

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

A RELEVÂNCIA CLÍNICA DOS BIOFILMES NAS ESPÉCIES *CANDIDA SPP.*

Trabalho submetido por
Raquel Maria dos Anjos Gomes

Para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

outubro 2023

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

A RELEVÂNCIA CLÍNICA DOS BIOFILMES NAS ESPÉCIES *CANDIDA SPP.*

Trabalho submetido por
Raquel Maria dos Anjos Gomes
Para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Mestre Teresa Nascimento

outubro 2023

Agradecimentos

No decorrer destes anos, o percurso acadêmico não foi fácil, mas decididamente não teria sido possível se não fossem as pessoas incríveis que tive o privilégio de ter a meu lado.

Um obrigado a todos os meus amigos que me incentivaram a nunca desistir e me motivaram a fazer melhor a cada dia que passava.

Para os meus amigos do coração, um especial e apertado obrigado por todos os momentos de estudo, convívio, desabafos e força que me proporcionaram.

Aos meus pais, um enorme obrigado nunca será suficiente para agradecer tudo o que fizeram por mim e por todo o apoio que sempre me deram, principalmente nestes últimos anos.

Ao meu namorado que alavancou a conclusão desta etapa e que tem caminhado a meu lado nestes últimos tempos, um obrigado nunca será suficiente.

Aos coralistas do CAEM, Maestro Paulo Videira e Professora Deolinda Auxtero, um muito obrigado pelos quatro anos de muita música, aprendizagem e diversão.

Às minhas três estrelinhas que infelizmente não puderam fazer parte deste processo, agradeço a força interior que me transmitiram.

Por último, um especial agradecimento à minha orientadora por toda a dedicação, disponibilidade e empenho que me dedicou durante estes anos. Foi e será uma das melhores professoras que tive durante todo o meu percurso escolar e acadêmico.

Resumo

Na última década, *Candida* spp., microrganismo constituinte da flora comensal do organismo humano, tem vindo a registar um aumento da sua prevalência como consequência da capacidade de se tornar oportunista no organismo humano.

Dada a facilidade que *Candida* spp. tem em aderir e colonizar as superfícies, a maioria das infeções geradas manifestam-se sob a forma de biofilme.

Os biofilmes, na sua globalidade são responsáveis por 80% das infeções provocadas por agentes microbianos, sendo *Candida* spp. um dos microrganismos com mais expressão.

Face ao aumento do índice de morbilidade e mortalidade e do aumento dos custos associados ao desenvolvimento e tratamento de infeções por biofilmes de *Candida*, é fundamental que a compreensão dos mecanismos de formação dos biofilmes e novas estratégias terapêuticas sejam aprofundadas e desenvolvidas.

Os antifúngicos mais utilizados no tratamento de Candidoses associadas à formação de biofilmes pertencem às classes dos azóis, polienos e equinocandinas. No entanto, estas classes são responsáveis por muitos efeitos adversos e desenvolvimento de resistências.

Uma nova classe, os triterpenóides surge nos últimos anos, com melhores índices de biodisponibilidade, menos efeitos adversos e menos desenvolvimento de resistências, encontrando-se aprovada para o tratamento de candidoses vulvovaginais.

No entanto, são necessários mais estudos para colmatar as lacunas na nossa compreensão da incidência de biofilmes de *Candida* spp. e igualmente para monitorizar as tendências da resistência antifúngica, de modo a preservar os recursos de saúde pública e, em última análise, a diminuir a mortalidade entre os doentes.

Palavras-chave: Biofilme *Candida* spp., fatores de virulência, resistência e terapêutica antifúngica.

Abstract

In the last decade, *Candida* spp., a constituent microorganism of the human body's commensal flora, has been experiencing an increase in its prevalence due to its ability of becoming an opportunistic fungus in the human body.

Given *Candida* spp. capacity to adhere and colonize surfaces, the majority of infections are created in the form of biofilms.

Biofilms, in general, are responsible for 80% of infections caused by microbial agents with *Candida* spp. being one of the most prominent microorganisms.

With the rising rates of morbidity and mortality and the increasing costs associated with the development and treatment of *Candida* biofilm infections, it is essential to deepen the understanding of biofilm formation mechanisms and develop new therapeutic strategies.

The most commonly used antifungals in the treatment of Candidiasis associated with biofilm formation belong to the classes of azoles, polyenes, and echinocandins. However, these classes are responsible for many adverse effects and the development of resistance.

A new class, triterpenoids, has emerged in recent years, with better bioavailability, fewer adverse effects, and less resistance development. It has been approved for the treatment of vulvovaginal candidiasis.

However, further studies are needed to fill the gaps in our understanding of the incidence of *Candida* spp. biofilms as well as to monitor antifungal resistance trends in order to preserve public health resources and ultimately reduce mortality among patients.

Keywords: Biofilm *Candida* spp., virulence factors, resistance and antifungal therapie.

Índice Geral

Resumo	1
Abstract	2
Índice Geral.....	3
Índice de Figuras	5
Índice de Tabelas	6
Lista de Abreviaturas.....	7
1. Introdução	9
1.1. Estado da Arte.....	9
1.2. Pertinência do Estudo	10
1.3. Objetivos.....	11
1.4. Metodologia	12
2. Género <i>Candida</i>	13
2.1. Taxonomia e Biologia.....	15
2.1.1. <i>Candida albicans</i>	15
2.1.2. <i>Candida</i> não <i>albicans</i>	16
3. Fatores de Virulência	19
3.1. Adesão	20
3.2. Dimorfismo	21
3.3. Variabilidade Fenotípica.....	21
3.4. Produção de Enzimas.....	22
3.5. Produção de Toxinas.....	23
3.6. Capacidade de Modular a Resposta Imunológica.....	24
3.7. Composição da Parede Celular	24
3.8. Mimetismo Molecular.....	25
3.9. Formação de Biofilmes.....	25

4. Biofilmes	27
4.1. Formação do Biofilme	27
4.1.1. Composição dos Biofilmes	31
4.1.2. Fenómeno <i>Quorum Sensing</i>	31
4.2. Fatores do Hospedeiro que influenciam a formação do Biofilme	33
4.3. Defesas do Hospedeiro contra os Biofilmes	35
4.4. Metodologia para Avaliação dos Biofilmes.....	36
4.4.1. Meios de Cultura	36
4.4.2. Formação do Biofilme.....	36
4.4.3. Quantificação do Biofilme	36
4.4.4. Análise da Expressão Genética	37
4.4.5. Extração de ADN e RNA	37
4.5. Terapêutica Antifúngica	38
4.6. Profilaxia.....	43
5. Discussão de Resultados.....	45
6. Conclusão	49
7. Bibliografia.....	51

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Candida</i> spp. em CHROMagar (1. <i>Candida auris</i> ; 2. <i>Candida albicans</i> ; 3. <i>Candida glabrata</i> ; 4. <i>Candida parapsilosis</i>).....	14
Figura 2. Alterações morfológicas de <i>Candida albicans</i> durante o processo infeccioso	15
Figura 3. Lista de fungos prioritários segundo a Organização Mundial de Saúde.....	16
Figura 4. Alguns dos principais fatores de virulência de <i>Candida</i> spp.	19
Figura 5. Formação de um Biofilme de <i>Candida albicans</i>	26
Figura 6. Fases de desenvolvimento de biofilmes em <i>Candida</i> spp.	28
Figura 7. Fases de desenvolvimento dos biofilmes e proteínas intervenientes	29
Figura 8. Biomassa de algumas espécies de <i>Candida</i>	30
Figura 9. Importância do Farnesol e do Tirosool no desenvolvimento dos biofilmes	32
Figura 10. Locais de relevância clínica onde podem ser adquiridas as espécies de <i>Candida</i>	33
Figura 11. Alvos terapêuticos dos antifúngicos	38
Figura 12. Alvo terapêutico do Ibrexafungerp	41

Índice de Tabelas

Tabela 1. Fatores de risco para o desenvolvimento de infecções locais e sistêmicas por <i>Candida</i> spp. (Adaptado de, Ramage et al., 2023)	34
Tabela 2. Classes de antifúngicos e respectivas ações	42

Lista de Abreviaturas

ADH – Álcool Desidrogenase

ADN – Ácido desoxirribonucleico

CNA – *Candida* não *albicans*

ECM – Matriz Extracelular

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

PK – Piruvato Quinase

QS – *Quorum Sensing*

Sap – Aspartato Protease Secretória

SAP – Gene codificador da Aspartato Protease Secretada

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato

1. Introdução

1.1. Estado da Arte

Na última década, as infecções por *Candida* spp. têm vindo a aumentar, associadas a índices de mortalidade elevados, tendo como principal consequência o crescimento do número de mortes, constituindo um crescente problema de saúde pública (Pereira et al., 2021).

Durante muitos anos, *Candida albicans* foi considerada a levedura comensal com um comportamento mais oportunista no hospedeiro imunocomprometido (Leal, 2019). Contudo, as infecções por espécies *Candida* não *albicans* têm visto a sua prevalência aumentar, nomeadamente *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* (Pereira et al., 2021).

Existem diversos fatores que podem contribuir para o desenvolvimento e proliferação das infecções por *Candida* spp., no entanto, as lesões nos tecidos, cirurgias e colocação de cateteres e próteses são os fatores que mais têm contribuído para o desenvolvimento de infecções muitas vezes acompanhadas da formação de biofilmes (Pereira et al., 2021).

