifungal drug resistance among *Candida* species from vulvovaginal and bloodstream infections. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 11, p. 2443–2448, nov. 2018.

VIVAS, W. **Manual Prático de Hematologia**, 2014. Disponível em: <<https://docente.ifsc.edu.br/rosane.aquino/MaterialDidatico/AnalisesClinicas/hemato/Manual%20de%20Hematologia.pdf>>. Acesso em: 2 jan. 2023

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

WINGETER, M. A. *et al.* Identificação microbiológica e sensibilidade in vitro de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 272–276, jun. 2007.

YANG, J. *et al.* Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomarker Research**, v. 2, n. 1, p. 1, dez. 2014.

ZARDO, V; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* SP. **NewLab**, n. 63, p. 136–146, 2004.

ZHOU, M. et al. *Kodamaea ohmeri* as an Emerging Human Pathogen: A Review and Update. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 736582, 10 set. 2021.