

Biofilmes em infecção por *Candida*: uma revisão da literatura

Biofilmes in infection by Candida: a review of the literature

Luciana Teresinha Adams Langer¹; Keli Jaqueline Staudt²; Raiza Lima do Carmo²; Izabel Almeida Alves³

¹Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI); ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (UFRGS); ³Programa de Pós-Graduação Ciências Farmacêuticas (UFRGS)

RESUMO

Objetivo: realizar uma revisão narrativa apresentando alguns resultados de pesquisas sobre a formação de biofilmes por espécies do gênero *Candida*. **Materiais e Métodos:** As etapas de realização desta revisão narrativa foram: definição da questão norteadora; seleção dos artigos para o estudo; elaboração do quadro sinóptico com as principais informações de cada artigo; análise dos achados de acordo com os critérios estabelecidos; apresentação dos resultados e conclusões. A busca pelos artigos foi realizada nas seguintes bases: SciELO, LILACS Pubmed, Science Direct, Web of Science e Google Acadêmico. **Conclusão:** Percebe-se que os biofilmes de *Candida* são um potencial mecanismo de virulência de extrema importância, dada a sua incidência e sua difícil erradicação, visto o pequeno arsenal de antifúngicos disponível e a elevada resistência desenvolvida por estes microrganismos, o que torna necessária a busca por novas alternativas para o controle destas infecções.

Descritores: *Biofilmes; Candida; Antifúngicos.*

ABSTRACT

Objective: The aim of the study was a narrative review presenting some results of research on biofilm formation by species of *Candidas*. **Materials and Methods:** This study was characterized as a literature narrative review. The stages of realization of this integrative review were: defining the research question; selection of items for the study; preparing the summary table with key information of each article; analysis of findings according to established criteria; presentation of results and conclusions. The search for articles was conducted in the following databases: SciELO, LILACS and Google Scholar. **Conclusion:** It is noticed that the *Candida* are a potential virulence mechanism of extreme importance, given its impact and it's difficult to eradicate, because the small antifungal arsenal available and high resistance developed by these microorganisms, which makes it necessary to search for new alternatives to control this infection.

Descriptors: *Biofilms. Candida. Antifungals.*

INTRODUÇÃO

Durante muito tempo acreditava-se que micro-organismos vivessem apenas de maneira planctônica, crescendo e circulando isoladamente em meios ricos nutricionalmente⁽¹⁾. No entanto, na década de cinquenta, descobriu-se que eles poderiam crescer em colônias estruturadas denominadas biofilmes⁽²⁾. Contudo, somente em 1970 é que mais estudos preocupados em identificar e entender a formação de biofilmes começaram a surgir de maneira a compreender essa forma de crescimento microbiano⁽³⁾.

Em geral, biofilmes são descritos como sendo uma matriz polimérica, aderida a uma superfície sólida, envolta das colônias, quase sempre imersa em meio líquido e que é, essencialmente, constituída por um aglomerado de células microbianas e pelos seus produtos de excreção substâncias poliméricas extracelulares (*extracellular polymeric substances - EPS*)⁽⁴⁻⁵⁾.

Apesar de possuírem emprego benéfico em diversas áreas, os biofilmes têm causado danos à saúde e, cada vez mais, seu desenvolvimento revela ser causa de contaminação e infecções persistentes, principalmente nos setores de assistência à saúde⁽⁶⁾. Sua formação em locais hospitalares corrobora para infecções graves em pacientes hospitalizados, sobre tudo no setor da unidade de terapia intensiva (UTI). Este fato se deve ao elevado número de procedimentos invasivos realizados e pelo comprometimento do sistema imune dos pacientes internados nesta unidade hospitalar⁽³⁾. Outra situação crítica envolvendo biofilmes em hospitais é o seu desenvolvimento em dispositivos médicos, como tubos traqueais, próteses e cateteres, entre outros⁽⁷⁾.

Na atualidade, a incidência de infecções hospitalares causadas por fungos formadores de biofilme tem aumentado substancialmente, acarretando altos índices de mortalidade de até 60%. O gênero *Candida* tem sido frequentemente relacionado a formação de biofilme, pois correspondem a 80% das infecções fúngicas de origem hospitalar^(8,9).

A incidência de infecções nosocomiais fúngicas vem aumentando significativamente nos últimos anos. Vale ressaltar que muitos destes microrganismos se agrupam em biofilmes, conferindo maior patogenicidade dos isolados de *Candida*. Desta maneira o objetivo deste estudo foi realizar uma revisão sistemática apresentando alguns resultados de pesquisas sobre a formação de biofilmes por espécies de *Candida*.

METODOLOGIA

O presente trabalho caracteriza-se como uma revisão narrativa da literatura incluindo a análise de artigos científicos mais relevantes publicados. As etapas que marcaram a realização desta revisão integrativa sobre as leveduras formadoras de biofilmes foram: definição da questão norteadora; seleção dos artigos para o estudo; elaboração do quadro sinóptico com as principais informações de cada artigo; análise dos achados de acordo com os critérios estabelecidos; apresentação dos resultados e conclusões.

A busca pelos artigos foi realizada nas seguintes bases de dados eletrônicas: Scielo, Lilacs, Google acadêmico, Pubmed, *Science Direct*, *Web of Science*. A partir desta busca foram encontrados artigos científicos originais, artigos de revisão, disser-

tações de mestrado e tese de doutorado. Nas buscas, os seguintes descritores, em língua portuguesa e inglesa, foram considerados: *biofilmes*, *formação*, *revisão*, *leveduras*, *infecção*, *antifúngicos*, *Candida spp.*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosi* e *Candida guilliermondii*.