Com a recorrente utilização de antifúngicos para o tratamento das candidoses, os fungos desenvolveram mecanismos de sobrevivência e/ou resistência, sendo a capacidade de formar biofilmes um dos possíveis exemplos. (Leal, 2019).

Os biofilmes apresentam-se como estruturas responsáveis por proteger as células fúngicas da ação do sistema imunitário e dos antifúngicos (Czechowicz et al., 2022).

Dado o aumento da prevalência destes microrganismos na forma de biofilme no decorrer das últimas décadas, a preocupação em efetuar estudos tem sido cada vez mais emergente (Pereira et al., 2021).

Atualmente, o número de estudos sobre os biofilmes de complexos bacterianos é superior ao número de estudos sobre os biofilmes de fungos. Posto isto, é de salientar a necessidade de desenvolver estratégias terapêuticas e profiláticas que deem resposta ao aumento da morbilidade e mortalidade provocados pelos biofilmes de fungos, diminuindo assim os custos associados aos tratamentos (Del Pozo & Cantón, 2015).

1.2. Pertinência do Estudo

O género *Candida*, responsável por provocar candidoses, tornou-se ao longo dos últimos anos um problema de saúde pública de maior impacto, dado que as taxas de mortalidade e morbilidade têm vindo a aumentar exponencialmente, assim como os custos associados aos tratamentos destas infeções (Atiencia-Carrera et al., 2022; Del Pozo & Cantón, 2015; Medeiros et al., 2019).

Na última década foram descritas cerca de 15 espécies de *Candida* spp. capazes de provocar infeções invasivas. No entanto, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. kruzei* e *C. tropicalis* representam 90% dessas infeções (Medeiros et al., 2019).

É essencial melhorar o conhecimento sobre a formação, desenvolvimento, proliferação e tratamento dos biofilmes nas espécies de *Candida* spp., principalmente nas unidades de cuidados terciários que representam uma das principais portas de entrada de indivíduos imunocomprometidos. (Ramage et al., 2023).

Com o aumento da esperança média de vida e o consequente envelhecimento da população, é espectável que ocorram cada vez mais intervenções médicas e cirúrgicas. Este acontecimento irá levar a um aumento da probabilidade de exposição a este tipo de infeções que são os biofilmes (Ramage et al., 2023).

Posto isto, é fundamental que exista uma compilação dos atuais conhecimentos sobre os biofilmes.

1.3. Objetivos

A presente monografia tem como objetivo condensar os conhecimentos existentes sobre os biofilmes nas espécies de *Candida*, a fim de alertar para o aumento da incidência de infecções fúngicas, nomeadamente a importância clínica laboratorial atribuída aos biofilmes.

Numa primeira instância tem como propósito perceber o mecanismo de formação dos biofilmes, de modo a capacitar sobre o mesmo e impedir a sua formação.

Seguidamente, informar sobre os possíveis tratamentos a implementar e respetiva profilaxia.

1.4. Metodologia

Para a elaboração desta revisão de literatura foi efetuada uma pesquisa bibliográfica no motor de busca Google Scholar®, nas bases de dados PubMed®, Science Direct® e B-on® com as seguintes palavras-chave: *Candida spp. biofilm, virulence of biofilms, biofilm treatment, biofilm formation* através de uma pesquisa simples e/ou avançada e em outros suportes secundários, sendo o intervalo de análise preferencial, um período máximo de 8 anos de antiguidade.

Os artigos e livros consultados encontravam-se elaborados em inglês e português.

A seleção destes artigos foi efetuada com base em três principais critérios: título, conteúdo do resumo/ *abstract* e data da publicação.

Para uma condensação, organização e citação das referências bibliográficas a inserir nesta revisão de literatura, foi utilizado o programa Mendeley Reference Manager® 2.100.0.

2. Género *Candida*

Os fungos, microrganismos eucariotas pertencentes ao reino Fungi caracterizam-se como seres ubiqüitários e saprófitos na sua maioria, podendo expressar-se de forma comensal, oportunista ou patogénica (Freitas, 2010; A. Rodrigues & Vaz, 2014a). Em causa, encontra-se o género *Candida*, taxonomicamente incluído no filo Ascomycetes, classe *Blastomycetes*, ordem *Cryptococcales* e família *Cryptococcaceae* (López, 2010).

Na sua composição apresentam uma membrana celular maioritariamente constituída por ergosterol e uma parede celular de quitina (Naves et al., 2013).

Endogenamente, como flora comensal do ser humano, o género *Candida* encontra-se geralmente nas mucosas, podendo estender-se ao trato gastrointestinal (Cangui-Panchi et al., 2023; A. Rodrigues & Vaz, 2014b).

A passagem de colonização para infeção deriva de fatores do hospedeiro como a suscetibilidade para o aparecimento de infeções, a capacidade de resposta inflamatória do organismo e/ ou a facilidade com que se desenvolve um desequilíbrio na flora (Rodríguez-Cerdeira et al., 2018). Para além destes fatores, indivíduos transplantados, pós cirúrgicos, portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), com problemas oncológicos e ainda recém-nascidos, apresentam probabilidades elevadas de desenvolvimento de candidoses e posteriormente biofilmes (Del Pozo & Cantón, 2015). Com isto, as Candidoses podem ser localizadas ou disseminadas e afetar órgãos ou sistemas, sendo maioritariamente assintomáticas (Atencia-Carrera et al., 2022; A. Rodrigues & Vaz, 2014b; Rodríguez-Cerdeira et al., 2018).

Atualmente, *Candida* spp. é responsável por ter provocado 10 milhões de candidoses nas mucosas e 750.000 candidoses sistémicas, resultando consequentemente numa taxa de mortalidade de 50% (Ramage et al., 2023). Em Portugal, segundo o primeiro estudo multicêntrico realizado entre 2011 e 2012 e efetuado em 10 hospitais do país, 2,19 em cada 100.000 habitantes desenvolvem candidémias, estando *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* entre as espécies com maior prevalência (Faria-Ramos et al., 2014; Sabino et al., 2017).

Microscopicamente, o género *Candida* apresenta-se na forma de leveduras, uni ou bicelulares de 3 a 5µm de tamanho e de forma oval, podendo algumas espécies como é exemplo *C. albicans* apresentar dimorfismo quando existem alterações ambientais apropriadas, levando à formação de pseudohifas ou hifas verdadeiras (A. Rodrigues & Vaz, 2014b).

Macroscopicamente, em meio Sabouraud Dextose Agar apresentam uma coloração esbranquiçada e um aspeto cremoso e em meio CHROMagar, uma variabilidade de cores, consoante a espécie inoculada (Fig. 1) (Freitas, 2010; López, 2010; Mulet Bayona et al., 2020).

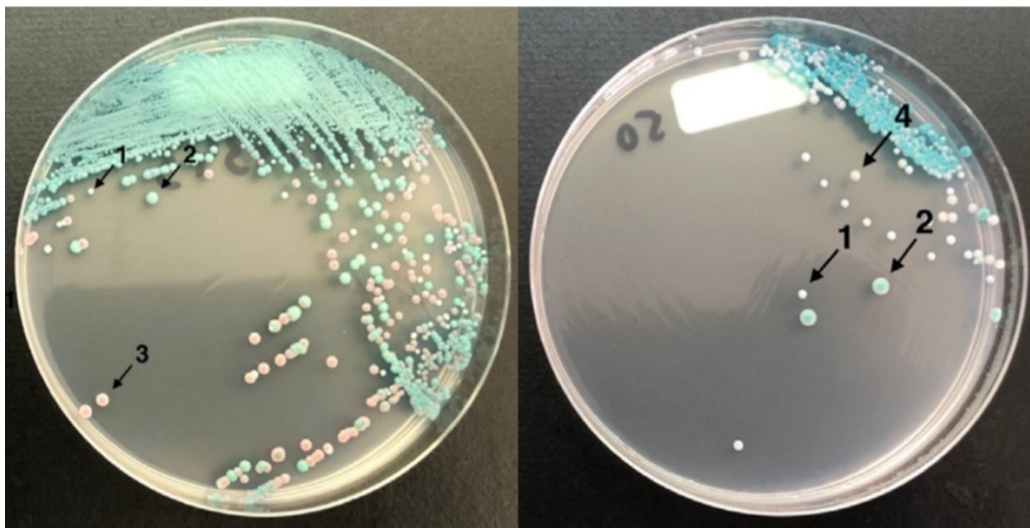


Figura 1. *Candida* spp. em CHROMagar (1. *Candida auris*; 2. *Candida albicans*; 3. *Candida glabrata*; 4. *Candida parapsilosis*) (Adaptado de, (Mulet Bayona et al., 2020))

2.1. Taxonomia e Biologia

2.1.1. *Candida albicans*

Candida albicans é classificada como uma levedura oportunista presente no microbioma oral, gastrointestinal e genito-urinário, responsável por cerca de 70% das infecções fúngicas em todo o mundo e por uma taxa de mortalidade de aproximadamente 40% (Pereira et al., 2021; Talapko et al., 2021). *C. albicans* é ainda a espécie responsável pela grande maioria das candidoses sistêmicas e das membranas mucosas e o terceiro microrganismo mais isolado nas infecções da corrente sanguínea em pacientes hospitalizados, uma vez que apresenta uma maior afinidade para aderir aos cateteres e implantes (Pereira et al., 2021; Rodríguez-Cerdeira et al., 2018).