A seleção dos descritores utilizados no processo de revisão foi efetuada mediante consulta ao DECS (descritores de assunto em ciências da saúde da BIREME).

Devido ao grande número de publicações relacionadas a biofilmes, mas não específicas da área da saúde, a busca foi preferida por estudos clínicos e pré-clínicos, não houve restrição quanto ao ano da publicação.

A escolha dos artigos foi desenvolvida através de leitura e análise dos mesmos incluindo as seguintes informações: Citação, Título, Base de Dados (Periódico), Objetivo, Metodo-logia, Amostra, Resultados e Conclusão.

A análise das informações encontradas foi realizada através de leitura comparativa buscando identificar divergências e pontos em comum. O resultado da análise deu origem ao texto apresentado neste trabalho de revisão.

REVISÃO DA LITERATURA

Fungos frequentemente transitam entre o estilo de vida planctônica e o de biofilme⁽¹⁰⁾. Fenotipicamente, as células em um biofilme são distintas de células de flutuação livre. Sua alta tolerância a antifúngicos e capacidade de suportar as defesas do hospedeiro são duas características que promovem grande resiliência⁽⁹⁾. Infecções causadas por biofilme são particularmente difíceis

de erradicar e a maioria dos antifúngicos disponíveis tem atividade mínima sobre os mesmos⁽¹⁰⁾.

Formação do biofilme

Estudos mostram a existência de quatro principais estágios de formação do biofilme: adesão primária, adesão irreversível, maturação e dispersão. A formação desta comunidade envolve a adesão primária dos microrganismos à qualquer superfície não esterilizada, que pode ser celular (bióticas) ou inanimada (abióticas)⁽¹¹⁾.

A fase inicial, também chamada de adesão reversível, necessita de mediação da interação entre as moléculas por ligações específicas do tipo ligante-receptor, já em superfícies inanimadas, a fixação é mediada por interações físico-químicas não específicas⁽¹²⁾.

Forças hidrodinâmicas, interações eletrostáticas, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas são as interações físico-químicas que garantem a fixação dos microrganismos às superfícies abióticas. Há ocorrência do transporte de células microbianas do meio aquoso até à superfície sólida por simples força gravitacional ou pelo direcionamento por motilidade e por quimiotaxia⁽¹¹⁾.

Existe a possibilidade das propriedades de uma superfície serem modificadas pela adsorção de um filme condicionante, sobre tudo, no caso de materiais biomédicos de propriedades plásticas, como próteses, tubos endotraqueais, cateteres venosos e arteriais, sondas e drenos. Este filme, geralmente, se constitui de proteínas, principalmente albumina, imunoglobulina e fibrinogênio. Com a superfície original alterada por esse condicionamento há possibilidade de maiores dificuldades no

controle a adesão bacteriana em superfícies abióticas⁽¹¹⁾.

Quando é formada a primeira camada de microrganismos, a adesão de outros microrganismos é favorecida. A partir daí, ocorre o processo de adesão secundária, considerado irreversível, essa adesão ocorre por estruturas (hifas) e pela produção de EPS⁽¹²⁾.

Posteriormente, se dá a multiplicação e a agregação de novos microrganismos, uns aos outros, em microcolônias, formando um biofilme maduro. Conforme a densidade aumenta, moléculas auto indutoras podem ser produzidas e induzir a transcrição de

genes específicos que regulam várias funções como motilidade, virulência, produção de EPS e a formação de biofilmes⁽¹¹⁻¹³⁾.

Havendo condições favoráveis o desenvolvimento de um biofilme continua por um período relativamente longo de tempo. Porém, em situações desfavoráveis, o biofilme começa a sofrer o processo de desprendimento, onde ocorre a perda contínua de partes de biofilme, resultando na sua disseminação⁽¹²⁾.

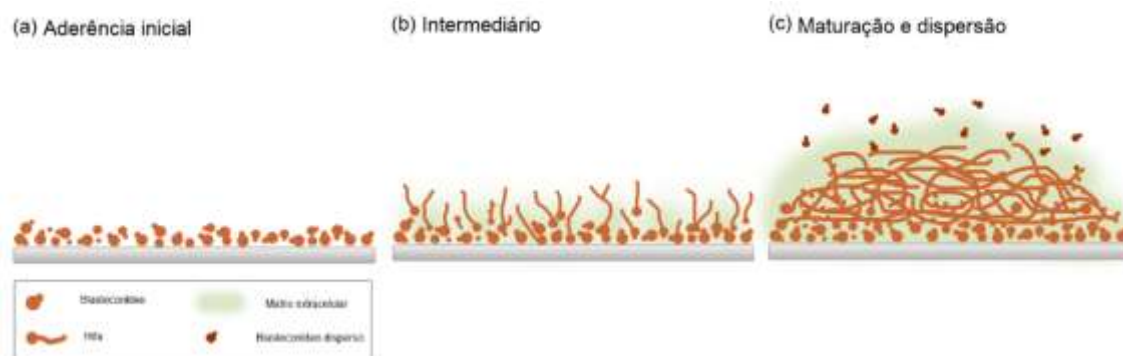


Figura 1: Modelo de desenvolvimento do biofilme de *Candida*: (a) fase inicial de aderência, em que a levedura em suspensão (células planctônicas) adere à superfície; (b) fase intermediária, explica o crescimento das colônias e a secreção inicial da matriz extracelular; (c) fase de maturação, em que o matrix extracelular absorve completamente todas as camadas de células aderidas à superfície em uma estrutura tridimensional. Após a maturação, os eventos de dispersão, quando as células mais superficiais deixam o biofilme e colonizar áreas que rodeiam a superfície, podem ocorrer. Fonte: Adaptado de Vila e Rozental, 2016.