É ainda caracterizada por apresentar dimorfismo, ou seja, uma capacidade de passar da forma de levedura à forma de hifa verdadeira ou pseudohifa, mudando da sua forma comensal para a sua forma patogênica (Fig. 2) (Talapko et al., 2021). Resultante desta transformação, *C. albicans* exibe uma capacidade de aderir e invadir os tecidos do hospedeiro (A. Rodrigues & Vaz, 2014a).

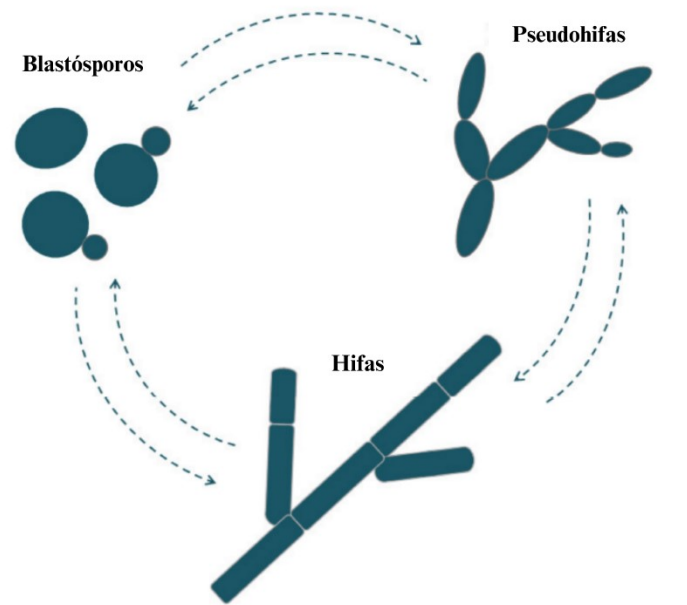


Figura 2. Alterações morfológicas de *Candida albicans* durante o processo infeccioso (Adaptado de, Talapko et al., 2021)

2.1.2. *Candida* não *albicans*

Nas últimas décadas, as infecções por *Candida* não *albicans*, têm aumentado exponencialmente e as causas apontadas para este facto são essencialmente o excesso de utilização dos antifúngicos, nomeadamente do grupo dos azóis, o aumento da colocação de dispositivos médicos (ex: válvulas cardíacas, próteses articulares, cateteres, drenos...) e o aumento da expressividade dos fatores de virulência (Del Pozo & Cantón, 2015; Rodríguez-Cerdeira et al., 2018; Tamura et al., 2007).

Grupo de Prioridade Crítica	Grupo de Prioridade Elevada	Grupo de Prioridade Média
 <i>Cryptococcus neoformans</i>	 <i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>Candida glabrata</i>)	 <i>Scedosporium</i> spp.
 <i>Candida auris</i>	 <i>Histoplasma</i> spp.	 <i>Lomentospora prolificans</i>
 <i>Aspergillus fumigatus</i>	 Eumycetoma causative agents	 <i>Coccidioides</i> spp.
 <i>Candida albicans</i>	 Mucorales	 <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>)
	 <i>Fusarium</i> spp.	 <i>Cryptococcus gattii</i>
	 <i>Candida tropicalis</i>	 <i>Talaromyces marneffei</i>
	 <i>Candida parapsilosis</i>	 <i>Pneumocystis jirovecii</i>
		 <i>Paracoccidioides</i> spp.

Figura 3. Lista de fungos prioritários segundo a Organização Mundial de Saúde (Adaptado de, Organization, 2022)

Segundo uma publicação recente da Organização Mundial de Saúde (Fig. 3), várias espécies de *Candida* não *albicans*, como é o caso de *Candida auris*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*, encontram-se enumeradas na lista de agentes fúngicos prioritários em investigar e tratar dada a sua importância e relevância em saúde pública (Organization, 2022).

Das espécies não *albicans*, *Candida glabrata* é a levedura que suscita mais preocupação dado o seu carácter de levedura comensal nas mucosas e na pele que se revela oportunista e/ ou patogénica com a utilização de imunossuppressores, antimicrobianos, antineoplásicos e tratamentos invasivos (Del Pozo & Cantón, 2015; Rodríguez-Cerdeira et al., 2018).

Responsáveis por provocar infeções localizadas ou sistémicas, apresentam números elevados de morbilidade e mortalidade devido ao aumento da expressão dos seus fatores de virulência, nomeadamente a capacidade de formar biofilmes (C. Rodrigues et al., 2017). Representa ainda, a espécie de *Candida* não *albicans* mais prevalente nos últimos anos no hemisfério norte (Europa central e norte, assim como América do Norte) (Lee et al., 2021).

Candida parapsilosis, isolada pela primeira vez em 1928 nos Estados Unidos da América encontra-se presente em fontes não humanas como são exemplo os animais domésticos, insetos, solos e ambientes marinhos (Branco et al., 2023).

Apresenta como um bom vetor de transmissão as mãos dos profissionais de saúde, sendo por isso importante o seu controlo nas unidades de cuidados de saúde (Branco et al., 2023).

É a segunda espécie de CNA (*Candida* não *albicans*) mais prevalente na América Latina e no que diz respeito à Europa, consoante a região, é a segunda ou terceira espécie de *Candida* mais prevalente a causar infeções (Branco et al., 2023).

Candida tropicalis por sua vez, é descrita como uma espécie prevalente da América do Sul e Ásia que apresenta uma elevada resistência aos antifúngicos (de Souza et al., 2023; M. M. dos Santos & Ishida, 2023). Apresenta uma expressão mundial entre os 3 e os 66%, sendo que as taxas mais altas são efetivamente encontradas nas regiões tropicais e subtropicais onde a sua prevalência é maior (de Souza et al., 2023). Estudos feitos, apontam uma taxa de mortalidade na casa dos 40% (de Souza et al., 2023).

Candida auris, descrita no Japão em 2009 pela primeira vez tem despertado o interesse dos investigadores dada a sua emergência e resistência, tendo sido inclusivamente publicado um alerta internacional pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) como sendo um novo agente infeccioso (Du et al., 2020; Organization, 2022). Nas últimas décadas foi isolada em pelo menos 40 países e 6 continentes (Du et al., 2020).

Distinta por se desenvolver em altas temperaturas ($>40^{\circ}\text{C}$) e sobreviver em elevadas concentrações de sal, *C. auris* é descrita como um fungo termotolerante e osmotolerante com capacidade de produzir pseudohifas (Du et al., 2020).

3. Fatores de Virulência

O género *Candida*, é um dos organismos constituintes da microbiota do Homem, pelo que, para se tornar oportunista ou patogénico em indivíduos imunocomprometidos, necessita de mecanismos capazes de provocar infeção, designados de fatores de virulência, decisivos para a determinação da patogenicidade da espécie (A. Rodrigues & Vaz, 2014^a; de Souza et al., 2023).

Os fatores de virulência do género *Candida* responsáveis pela sobrevivência, crescimento, proliferação e resistência no hospedeiro são a adesão, dimorfismo, variabilidade fenotípica, produção de enzimas, produção de toxinas, capacidade de modular a resposta imunológica, composição da parede celular, mimetismo molecular e a formação de biofilmes (Fig.4) (Brunke et al., 2016; A. Rodrigues & Vaz, 2014a).

Contudo, a capacidade de os fatores de virulência provocarem infeções no individuo encontra-se dependente das interações entre o agente microbiano e o hospedeiro (Brunke et al., 2016).

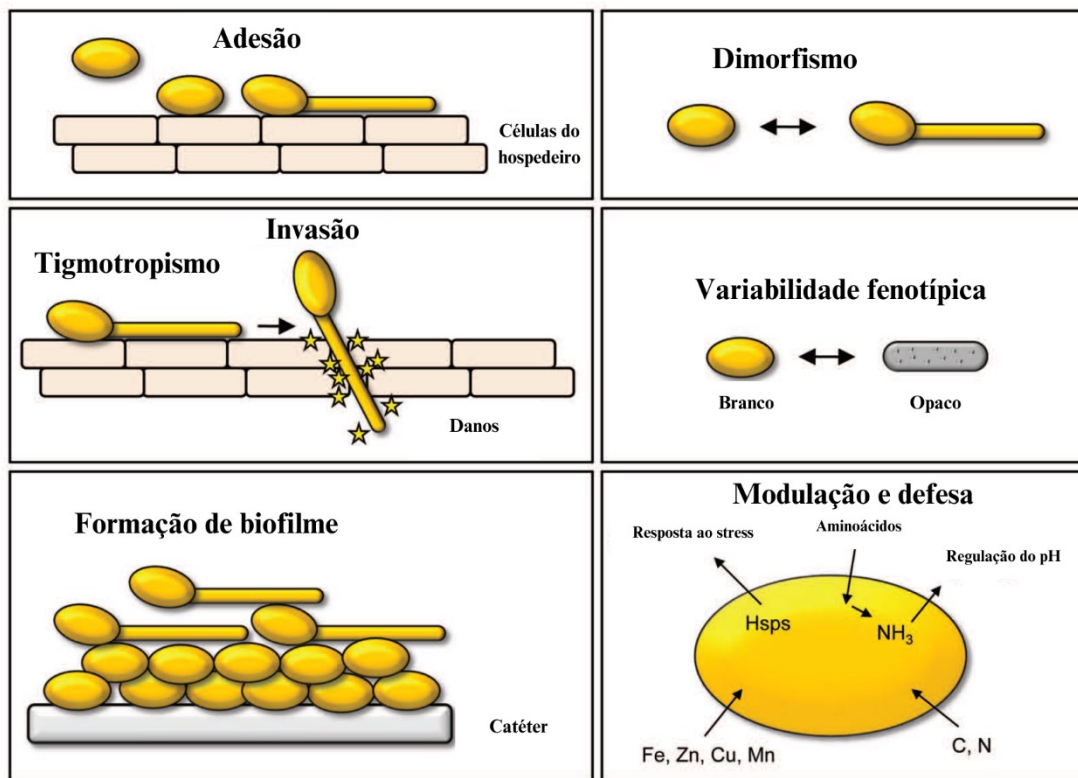


Figura 4. Alguns dos principais fatores de virulência de *Candida* spp. (Adaptado de, Mayer et al., 2013)