Organização das colônias

A organização de um biofilme depende da natureza dos microrganismos presentes, da concentração de nutrientes, das propriedades hidrodinâmicas e presença de alguma força mecânica⁽¹⁴⁾.

Considera-se os EPS como responsáveis pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional do biofilme e sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas⁽¹²⁾.

Pode-se considerar essa matriz polimérica extracelular (EPS), como a

principal responsável pela persistência das infecções relacionadas ao biofilme. Uma vez que, o torna mais resistente ao ataque de antimicrobianos e desinfetantes. Resistência acrescida à radiação UV, a desidratação e ao ataque de predadores como protozoários, também, são benefícios que essa matriz possibilita às leveduras⁽¹⁵⁾.

Um biofilme é considerado uma estrutura adsorvente e porosa por ser constituído essencialmente por água (cerca de 80 a 95%). Os microrganismos representam somente uma parte da massa de biofilme que, frequentemente, é menor que 10%. O emaranhado polimérico que envolve todas as células microbianas representa cerca de 70 a 95% da matéria orgânica da massa seca do biofilme⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

Infecções relacionadas a biofilmes

Biofilmes têm importância em várias atividades humanas. São empregados em numerosos bioprocessos, como tratamento de efluentes, por biorremediação, e até na produção de alguns alimentos⁽¹⁴⁾. Contudo, o crescimento não desejado dos biofilmes vem causando um impacto negativo em diversas situações⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

De acordo com Jesus (2013), isolados clínicos de levedura, apresentam capacidade maior de formar biofilme em comparação a isolados ambientais. Em vista disso, atualmente têm se dado destaque aos prejuízos que esses biofilmes podem causar em ambientes hospitalares. Estima-se que 80% das infecções humanas estejam associadas a biofilmes, especialmente aquelas que envolvem sistemas biomédicos, como cateteres, sondas, tubos endotraqueais e intraperitoneais, implantes cirúrgicos e próteses, entre outros⁽¹⁾. Anualmente, mais de um

milhão de casos de infecções nosocomiais estão associados ao uso destes tipos de sistemas⁽¹⁸⁾. Dentre os mais propensos a infecções relacionadas à biofilmes estão os cateteres, implantes, próteses e válvulas cardíacas artificiais⁽⁷⁻¹⁰⁾.

Uma das características que distinguem as comunidades de biofilme é a sua capacidade para aderir à uma superfície. No ambiente médico, sistemas biomédicos de longa permanência, proporcionar um nicho ideal para a formação de biofilme⁽¹⁰⁾.

As células microbianas podem invadir os tecidos em contato com o dispositivo ou disseminar-se para a corrente sanguínea, ocasionando infecções sistêmicas. O desenvolvimento do biofilme depende do tipo e número de células que aderem ao dispositivo, do tipo de superfície que constitui o dispositivo e do meio ou fluído em que os microrganismos estão expostos. A aderência microbiana nesses materiais é a combinação de um meio líquido altamente nutrido e o material de que são fabricados⁽⁷⁻⁹⁾.

A relevância clínica de biofilmes em superfícies bióticas tornou-se cada vez mais estudada, visto que, estas infecções possuem elevada gravidade, resultando tanto na inefetividade do dispositivo, como aumento da morbimortalidade⁽¹⁰⁾.

Dentre todos os setores hospitalares a UTI é mais suscetível a infecções deste tipo, principalmente pela realização constante de procedimentos invasivos, concomitante uso destes materiais implantados e condições imunológicas comprometida dos pacientes⁽¹⁰⁻¹¹⁾.

Nas UTIs dos Estados Unidos são utilizados aproximadamente 15 milhões de cateteres venosos centrais (CVCs)

por ano. As leveduras foram a segunda maior causa de colonização de CVC e a terceira maior causa de infecção sanguínea relacionada a seu uso⁽⁸⁾. As infecções de corrente de sanguínea (ICSS) apresentam impacto significativo na morbidade e na mortalidade, sendo responsáveis por 10% a 20% das infecções hospitalares⁽¹⁹⁾.

A elucidação dos mecanismos de resistência em biofilmes é o primeiro passo para a otimização das terapias, ora pelo uso de terapias antifúngicas clássicas como, por exemplo, o bloqueio do dispositivo com antimicrobianos/antissépticos e o uso de dispositivos impregnados com antibióticos, ou pelo emprego de terapias com combinação de fármacos, biocidas ou fitofármacos⁽²⁰⁾.

Biofilmes relacionados a infecções por *Candida spp*

As leveduras podem ser caracterizadas como fungos oportunistas responsáveis pela maior parte das infecções fúngicas nos seres humanos. A incidência de infecções causadas por leveduras, na última década, sofreu um grande aumento, especialmente em paciente imunocomprometidos⁽²¹⁾.

Recentes levantamentos demonstram que a formação de biofilmes está associada a 90% das infecções de *Candida* relacionadas com o uso de cateteres por pacientes hospitalizados⁽²²⁾.

Os processos infecciosos causados por este gênero são favorecidos pela ruptura do equilíbrio entre o parasita-hospedeiro. Contudo, aderência, polimorfismo, variabilidade fenotípica, produção de enzimas extracelulares e toxinas constituem os principais fatores que conferem, ao

fungo, a habilidade de formar biofilme e posteriormente infecções⁽²⁶⁾.

As células de leveduras do gênero *Candida* podem se aderir em diversos tipos de células do hospedeiro, como epiteliais, endoteliais e fagocíticas. Logo, um dos principais mecanismos de virulência é a sua versatilidade de adaptação, e capacidade de adesão em sítios variados⁽²³⁻²⁴⁾. A adesão a superfície celular do hospedeiro é influenciada pela disponibilidade de carboidratos, pH, temperatura e produção das enzimas extracelulares⁽⁸⁾.

Com isto, a habilidade em formar biofilme sobre as células do hospedeiro é uma característica marcante deste patógeno. O mecanismo de aderência envolve glicoproteínas, proteínas do tipo lectinas que apresentam a capacidade de identificar vários tipos de açúcares e receptores para a fração C3b do sistema complemento. Por parte do hospedeiro, receptores celulares para as adesinas de *Candida* como: fibrina, fibronectina e laminina, que favorecem a colonização da matriz extracelular⁽²⁸⁾.

Experimentos realizados no Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares Associadas de São Paulo, demonstraram que a formação de um biofilme de *Candida* pode se dar em aproximadamente 24 a 48 horas. Na fase inicial, a célula planctônica na forma de levedura adere na superfície do substrato, de forma aleatória ou atraída por uma quimiotaxia. Após a aproximação das células, existe uma interação destas com a superfície sendo hidrofóbica e eletrostática⁽¹⁰⁻²⁴⁾.

Na fase secundária, as células proliferam formando microcolônias, e começam a produzir a matriz extracelular. Neste momento ocorre comunicação intercelular que leva a uma expressão diferencial de genes. Esses

genes são responsáveis na transição de leveduras para hifas, na arquitetura da parede celular e na coesividade do biofilme dada pela matriz⁽²³⁻²⁴⁾.

Ao final, quando as células começam a se confluírem, a rede formada começa a ser constituída de uma transição de células diferenciadas em pseudohifas, hifas e leveduras, envolvidas na matriz extracelular polimérica, resultando em um crescimento tridimensional⁽²⁴⁾. A maioria das infecções causadas por *Candida* na forma de biofilme evoluem para um quadro de disseminação na corrente sanguínea (candemia), podendo ocasionar a morte do paciente.

Resistência do biofilme aos antifúngicos e a resposta imunológica

Dentro de um biofilme os microrganismos necessitam de diferentes doses de antimicrobianos para sua inibição. Este fato acaba por conferir diferentes índices de resistência à ação dos fármacos dentro de uma mesma comunidade, assim, patógenos oportunistas conseguem permanecer como agentes infectantes por longo tempo⁽³⁾.

O biofilme constitui um local ideal para a troca de material genético facilitando a transferência horizontal de genes de resistência, bem como de transcrição de determinadas proteínas e enzimas que induzem ineficácia aos antimicrobianos usados na clínica⁽¹¹⁾.

Em culturas livres o transporte de solutos do meio líquido para as células, geralmente, é um processo rápido, quando, em agregados, esse fluxo é dificultado, dando-se por difusão pelos poros presentes no filme⁽¹⁵⁾. Outra limitação, dentro do biofilme, é a oferta de oxigênio, escassa em sua base⁽¹¹⁾. Essas dificuldades acabam fazendo com que a taxa metabólica e, conse-

quentemente, o crescimento da população bacteriana sejam mais lentos. Dessa forma, muitos antimicrobianos tornam-se ineficientes, visto que geralmente estes agem na fase de crescimento exponencial do microrganismo, bem como síntese proteica, síntese de ácidos nucleicos e parede celular que os mesmos atuam⁽¹¹⁻¹⁵⁾.

A dificuldade de muitos agentes antimicrobianos infiltrar no biofilme tem se mostrado uma das principais causas de seu insucesso na tentativa de erradicar células bacterianas⁽²⁸⁾.

Quando o biofilme é atacado por antimicrobianos, a maior parte da população é erradicada, mas uma fração de células latentes não é afetada, podendo ser, além de núcleo para reinfecção após o termino da terapia caminho para desenvolvimento de células mais resistentes⁽¹¹⁾.

O principal responsável pela baixa penetração no meio é o EPS. Ele pode atuar como barreira física para difusão, retendo grande parte dos agentes antimicrobianos e, assim, reduzir a quantidade do mesmo para agir sobre as células ou interagir, quimicamente, com esses agentes, capturando antimicrobianos que são hidrofílicos e carregados positivamente⁽¹¹⁾.

As falhas no reconhecimento dos biofilmes pelo sistema imunológico também se fazem importantes na tentativa de erradicação dos microrganismos envolvidos no mesmo. Tendo em vista que as células sésseis estimulam produção de anticorpos pela liberação de antígeno, as leveduras sob forma de biofilmes impedirão reações imunológicas, celular e humoral⁽²⁹⁾. O que promove a ineficiência do sistema imune em combater os biofilmes também é o EPS, pois as células

sinalizadoras não conseguem reconhecer os potenciais patógenos, assim, as células do interior do biofilme ficam protegidas contra a ação de anticorpos, radicais livres e outros compostos do sistema imunológico⁽¹¹⁾.

Estudos apontam que as células mononucleares do hospedeiro podem ficar aprisionadas no biofilme, não conseguindo fagocitar. Pode ocorrer até a incorporação de células do sistema imunológico no biofilme, inclusive aumentar o crescimento do mesmo⁽¹⁰⁾. Antifúngicos frente a candidíase formadoras de biofilmes

Os antifúngicos disponíveis são menos eficazes contra biofilmes, tendo em vista que as suas concentrações devem ser até 1000 vezes superiores para inibir biofilme, em relação às células planctônicas⁽¹⁰⁾.

Desde 1970, a resistência antimicrobiana aumentou significativamente, em associação com várias mudanças na prática médica tais como a utilização de terapias que deprimem o sistema imunológico, emprego frequente e muitas vezes indiscriminado de agentes antimicrobiano, o uso comum de dispositivos intravenosos, e o surgimento de doenças crônicas imunossupressoras, havendo, também consequente aumento de infecções fúngicas⁽³⁰⁾. A seguir, estão relatadas as principais classes de antifúngicos disponíveis na atualidade e sua ação frente a infecções ocasionadas por biofilmes de leveduras.