3.1. Adesão

O fator de virulência adesão representa o primeiro passo para a colonização e posterior implementação da infecção, uma vez que para o desenvolvimento ocorrer é necessário que as leveduras adiram a uma superfície/ substrato (Czechowicz et al., 2022; Ajetunmobi et al., 2023).

Este mecanismo complexo é caracterizado pela libertação de adesinas situadas na parede da maioria dos microrganismos e que desempenham a função de ligação entre o agente patogénico e o hospedeiro (Czechowicz et al., 2022).

A ligação das adesinas às células epiteliais ou a dispositivos médicos é mediada pela interação entre recetores e por mecanismos não específicos como são exemplo as forças eletrostáticas e a hidrofobicidade das células (Brunke et al., 2016; Czechowicz et al., 2022).

Neste processo de adesão, as espécies *C. albicans* e *C. glabrata* manifestam uma hidrofobicidade semelhante. No entanto, *C. glabrata* apresenta maior estabilidade quando submetida a condições mais variáveis, o que permite uma maior capacidade de adesão ao hospedeiro/ superfície (Czechowicz et al., 2022).

Variáveis como a formação de tubos germinativos, pH, disponibilidade de carboidratos, temperatura e produção de proteases, fosfolipases e enzimas extracelulares afetam a ocorrência deste fenómeno (Naves et al., 2013).

3.2. Dimorfismo

Algumas leveduras do género *Candida*, como é o caso de *C. albicans*, exibem a capacidade de apresentar alterações morfológicas consoante as condições a que se encontram expostas (temperatura, disponibilidade de oxigénio, nutrientes e pH), passando de levedura à sua forma filamentosa (Czechowicz et al., 2022).

A forma leveduriforme é caracterizada por se desenvolver em ambientes ricos e mais propícios à sua multiplicação ($\approx 37^{\circ}\text{C}$), enquanto a forma filamentosa (hifas verdadeiras ou pseudohifas) surge em condições de carência de nutrientes ($\approx 25^{\circ}\text{C}$) (A. Rodrigues & Vaz, 2014a).

Outros exemplos de *Candida* spp. capazes de realizar alterações morfológicas são *C. tropicalis* com a capacidade de formar algumas hifas e *C. parapsilosis* com a capacidade de formar pseudohifas. Por outro lado, *C. glabrata* apenas se desenvolve na sua forma leveduriforme (Czechowicz et al., 2022).

Comparativamente com a forma leveduriforme, a forma filamentosa permite uma maior adesão às células epiteliais ou dispositivo médico, sendo por isso mais difícil a sua eliminação através do sistema imunitário (Naves et al., 2013).

3.3. Variabilidade Fenotípica

De modo a permitir uma adaptação ao meio, as leveduras desenvolveram um mecanismo designado de *phenotypic switching* (variabilidade fenotípica) que permite aos fungos sobreviver, invadir e resistir ao sistema imunitário (A. Rodrigues & Vaz, 2014a).

Caracteriza-se por ser um fenómeno reversível onde as leveduras têm a capacidade de mudar a sua forma, metabolitos e composição bioquímica e molecular, de modo a tornarem-se mais patogénicas consoante as condições de temperatura, disponibilidade de oxigénio, nutrientes e pH (Naves et al., 2013; A. Rodrigues & Vaz, 2014a).

Segundo Paulina Czechowicz, Joanna Nowicka e Grazyna Gosciniak, amostras estudadas de infecções ativas encontravam-se apenas sobre a forma de fungo filamentosos, enquanto as amostras em indivíduos assintomáticos encontravam-se sobre a forma de fungo leveduriforme (Czechowicz et al., 2022).

3.4. Produção de Enzimas

Outro fator de virulência que acrescenta patogenicidade ao gênero *Candida* é a produção de enzimas, nomeadamente fosfolipases, proteases e hemolisinas que por um lado permitem a obtenção de nutrientes e por outro favorecem a passagem pelos tecidos e consecutiva inativação de constituintes do sistema imunitário (Cangui-Panchi et al., 2023; Czechowicz et al., 2022; Naves et al., 2013).

As enzimas fosfolipases, encontradas nos tubos germinativos e à superfície das leveduras desempenham um papel fundamental para a instalação da infecção, uma vez que são responsáveis por degradar a membrana fosfolipídica das células do hospedeiro. Como consequência desta degradação, provocam a modificação das características das células, permitindo uma maior adesão das leveduras às células epiteliais e dispositivos médicos (Naves et al., 2013).

Existem quatro classes de fosfolipases (A, B, C e D), que variam entre si na ligação éster hidrolisada. Praticamente todas as espécies de *Candida* possuem a capacidade de produzir vários tipos destas enzimas (Czechowicz et al., 2022).

Para além das fosfolipases, as proteases têm a capacidade de degradar os constituintes da mucosa do hospedeiro, nomeadamente a queratina e o colagénio e de destruir as moléculas do sistema imunitário como é o caso dos anticorpos e das citosinas, levando a uma melhor adesão e proliferação da infecção (Naves et al., 2013; Czechowicz et al., 2022). Representam o grupo de enzimas com mais estudos realizados, dentro das quais se destaca a Aspartato Protease Secretória (Sap) codificadas por 10 genes *SAP* (Czechowicz et al., 2022).

As Sap, reconhecidas por desempenhar um papel fundamental na colonização e invasão dos tecidos, apresentam a particularidade de favorecer a formação de pseudohifas e hifas, importantes no processo de adesão (Czechowicz et al., 2022). *C. albicans* foi identificada como possuindo dez destes genes (*SAP1-10*), *C. parapsilosis*, três (*SAP1-3*), *C. tropicalis*, quatro (*SAP1-4*) e *Candida dubliniensis*, sete (*SAP1-7*). Já *C. glabrata* é caracterizada por não expressar nenhum gene *SAP* (Czechowicz et al., 2022).

Segundo o estudo realizado por Garcia-Bustos et al., 2022, *C. auris* através da expressão de genes *SAP* reajustou a sua estrutura e adquiriu nutrientes necessários para potenciar a formação e desenvolvimento do seu biofilme (Garcia-Bustos et al., 2022).

As hemolisinas por sua vez, permitem a aquisição de ferro, necessário à invasão dos tecidos, desenvolvimento e proliferação do fungo. No entanto, ainda é escassa a informação sobre a estrutura e consequente função destas (Cangui-Panchi et al., 2023; Czechowicz et al., 2022).

3.5. Produção de Toxinas

Durante a instalação do processo infeccioso, algumas leveduras como *C. albicans* têm a capacidade de produzir moléculas tóxicas, fundamentais para a instalação da infecção (toxicoglicoproteínas e candidalisinas), designadas de toxinas *killer*, capazes de provocar a morte de outros microrganismos (Oliveira et al., 1998; Morales-Menchén et al., 2018; Naves et al., 2013).

As candidalisinas, presentes em *C. albicans*, são toxinas que surgem na presença de hifas e que são fundamentais para a instalação da infecção, dada a capacidade em intercalar-se com as células da membrana, enfraquecendo-a e aumentando a sua permeabilidade, através da criação de poros (Talapko et al., 2021).

Estas toxinas geralmente encontram-se estáveis e ativas em ambientes de temperaturas baixas e pH ácido (Morales-Menchén et al., 2018).

Atuam ao nível da permeabilidade da membrana celular, da interrupção do ciclo celular e da inibição da síntese de ADN, levando à morte de microrganismos e consequente à proliferação da infeção e do biofilme (Palareti et al., 2016; Talapko et al., 2021).

3.6. Capacidade de Modular a Resposta Imunológica

A capacidade que as leveduras exibem em modular a resposta imunológica dificulta a eliminação destas pelo sistema imunitário (Brunke et al., 2016; A. Rodrigues & Vaz, 2014a).

De acordo com alguns autores, certas estirpes de *C. albicans* têm a capacidade de alterar a proporção de células Th1 e Th2 produzidas pelo sistema imunitário do ser humano, aumentando as Th2. Estas células representam dois tipos de células T CDA+ com funcionalidades contrárias. Por um lado, as células Th1 têm como função ativar os fagócitos de modo a eliminar o agente patogénico e por outro lado, as células Th2 potenciam o desenvolvimento e o agravamento da patologia. Uma vez aumentada a proporção de Th2 o sistema imunitário fica comprometido, dificultando a eliminação do agente patogénico (Conchon Costa et al., 2008).