Poliênicos

Os poliênicos são a primeira classe de antifúngicos descrita, cuja estrutura é macrocíclica e caracterizada por átomos de carbono divalentes dispostos em série, o que lhe confere a característica hidrofílica⁽³¹⁾.

Fungos em fase estacionária do crescimento são os alvos desta classe, pois se unem por interações hidrofóbicas ao ergosterol, o esteroide predominante encontrado na membrana citoplasmática dos fungos. Com essa ligação são formadas estruturas que albergam no seu interior poros que modificam a permeabilidade da membrana e causando a morte celular por perda de nutrientes e íons essenciais. Os poliênicos também têm atividade oxidante sobre o metabolismo celular e certa capacidade imunoestimulante sobre o hospedeiro, por promover a liberação de citocinas pró-inflamatórias⁽²⁰⁾.

O representante desta classe com maior atividade sobre biofilmes é a anfotericina B que possui amplo espectro com eficácia demonstrada contra a maioria dos agentes de micoses sistêmicas (*Paracoccidioides*, *Histoplasma* e *Sporothrix*) e oportunistas (*Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus Penicillium*), não possuindo atividade frente a *Trichosporon* spp⁽³²⁾.

Emprega-se, normalmente, até 1 mg/kg/dia, quando em sua forma convencional, já as doses das formulações lipídicas podem variar de 3 a 6 mg/kg/dia para obtenção da mesma eficácia terapêutica, porém, a forma lipossomal, causa menor nefrotoxicidade, principal consequência da administração do fármaco⁽²⁰⁾. É um dos poucos fármacos que pode ser prescrito na gravidez⁽³³⁾.

Este valor pode variar quando se trata de células sésseis. Em uma análise, a terapia contínua com 4 µg/ml de anfotericina B resultou em mais de 50% de inibição das células do biofilme de *Candida albicans*⁽³⁴⁾. Contudo, Carvalho (2013), em seus experimentos precisou usar uma concentração de 16 a 256

vezes maior de anfotericina B para conseguir erradicar a colônia do biofilme⁽¹³⁾. Já outro experimento realizado pela Universidade Federal do Espírito Santo verificou que este fármaco inibiu a formação de biofilme apenas na concentração de 128 µg/ml para *Candida albicans*⁽³⁴⁾.

Segundo um estudo que determinou CIM (concentração inibitória mínima), em células sésseis e planctônicas do gênero *Candida*, existe um pequeno número de células responsáveis pela resistência a este fármaco, chamadas células persisters⁽²²⁾. Estas células ocupam entre 0,1 a 1% da população do biofilme e continuam células viáveis mesmo na presença de altas concentrações de antifúngicos⁽³⁵⁾.

Como a anfotericina B é eficaz contra este gênero, esperaria-se que quanto maior a concentração do fármaco, menor seria a quantidade de células viáveis no biofilme. Entretanto, em *C. albicans* existem alguns relatos em que não ocorre redução de células. Isto pode ocorrer pelo aumento da produção de ergosterol sob condições de estresse. Pode-se concluir que a Anfotericina B é eficaz em biofilmes, embora dependa da concentração e da espécie, não podendo ser definido um valor de CIM para erradicar a levedura em biofilmes⁽³⁵⁾.

Azólicos

Os azólicos são compostos sintéticos heterocíclicos, difundem-se facilmente tecidos infectados devido a sua apolaridade, são subdivididos em imidazóis e triazóis com base no número de nitrogênios presentes no anel azol, resultando, esta diferença, em diferentes afinidades de ligação do fármaco

ao sistema enzimático citocromo P-450 fúngico⁽³³⁾.

Os azóis, atuam, inibindo, de forma não competitiva e reversível, enzimas que participam das etapas finais da biossíntese do ergosterol, levando a um acúmulo de precursores que substituem o ergosterol na membrana celular gerando modificações na permeabilidade da membrana fúngica, o que inibe o crescimento fúngico, exercendo efeito fungistático⁽³²⁾. Essa é uma classe que atua na maioria dos fungos que causam micoses superficiais, cutâneas, subcutâneas, profundas e oportunistas como: *Malassezia*, dermatófitos, *Paracoccidioides*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Candida* e *Cryptococcus*⁽³³⁾.

A alta incidência de infecções fúngicas, em sua maioria na forma de biofilme, em pacientes imunocomprometidos gerou o uso indiscriminado de azóis por via sistêmica, de forma profilática ou terapêutica, que vem aumentando a resistência dos fungos a estes agentes⁽³⁶⁾. Os antifúngicos mais usados para o tratamento de biofilmes desta classe são, fluconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol.

O fluconazol por ser hidrossolúvel tem absorção oral independente do pH, se liga pouco a proteínas plasmáticas (11%), é excretada quase que totalmente por via renal e tem boa penetração tecidual, inclusive do sistema nervoso central. Logo, é um triazol de primeira escolha para o tratamento de biofilmes de leveduras causadoras neurocriptococose e candidíase oral, esofágica e vaginal⁽³⁶⁾.

O voriconazol possui potente ação e largo espectro *in vitro*, inibe a enzima 14 alfa-desmetilase, essencial para a síntese do ergosterol, segundo

Nobre et al (2002), este é ativo *in vitro* contra *Aspergillus* sp e *Candida* sp⁽³¹⁾. Em um estudo, que avaliou o papel da matriz de biofilmes de *Candida glabrata* na sua resistência ao voriconazol, observou-se substancial resistência ao fármaco por parte dos biofilmes, o que não foi verificado em células planctônicas. Houve o aumento da produção de polissacarídeos e ergosterol. O que pode ser uma das respostas para o aumento da resistência a este fármaco⁽²²⁾.

Já, resultados de uma análise da viabilidade celular dos biofilmes de *Candida glabrata* mostraram que concentrações mais baixas de voriconazol (até 100 µg/ml) não tiveram efeito na viabilidade celular em comparação com os biofilmes do controle positivo. As concentrações mais altas (≥200 µg/ml) provocaram diminuição significativa da viabilidade celular dos biofilmes. Contudo, em nenhum caso foi verificada a ausência total de biofilme⁽²²⁾.

Ravuconazol e posaconazol são derivados triazóis de última geração apresentam *in vitro* um largo espectro de atividade, particularmente contra biofilmes das espécies de *Candida*⁽³⁷⁾.

De maneira geral os azólicos demonstram-se eficazes na inibição do biofilme. Cabe ressaltar, que a efetividade do tratamento é maior nas primeiras fases de formação do biofilme, que ocorre antes de 48 horas. Gonçalves (2013) mostrou que após a maturação, não se observa células sésseis sensíveis a esta classe de antifúngicos⁽²²⁾.

Equinocandinas

A partir de 2001, com os avanços na terapia antifúngica e na tentativa de diminuir seus efeitos adversos, novos

representantes foram colocados no mercado, como as equinocandinas, classe mais recente de antifúngicos aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*). Atualmente, as equinocandinas representam um importante grupo de fármacos na terapia intravenosa de candidíase superficial e invasiva, provocada por biofilme, as mais utilizadas são caspofungina, micafungina e anidulafungina⁽³⁷⁾.

Equinocandinas inibem de forma não competitiva e irreversível a enzima (1,3)-β-D-glicano sintase, necessária à síntese do (1,3)-β-D-glucano. A produção insuficiente desse polissacarídeo resulta em danos na estrutura e integridade da parede celular, impedindo o crescimento das células fúngicas e, conseqüentemente, provocando a morte do microrganismo⁽²⁰⁾. Todos os fármacos do grupo das equinocandinas, de modo geral, apresentam espectro de ação semelhante, o que se aplica também para biofilmes⁽³⁸⁾.

Por apresentarem este mecanismo de ação, as equinocandinas demonstram um amplo espectro de ação e alta potência. Embora não se tenha total padronização, estes fármacos se mostram *in vitro*, fungicidas para a maioria das espécies de *Cândida*, incluindo aquelas resistentes a classe dos azólicos⁽³⁹⁾.

Importância clínica da resistência e novas alternativas

Suzuki (2009) constatou que pode haver até 80 % da redução da efetividade de agentes antimicrobianos no combate as leveduras, devido, principalmente, a difícil penetração e difusão dos mesmos no biofilme, relatando ser este um dos fatores de resistência. Bombas de efluxo, também, são um importante mecanismo de

resistência, pois permite o efluxo de antifúngico da célula, sendo um mecanismo muito mais eficiente em células sésseis que em planctônicas⁽²⁴⁾.

Em 2010, um estudo que examinou os efeitos da taxa de crescimento e limitação de nutrientes em relação à resistência a antifúngicos em biofilmes de *Candida spp.*, indicou que a resistência aos fármacos coincide com a maturação do biofilme. Pois, a expressão dos genes que codificam as bombas de efluxo foi encontrada durante diferentes fases de desenvolvimento de biofilme. Adicionalmente, análises revelaram que os níveis de ergosterol, são significativamente diminuídos nas fases intermediárias e maduras de crescimento de biofilme em comparação com as fases iniciais de desenvolvimento⁽⁴⁰⁾.

A densidade celular é apontada como um fator de resistência antifúngica importante em biofilmes, particularmente para os azóis, tornando-se cada vez mais resistentes com o aumento da densidade⁽²²⁾. Janiel e Andes (2015) observaram a existência de moléculas de *Quorum Sensing* (QS) em leveduras do gênero *Candida* semelhantes às descritas nos biofilmes bacterianos. O papel principal do QS é coordenar a expressão de determinados genes para regulação da densidade populacional, levando à coordenação de atividades biológicas na população, tais como simbiose, motilidade, esporulação, acasalamento, entre outras⁽¹⁰⁾.

Tomadas em conjunto, todas estas observações reforçam a ideia de que a resistência do biofilme é um fenômeno complexo e multifatorial⁽⁴⁰⁾. Em relação aos biofilmes, de modo geral, estudos clínicos, demonstram maior resistência aos azólicos, enquanto

as equinocandinas e anfotericina B, são mais eficazes⁽¹⁰⁻³³⁾.

As alilaminas e as formulações poliênicas não vêm apresentando atividade totalmente satisfatória contra biofilmes fúngicos. Para superar a ineficácia dessas drogas, alguns pesquisadores têm se dedicado em avaliar o efeito sinérgico entre várias classes de medicamentos, como antifúngicos, antibacterianos, analgésicos, imunossuppressores, entre outros⁽⁴⁰⁾. Temos como exemplos dessas combinações: associação entre fluconazol e doxiciclina, combinação entre anfotericina B e aspirina, combinação de caspofungina e o diclofenaco e a sensibilidade de biofilmes de *C. albicans* a diferentes antifúngicos e o medicamento imunossupressor ciclosporina⁽³⁷⁾.

Outros estudos mostram a eficácia da combinação de inibidores de calcineurina e fluconazol para tratamento de biofilmes de *C. albicans* e *Trichosporon spp.*. Inibidores de calcineurina potencializam também a atividade de outros agentes antifúngicos, incluindo as equinocandinas e anfotericina B. O sucesso desta combinação se dá pela redução da capacidade da matriz (EPS) em sequestrar o antifúngico⁽²⁰⁾.