3.7. Composição da Parede Celular

A parede celular das leveduras é caracterizada por realizar as trocas com o meio ambiente, garantir a morfologia e integridade das células e ainda por proteger de fatores/agressões externas (Chaffin, 2008; Childers et al., 2020).

Para além das funções supracitadas, a parede celular das leveduras de *Candida* spp. também adquiriu ao longo dos tempos a capacidade de resistir ao processo de fagocitose mediado pelo sistema imunitário, dificultando o processo de eliminação (Chaffin, 2008; A. Rodrigues & Vaz, 2014a).

Representa ainda a estrutura que desempenha o primeiro contacto com o hospedeiro, e como tal é um alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos (Childers et al., 2020).

3.8. Mimetismo Molecular

O mimetismo molecular é o fator de virulência com menos conhecimento associado e que representa a capacidade que o fungo tem em produzir moléculas próprias, similares às do hospedeiro, capazes de enganar o sistema imunitário e que impedem que ocorra a diferenciação pelas células imunitárias do que são células próprias e células produzidas pelo agente fúngico (Lang et al., 2019; A. Rodrigues & Vaz, 2014a).

Este processo origina um ajuste do fungo, capaz de provocar alterações fisiológicas e celulares no organismo do hospedeiro, contribuindo para a sobrevivência e proliferação do fungo (Lang et al., 2019; Thaper & Prabha, 2018).

É possível diferenciar três tipos de mimetismo, sendo que no tipo 1 ocorrem semelhanças em várias sequências de aminoácidos em diferentes proteínas, no tipo 2, apenas semelhanças estruturais e no tipo 3 ocorre o reconhecimento de diferentes estruturas químicas pelo mesmo tipo de anticorpo (Thaper & Prabha, 2018).

3.9. Formação de Biofilmes

As espécies de *Candida* representam os microrganismos mais presentes nos cuidados de saúde, uma vez que se encontram presentes na pele e mãos dos indivíduos, aumentando por isso a probabilidade de desenvolvimento de infeções, principalmente quando ocorre a colocação de dispositivos médicos (Leal, 2019; Ramage et al., 2023).

O desenvolvimento e crescimento do gênero *Candida* pode ocorrer de forma planctônica ou em biofilme, sendo que a formação de biofilme ocorre quando as células planctônicas encontram uma superfície de adesão e multiplicam-se de forma ordenada. Deste modo, as células conseguem captar uma maior quantidade de nutrientes, essenciais ao seu crescimento e desenvolvimento (Fig.5) (Naves et al., 2013; Rodríguez-Cerdeira et al., 2018).

Sendo *Candida* spp. um dos fungos mais presente no microbioma humano, a espécie de *C. albicans* é a mais identificada em isolados de biofilmes (Ponde et al., 2021).

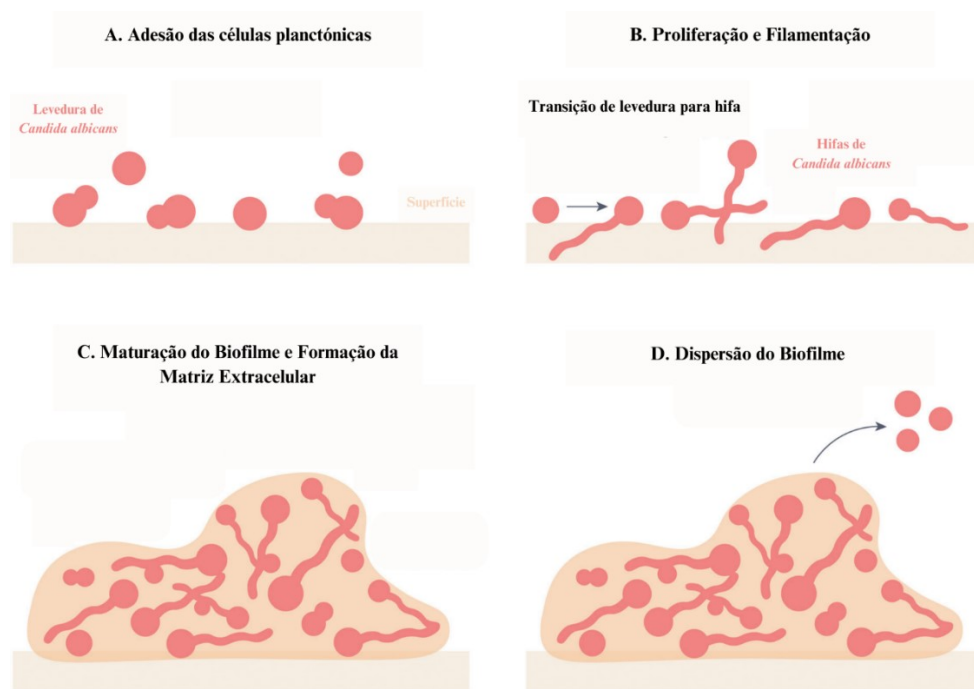


Figura 5. Formação de um Biofilme de *Candida albicans* (Adaptado de, Ponde et al., 2021)

Após a instalação da infecção, ocorre uma expressão de genes, responsáveis por produzir a matriz extracelular da qual se vai desenvolver o biofilme (Rodríguez-Cerdeira et al., 2018).

O crescimento e desenvolvimento sob esta forma, permite às células a aquisição de formas fenotípicas diferentes, originando como consequência, uma resistência aos antifúngicos diferente da encontrada em células planctônicas (Ajetunmobi et al., 2023; Naves et al., 2013).

Seguidamente os biofilmes serão explicados de forma mais aprofundada.

4. Biofilmes

4.1. Formação do Biofilme

Os biofilmes fúngicos são estruturas tridimensionais bem organizadas e de elevada resistência aos antifúngicos que têm a capacidade de acolher ou não na sua estrutura outros microrganismos oportunistas. (Canguí-Panchi et al., 2023; Czechowicz et al., 2022; Rodríguez-Cerdeira et al., 2018).

Representam ainda um mecanismo de sobrevivência dos fungos, uma vez que permitem a adesão e proliferação destes. Para que estes dois fenómenos ocorram, os biofilmes fúngicos apresentam uma constituição muito própria que tem por base células leveduriformes rodeadas por uma matriz extracelular (ECM) (Leal, 2019).

O seu processo de formação divide-se em quatro fases: a **fase de iniciação** onde ocorre a adesão do fungo a uma superfície, a **fase intermédia** onde se dá a multiplicação, filamentação, e formação da matriz extracelular, a **fase de maturação**, e por último a **fase de dispersão** (Fig. 6) (Czechowicz et al., 2022).

A progressão das diversas fases varia consoante a espécie de *Candida*, as condições do meio ambiente e a superfície de adesão (Czechowicz et al., 2022).

A formação e desenvolvimento do biofilme ocorre num intervalo de tempo de 24h a 48h e começa conforme mencionado anteriormente com uma **fase de iniciação** que é decisiva para a formação do biofilme e onde as leveduras aderem a uma superfície/ substrato (biótico/ abiótico) de forma irreversível (Del Pozo & Cantón, 2015; Naves et al., 2013; Rodríguez-Cerdeira et al., 2018; Pereira et al., 2021). Nesta fase, fatores como o tipo de fluido corporal, a espécie de levedura em causa, a natureza do substrato onde se vai dar o processo de adesão e a origem clínica da infeção, influenciam o tipo de biofilme que se irá formar (Del Pozo & Cantón, 2015; Rodríguez-Cerdeira et al., 2018). Contudo, a forma como as leveduras e outros microrganismos interagem entre si e aderem às superfícies também depende do tipo de adesinas produzidas e de fatores não específicos como é exemplo a tensão superficial, a hidrofobicidade e as forças eletrostáticas (Del Pozo & Cantón, 2015).

Posteriormente, é necessário que as leveduras em fase exponencial atinjam uma densidade suficiente para se desenvolver a **fase intermédia** (Del Pozo & Cantón, 2015). Atingida essa densidade, ocorre a expressão de genes e é sintetizada a matriz extracelular através de moléculas *Quorum Sensing* (QS) que funcionam como sinais de comunicação (Del Pozo & Cantón, 2015; Naves et al., 2013; Rodríguez-Cerdeira et al., 2018).

A esta fase intermédia segue-se a **fase de maturação** onde as leveduras possuem a capacidade de mudar a sua estrutura para hifas verdadeiras ou pseudohifas, de alterar a composição da parede celular e de provocarem no sistema imunitário do hospedeiro uma redução da capacidade microbicida e de opsonização dos leucócitos (Ajetunmobi et al., 2023; Del Pozo & Cantón, 2015; Naves et al., 2013). Durante e após esta fase, a matriz extracelular apresenta-se no seu estado de maior desenvolvimento e complexidade (Pereira et al., 2021).

Concluídas estas três fases, o resultado obtido origina uma densa e complexa rede de leveduras, hifas verdadeiras e pseudohifas, rodeada de uma matriz extracelular (Rodríguez-Cerdeira et al., 2018).

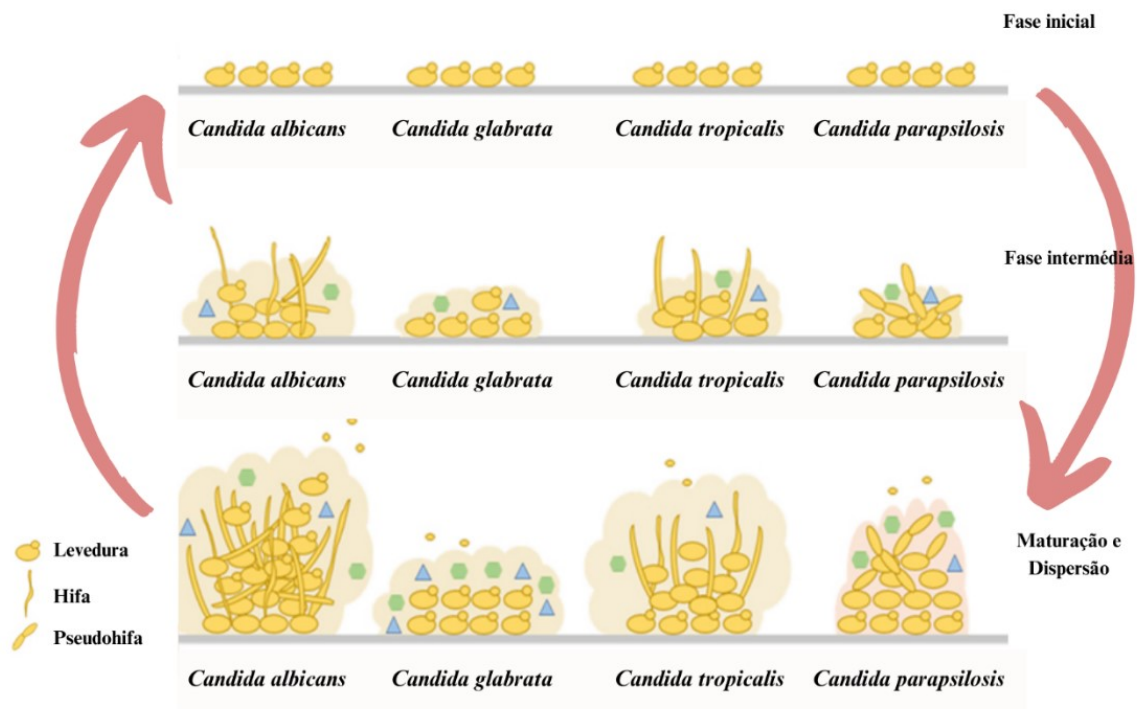


Figura 6. Fases de desenvolvimento de biofilmes em *Candida* spp. (Adaptado de, Cavalheiro & Teixeira, 2018)

Por fim, sucede-se a **fase de dispersão**, onde são libertados fragmentos do biofilme, de modo a colonizar outras superfícies, gerando um novo ciclo (Rodríguez-Cerdeira et al., 2018).

Vários estudos efetuados sobre os biofilmes demonstraram que algumas proteínas como é o caso das enzimas álcool desidrogenase (ADH), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e piruvato-quinase (PK) e alguns genes como o *ALS3*, *ACE2*, *NRG1*, *UME6* e *EFG1* podem estar envolvidos na formação dos biofilmes (Fig. 7) (Rodríguez-Cerdeira et al., 2018).

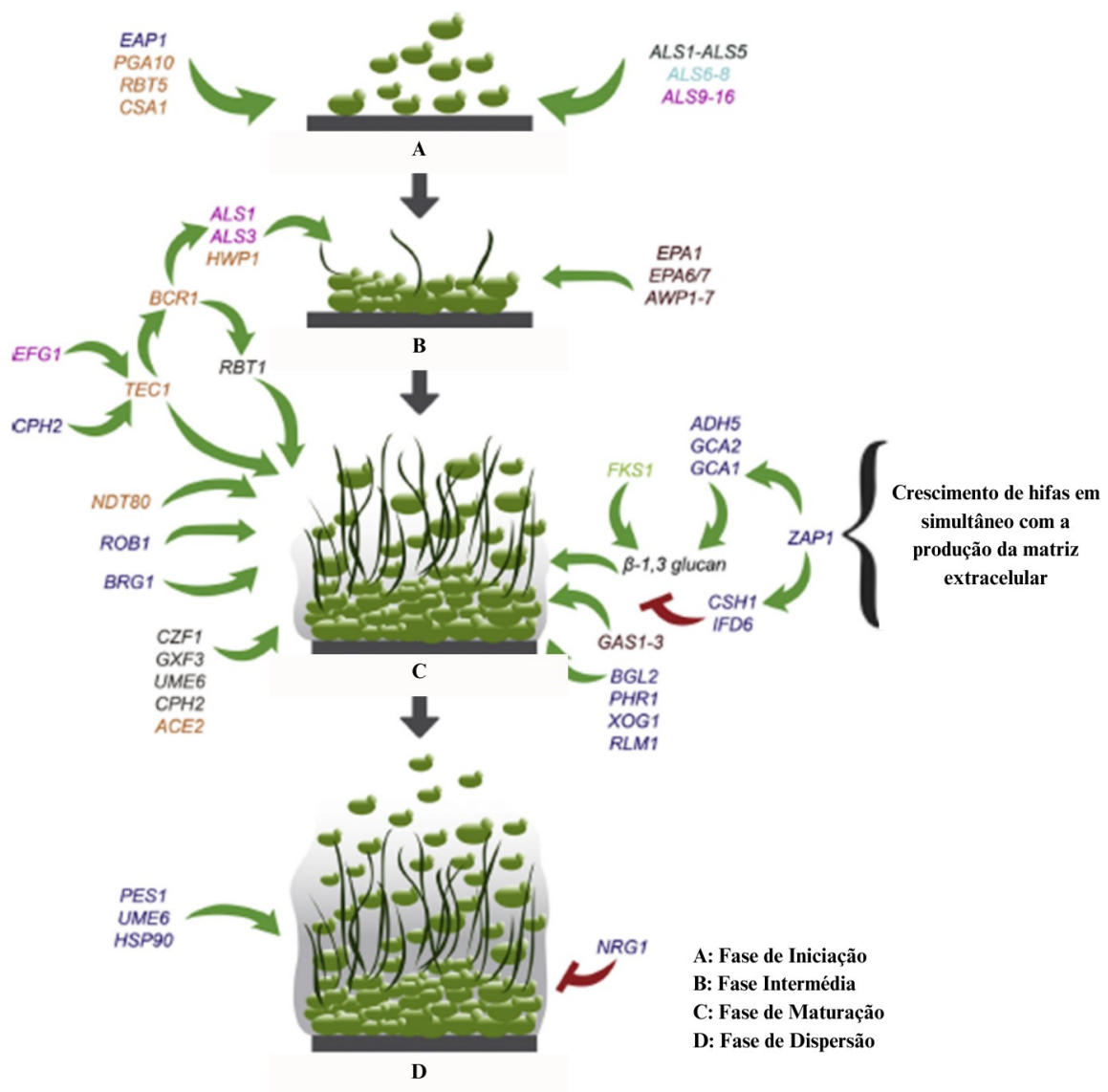


Figura 7. Fases de desenvolvimento dos biofilmes e proteínas intervenientes (Adaptado de, Rodríguez-Cerdeira et al., 2019)

No que diz respeito ao desenvolvimento e composição do biofilme existem diferenças consoante o lugar de adesão (células epiteliais/ mucosas (substrato biótico) ou dispositivos médicos (substrato abiótico)) bem como, se o seu crescimento e desenvolvimento é realizado *in vitro* ou *in vivo* (Rodríguez-Cerdeira et al., 2018).

Os biofilmes de *C. glabrata*, quer *in vitro*, quer *in vivo*, finalizam a fase de iniciação ao fim de aproximadamente 24h e apresentam como diferença o facto de *in vivo* esta espécie apresentar um biofilme com menor quantidade de células aglomeradas, uma vez que o desenvolvimento do biofilme depende do número de células que adiram inicialmente ao substrato (Rossoni et al., 2017).

Usualmente os biofilmes formados por *C. glabrata* são caracterizados por possuírem aproximadamente metade do tamanho (biomassa) e menos complexidade quando comparados com os biofilmes de *C. albicans* (Rodríguez-Cerdeira et al., 2018; Rossoni et al., 2017).

Por outro lado, espécies como *C. auris*, dispõem da capacidade de formar agregados celulares, designado de fenótipo agregativo que produz biofilmes de biomassa inferior quando comparados com os biofilmes produzidos por *C. auris* de fenótipo não agregativo (Fig.8). Este último fenótipo revela uma maior virulência e capacidade de resistência aos antifúngicos. (Sherry et al., 2017).