A interação entre anfotericina B e fármacos antibacterianos, como a rifampicina e a tetraciclina também vem sendo estudada em testes *in vitro*. A avaliação atividade *in vitro* de anfotericina B combinada à rifampicina e à doxiciclina contra biofilmes de espécies de *Candida*, demonstrando a redução dos valores de CIM do antifúngico. Provavelmente este resultado foi dado pela ligação da anfotericina B e esteróis da membrana celular fúngica, aumentando sua permeabilidade, permitindo a entrada

das drogas com a subsequente interferência da síntese do RNA pela rifampicina e a síntese proteica pela doxiciclina⁽²⁰⁾.

O uso de biocidas, também, tem se mostrado método efetivo para evitar a formação dos biofilmes. Resultados encorajadores foram observados in vitro com o uso de etanol e ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA)⁽³⁸⁾.

A resistência dos biofilmes é preocupante e requer não somente a pesquisa para o desenvolvimento de novas substâncias, mas também o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento dessas infecções. Pode-se observar que é pequeno o número de agentes farmacológicos para tratamentos antifúngicos quando comparado ao de antibióticos, caminha-se para a descoberta de antifúngicos que apresentem maior espectro de ação, baixo custo e menor índice de resistência antifúngica⁽²⁵⁻²⁷⁾.

A abordagem utilizada para descobrimento de novas alternativas é a de determinar os mecanismos que conduzem a resistência à droga e identificar ou desenvolver um agente anti-infeccioso, que interrompa o processo espécie⁽¹⁰⁾.

Cada vez mais, produtos naturais vêm atraindo interesses científicos, devido a suas propriedades antifúngicas. Essas pesquisas podem conduzir ao desenvolvimento de drogas efetivas contra muitos fungos patogênicos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) mais de 80% da população mundial usa medicamentos tradicionais para tratar suas doenças, sendo a maioria oriundos de plantas e/ou seus produtos. Os compostos como alcalóides, taninos, flavonóides, proteína, peptídeos, glicoproteínas, ácidos fenólicos e os óleos

essenciais apresentam atividade considerada contra fungos⁽³⁰⁾.

CONCLUSÕES

O presente artigo de revisão traz uma abordagem atual sobre biofilmes produzidos por espécies do gênero *Candida*. Constatou-se a capacidade dos biofilmes em causar infecções de difícil tratamento, seja pelas vantagens e resistência que a forma de agrupamento lhes proporciona, seja pelo pequeno e muitas vezes ineficaz arsenal farmacológico disponível para combatê-los.

Há promissoras combinações e novas abordagens para o tratamento dos biofilmes leveduriformes. Contudo, percebe-se a necessidade de muito mais empenho no desenvolvimento de tratamentos, devido sua problemática. Espera-se que através da compreensão dos mecanismos de seu desenvolvimento, resistência, microrganismos envolvidos e tratamentos, relatados nesta revisão, tenha-se colaborado para tanto.

REFERENCIAS

1. Magalhães JNMP. Importância da formação de biofilmes nas infecções associadas a próteses ortopédicas. Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas]. Porto: Universidade Fernando Pessoa; 2011.
2. Winkelströter LK. Análise da expressão gênica, formação de biofilmes e adesão/invasão a célula Caco-2 por *Listeria monocytogenes* em diferentes condições encontradas no trato gastrointestinal, em alimentos e em presença de bacteriocinas. Tese [Doutorado em Ciências]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto; 2012.

3. Culler HF. Formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatógena atípica. Dissertação [Mestrado em Biotecnologia]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2010.
4. Barros MFL. Avaliação da formação de biofilme e resistência antimicrobiana por cepas de *Staphylococcus epidermidis* isolados de hemoculturas em hospitais públicos da cidade do Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Microbiologia e Parasitologia]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2009.
5. Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, jan. 147(1):3-9. 2001.
6. PADOVEZE, M.C. Biofilme: o inimigo invisível, Parte I. 2013.
7. Negri M, Regini JRR, Silva HR. Biofilme: ameaça invisível em ambientes cirúrgicos. *BJSCR*. nov.; 4(1):43-8. 2013.
- 8 Doria ACOC, Santos TB, Figueira FR, Sorge CPC, Bernardes RC, Batista ACS, Khouri S. Estudo comparativo de hemoculturas e cateteres positivos para leveduras do gênero *Candida* de origem hospitalar. *Revista Univap*. dez. 21(38):46-55. 2015.
9. Cardoso BC. Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. Dissertação [Mestrado em Engenharia de Bioprocessos]. Braga: Universidade do Minho; 2004.
10. Janiel EN, Andes D. Fungal Biofilms: In vivo models for discovery of anti-biofilm drugs. *Rev. Microbiol Spectr*. jun. 3(5):1-25. 2015.
11. Giordani RB, Macedo AJ, Trentin DS. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato*. dez.; 14(22):113-238. 2013.
12. Araújo NT, Bisson MR, Freitas BVL. "Biofilmes bacterianos e sua atuação na infecção hospitalar". Monografia [Conclusão do curso de Biomedicina]. Ribeirão Preto: Centro Universitário Barão de Mauá; 2013.
13. Conrado IM. Bactérias e as suas redes sociais. Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas]. Porto: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa; 2013.
14. Peres BM. Bactérias indicadoras e patogênicas em biofilmes de sistemas de tratamento de água, sistemas contaminados e esgoto. Dissertação [Mestrado em Ciências]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.
15. Xavier JB, Picioreanu C, Almeida JS, Loosdrecht MCM. Monitorização e modelação da estrutura de biofilme. *Boletim de Biotecnologia*. Nov; [s.v]([s.n]):2-13. 2015.
16. Machado SMO. Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis. Dissertação [Mestrado em Tecnologia do Ambiente]. Braga: Escola de Engenharia da Universidade do Minho; 2005.
17. Jesus R. Avaliação da formação de biofilme de fungos emergente sua suscetibilidade a antifúngicos na forma livre e nanoencapsulada. Dissertação [Mestrado em Microbiologia do Ambiente]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2013.
18. Andrade D, Santos APA, Watanabe E. Biofilme em marca-passo artificial: ficção ou realidade? *Arq. Bras. Cardiol*. nov.; 97(5):113-120. 2011.
19. Corrêa KLG, Almeida GMD, Almeida JNJ, Rossi F. Diferença de tempo de positividade: método útil no