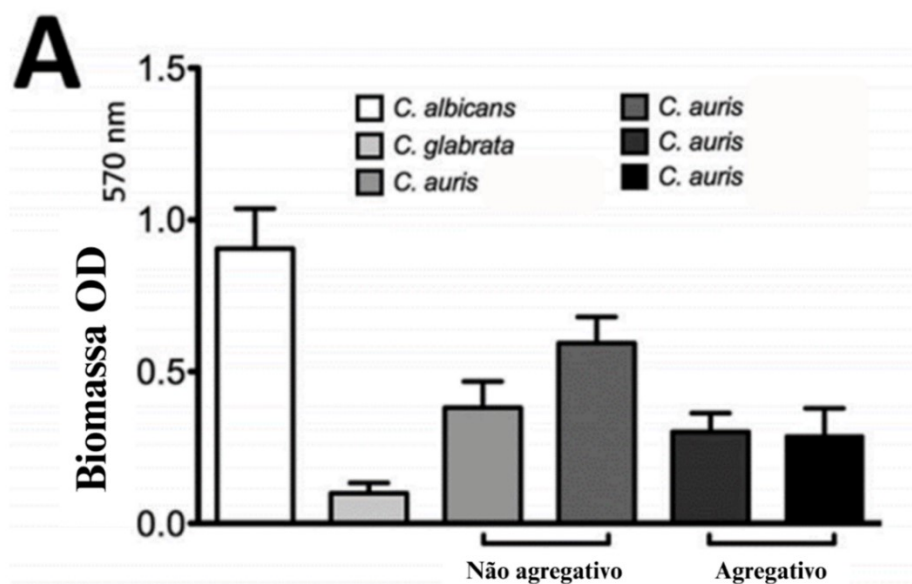


Figura 8. Biomassa de algumas espécies de *Candida* (Adaptado de, Sherry et al., 2017)

4.1.1. Composição dos Biofilmes

A composição da matriz extracelular é variável consoante a espécie em causa, no entanto, de um modo geral os seus constituintes principais são a água (cerca de 98%), os carboidratos, os polissacáridos, as proteínas, os fosfatos, o ácido úrico e os ácidos nucleicos, sendo que todos estes em conjunto conferem uma textura viscosa e gelatinosa ao biofilme (Del Pozo & Cantón, 2015).

C. albicans é a única espécie que na composição do biofilme apresenta hifas verdadeiras, tornando a sua estrutura mais densa, uma vez que *C. parapsilosis* apenas consegue formar pseudohifas (Del Pozo & Cantón, 2015).

Das espécies não *albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* são maioritariamente constituídas por carboidratos, seguidos de proteínas, sendo que *C. glabrata* apresenta uma maior proporção de proteínas que *C. parapsilosis* (Del Pozo & Cantón, 2015).

4.1.2. Fenómeno *Quorum Sensing*

Após estar concluída a fase de iniciação e atingida a densidade necessária, as leveduras aderentes iniciam a produção de moléculas sinalizadoras que vão ser responsáveis por ativar a expressão de genes, a que se atribui a designação de fenómeno *Quorum Sensing* (QS) (Del Pozo & Cantón, 2015; C. F. Rodrigues & Černáková, 2020 Pereira et al., 2021).

O fenómeno de *Quorum Sensing* ocorre de modo que possa existir comunicação entre células e proliferação do biofilme (Cavalheiro & Teixeira, 2018; C. F. Rodrigues & Černáková, 2020).

Estas moléculas têm a função de induzir a formação do biofilme, sendo produzidas pelas células leveduriformes em quantidades proporcionais ao desenvolvimento (densidade) do biofilme (C. F. Rodrigues & Černáková, 2020; Del Pozo & Cantón, 2015).

Alguns exemplos de moléculas QS secretadas pela levedura são o tirosol, farnesol, feniletanol e o triptofol (C. F. Rodrigues & Černáková, 2020). Dentro destas, distinguem-se o tirosol e o farnesol. A molécula tirosol é responsável por induzir a formação do biofilme na fase de iniciação e na fase intermédia (Del Pozo & Cantón, 2015). Por outro lado, o farnesol apresenta uma função antagonista ao tirosol, inibindo a formação de hifas e/ ou pseudohifas e favorecendo a forma leveduriforme, facilitando a dispersão do biofilme (Fig.9) (Cavalheiro & Teixeira, 2018; Pereira et al., 2021).

Segundo Pereira et al., 2021, a descoberta da implicação da molécula farnesol no fenómeno *QS* foi muito importante, uma vez que proporciona um impacto direto na patogénese, morfogénese e formação de filamentos do fungo (Pereira et al., 2021).

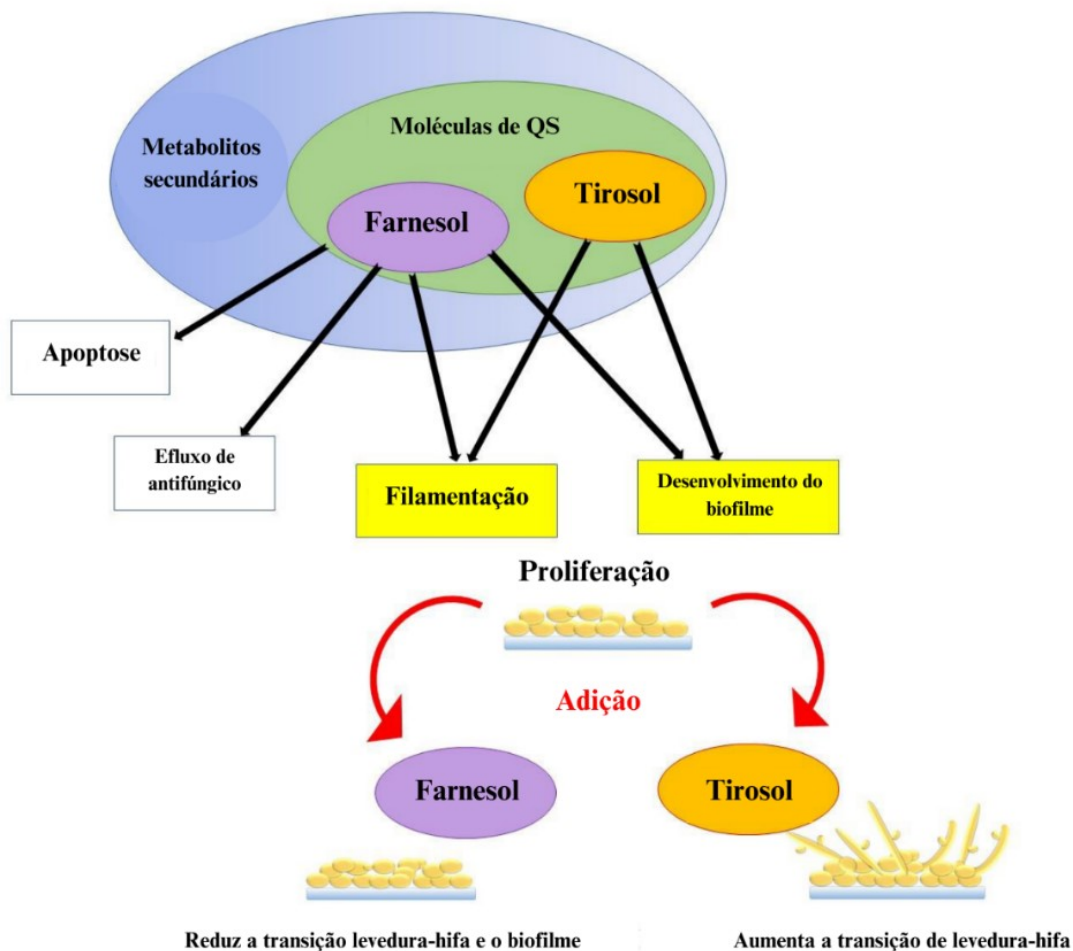


Figura 9. Importância do Farnesol e do Tirosol no desenvolvimento dos biofilmes (Adaptado de, C. F. Rodrigues & Černáková, 2020)

4.2. Fatores do Hospedeiro que influenciam a formação do Biofilme

Durante a instalação e desenvolvimento do biofilme existem alguns fatores como o meio ambiente (presença ou ausência de fluidos corporais), a superfície de adesão (biótica ou abiótica), a espécie em causa e a origem clínica da infecção que influenciam a formação do biofilme (Del Pozo & Cantón, 2015).

O desenvolvimento e proliferação da infecção ocorre em indivíduos que apresentam debilitações no sistema imunitário como por exemplo, doenças como cancro e HIV, terapêuticas imunossupressoras e/ou antimicrobianas, entre outras, ou que devido à presença de outras doenças e/ou ocorrências, tornam o hospedeiro mais disponível para o desenvolvimento de infeções, como a diabetes, as infeções pulmonares, os internamentos nas unidades de cuidados intensivo e as intervenções cirúrgicas (Ramage et al., 2023).

A contaminação por *Candida* spp. pode ser feita através de diversas formas, conforme ilustrado na Fig. 10 (Ramage et al., 2023).