- diagnóstico de infecção de corrente sanguínea relacionada com cateter. J Bras Patol Med Lab. jun.; 48(3):195-202. 2012.
20. Marques FJ. Efeito inibitório de drogas antituberculose frente à *histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* e *Cryptococcus* spp.: síntese de análogos químicos, atividade antifúngica in vitro e mecanismo de ação. Dissertação [Doutorado em Microbiologia Médica]. Fortaleza: Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará; 2013.
21. Mourão CI. Effect of folate on growth inhibitors, antifungal sensitivity and virulence factors of strains of *Cryptococcus neoformans*. Dissertação [Pós-graduação em Ciências Médicas]. Ceará: Universidade Federal do Ceará Faculdade de Medicina; 2010.
22. Gonçalves BF. Avaliação do papel da matriz de biofilmes de *Candida glabrata* na sua resistência ao voriconazol. Dissertação [Mestrado em Engenharia Biológica]. Braga: Universidade do Minho; 2013.
23. Derengowski LS. Caracterização da resposta de fungos patogênicos a diferentes condições de interação intra e inter-reinos. Tese [Doutorado em Biologia Molecular]. Brasília: Universidade de Brasília; 2011.
24. Suzuki LC. Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans* in vitro para estudo da terapia fotodinâmica. Dissertação [Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares Associada à Universidade de São Paulo; 2009.
25. Teodoro GR. Avaliação da atividade antifúngica dos extratos de buchenavia tomentosa sobre *cândida*. Dissertação [Mestrado em Biopatologia bucal]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos da Universidade Estadual Paulista; 2011.
26. Menezes ACS, Ribeiro EL, Santana DP, Naves PLF. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. Rev. de Ciências Médicas e Biológicas. agost.; 12(2):229-233. 2013.
27. Iturrieta-gonzalez I. Evaluation of the biofilm production of *Trichosporon* spp. clinical isolates and its susceptibility against triazoles. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. [s.v]([s.n.):125. 2013.
28. Melo PC. Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina. Dissertação [Mestrado em Medicina Veterinária]. JAbotical Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2008.
29. Bierhals CG. Análise da formação de biofilme por isolados clínicos e caracterização genotípica do gene *wspR* de *Acinetobacter* spp. Monografia [Conclusão de Curso de Farmácia]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.
30. Silva AR. Avaliação in vitro da berberina frente às cepas de *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* resistentes ao fluconazol e sua atividade em isolados formadores de biofilme. Dissertação [Mestrado em Microbiologia Médica]. Fortaleza: Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará; 2015.
39. Nobre MO. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. Ciência Rural. 32(1):175-184. 2002.
21. Filippin FB, Souza LC. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas

de anfotericina B. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. abr./jun.; 42(2):167-194. 2006.

32. Giacobino J. Caracterização fenotípica e molecular das espécies fúngicas causadoras de peritonites em pacientes submetidos à diálise peritoneal ambulatorial continua do Hospital das Clínicas da UNESP, Botucatu. Dissertação [Mestrado em Biologia Geral e Aplicada, área de concentração Biologia de Parasitas e Micro-organismos Instituto de Biociências]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2013.

33. Ribeiro AD. Ocorrência de infecção nosocomial por *Candida spp.* no Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes e avaliação das drogas anfotericina b e voriconazol na inibição de formação de biofilme pelas espécies isoladas. Dissertação [Mestrado em Doenças Infecciosas]. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo; 2013.

34. Ferraz DM. Resistência da *Candida glabrata* a diferentes concentrações de antifúngico. Dissertação [Mestrado Integrado em Engenharia Biológica Ramo Tecnologia Química e Alimentar]. Braga: Universidade do Minho; 2013.

35. Viani PRC. *Candida* provenientes de infecção hospitalar isoladas de pacientes internados em hospital infantil do estado de São Paulo e

avaliadas por marcadores fenotípicos. Dissertação [Mestrado em Ciências]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

36. Margotto PR. Novos Antifúngicos. Prof. Do Curso de Medicina da Escola Superior de Ciências da Saúde (ESCS) /SES/DF. Brasília, fev. 2012.

37. Martinez R. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. Rev American Society for Microbiology. 2006 ago.; 2(4):1021-1033.

38. Magalhães VM. Utilização de equinocandinas na terapia antifúngica em neonatos. Monografia [Pós-graduação em Farmácia Hospitalar e Clínica]. Recife: Faculdade Santa Emília; 2012.

39. Pires RH. Formação de biofilmes e resistência a antifúngico e biocidas em *Candida parapsilosis* e *C. orthopsilosis* isoladas de águas usadas para hemodiálise. Tese [Doutorado em Biociências e Biotecnologia]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista; 2010.

40. Costa CR. Molecular characterization of *Candida albicans* resistant and susceptible to fluconazole. Tese [Doutorado em Ciências da Saúde]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2009.

Autor Correspondente: Izabel Almeida Alves
E-mail: izabelalmeidaa@hotmail.com

Recebido: 23 de fevereiro de 2018

Aprovado: 9 de outubro de 2018