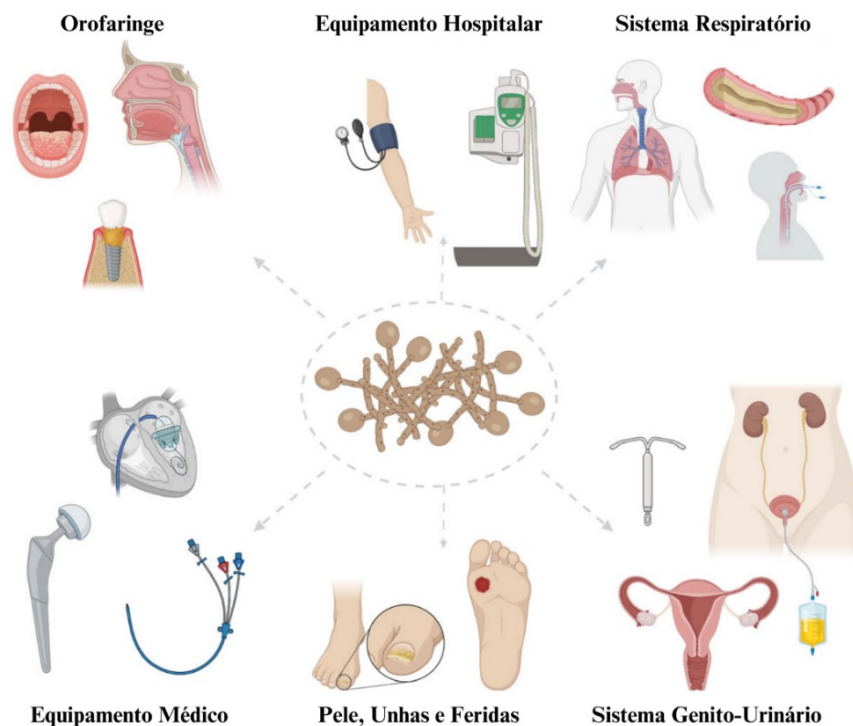


Figura 10. Locais de relevância clínica onde podem ser adquiridas as espécies de *Candida* (Adaptado de, Ramage et al., 2023)

A contaminação e proliferação do biofilme pode dar-se em materiais como válvulas prostéticas, cateteres, lentes artificiais, implantes, entre muitos outros e em procedimentos cirúrgicos como a artroplastia e as intervenções articulares (Ramage et al., 2023). A presença de feridas e queimaduras também contribuem para o desenvolvimento dos biofilmes (Ramage et al., 2023). Para além destes fatores, muitos outros encontram-se na base para o desenvolvimento da infeção por *Candida spp.*, conforme indicado na Tabela 1.

Tabela 1. Fatores de risco para o desenvolvimento de infeções locais e sistémicas por *Candida spp.* (Adaptado de, Ramage et al., 2023)

Fatores de Risco

1.	Cateteres	11.	Suscetibilidade Genética
2.	Dispositivos prostéticos	12.	Transplantes de órgãos
3.	Dentaduras	13.	Quimioterapia e Radioterapia
4.	Traumas externos e/ou internos	14.	Terapia Imunossupressora
5.	Feridas e queimaduras	15.	Doenças Imunossupressoras
6.	Xerostomia	16.	HIV
7.	Tratamento com antibióticos de largo espectro	17.	Infeções (ex: Tuberculose)
8.	Uso de Esteroides	18.	Disfunção renal e/ou hepática
9.	Nutrição	19.	Gravidez
10.	Duches Vaginais	20.	Hiperglicémia

Numa unidade de cuidados intensivos da especialidade cardiotorácica no Reino Unido, *C. auris* comprovou a sua capacidade de proliferação e resistência ao espalhar-se rapidamente e resistindo a várias tentativas de tratamento (Ramage et al., 2023; Schelenz et al., 2016). Este estudo ficou relatado como o primeiro surto de *C. auris* a ocorrer em hospitais europeus, responsável por infectar 50 pacientes e em que a disseminação teve início numa ferida externa (Schelenz et al., 2016).

Cerca de 60 a 70% das infeções diagnosticadas em hospitais estão diretamente relacionadas com a colocação de dispositivos médicos, tendo sido demonstrado por um estudo realizado em 89 pacientes que *C. albicans* era o isolado predominante, seguido de *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (Ramage et al., 2023).

4.3. Defesas do Hospedeiro contra os Biofilmes

Após ocorrer a instalação da infeção por *Candida*, vários mecanismos de resposta imunológica ocorrem no organismo humano, na tentativa de combater essa mesma infeção (Cangui-Panchi et al., 2023; Roilides et al., 2015). Participam nesta resposta, fatores humorais (lectinas, colectinas, sistema complemento e anticorpos) que se ligam aos antígenos com a finalidade de os reconhecer e fagocitar (Roilides et al., 2015).

Apesar de serem necessárias entre 0 e 96 horas para que a imunidade inata atue na instalação e propagação da infeção e inclusivamente na formação do biofilme, este tipo de mecanismo é limitado e não tem a capacidade de se adaptar aos diversos fatores de virulência de *Candida* spp., levando a uma fácil proliferação da infeção e estabelecimento do biofilme (Cangui-Panchi et al., 2023). Em contrapartida, o mecanismo de imunidade adquirida possui capacidades adaptativas, mas com um intervalo de resposta superior a 96 horas que se demonstra tardio na grande maioria das vezes, uma vez que os linfócitos T e B não possuem a capacidade de alcançar as células fúngicas dentro da estrutura do biofilme (Cangui-Panchi et al., 2023; Roilides et al., 2015).

4.4. Metodologia para Avaliação dos Biofilmes

Neste tópico são descritas algumas metodologias para avaliação dos biofilmes, uma vez que representam um ponto fundamental para a compreensão da formação e proliferação dos biofilmes e ainda para o desenvolvimento de novas terapêuticas.

4.4.1. Meios de Cultura

A inoculação de *Candida* spp. em meios de cultura permite a análise da viabilidade e da pureza das amostras em estudo (Plinio Da Silva-Rocha et al., 2014). Após a recolha e tratamento da amostra inicial, a inoculação é feita em meios de cultura como é exemplo o meio Sabouraud Dextrose Agar com cloranfenicol e o meio CHROMagar *Candida* que deverão ser incubados em estufa a 37°C durante 48 horas. (Fernandes et al., 2023; Plinio Da Silva-Rocha et al., 2014).

4.4.2. Formação do Biofilme

Para que ocorra a formação e proliferação do biofilme, as amostras inoculadas em meio Sabouraud Dextrose Agar são transferidas sob ambiente asséptico para placas de poliestireno e posteriormente incubadas sob agitação a 37°C durante 24 a 48 horas (Fernandes et al., 2023; Salvatore et al., 2022).

4.4.3. Quantificação do Biofilme

Posteriormente ao processo de formação do biofilme, as placas são lavadas com uma solução PBS (Solução Salina Tamponada com Fosfato) de modo a remover as células que não aderiram à superfície (Fernandes et al., 2023).

A quantificação pode ser efetuada através de vários métodos, no entanto será abordada a quantificação através de um leitor de microplacas e através da metodologia de contagem do número de unidades formadoras de colónias (UFC) (Atiencia-Carrera et al., 2022; Fernandes et al., 2023; Plinio Da Silva-Rocha et al., 2014). Na quantificação por leitor de microplacas, as placas são coradas com o corante safranina-O durante 15min a 22°C e de seguida, eliminado o excesso da solução dos poços através de lavagens com PBS e colocadas a secar à temperatura ambiente. Por último, é adicionada uma solução aquosa de ácido acético (10% v/v) durante 20min a 25°C para descolorar (Salvatore et al., 2022).

Para a contagem do número de unidades formadoras de colónias, o conteúdo é retirado dos poços e diluído em 1mL de PBS. Posteriormente, é semeado em meio Sabouraud Detrose Agar, incubado durante 24 horas a 37°C e efetuada a contagem (Fernandes et al., 2023).

4.4.4. Análise da Expressão Genética

Esta análise pode ser efetuada através de vários métodos e tem como principal objetivo analisar a expressão de determinados genes e permitir a identificação da composição relativa do biofilme (Nailis et al., 2010; Salvatore et al., 2022; Young et al., 2021). Em vários estudos é efetuado um PCR em tempo real, durante o desenvolvimento do biofilme em que genes responsáveis pela expressão de fatores de virulência, também se expressam na formação e instalação do biofilme (Nailis et al., 2010; Salvatore et al., 2022).

4.4.5. Extração de ADN e RNA

Para possibilitar a extração de ADN, as células de *Candida* são colocadas num extrato de levedura peptona e dextrose a 30°C com uma rotação de 200rpm durante a noite (Plinio Da Silva-Rocha et al., 2014). No estudo foi utilizado o reagente preparador de amostras PrepMan Ultra e posteriormente verificada a concentração e pureza do ADN no NanoDrop (Plinio Da Silva-Rocha et al., 2014).

Num outro estudo, o RNA foi extraído através do KIT Direct-zol™ RNA Miniprep Plus e a sua concentração e pureza analisadas através do NanoDrop 2000 (Salvatore et al., 2022).

4.5. Terapêutica Antifúngica

No que diz respeito à terapêutica a implementar, é importante ressaltar o atual problema dos clínicos na resistência aos antimicrobianos (Khan et al., 2021). Esta resistência é variável dentro das espécies e pode ocorrer em todas as classes de antimicrobianos, dificultando a escolha da terapêutica a instituir (Medeiros et al., 2019).

Os fármacos antifúngicos apresentam uma limitada capacidade de atuação no agente patogénico, que está diretamente relacionada com a escassez de mecanismos de ação e alvos terapêuticos onde os mesmos podem atuar (Fig.11) (Lee et al., 2021; Pierce et al., 2013).

Os antifúngicos da classe dos azóis, polienos e equinocandinas representam a base da terapêutica no combate aos fungos (Pierce et al., 2013).

Mais recentemente, surge a classe dos triterpenóides, com características que permitem a sua administração por via oral e um elevado espectro de ação (Angulo et al., 2022).

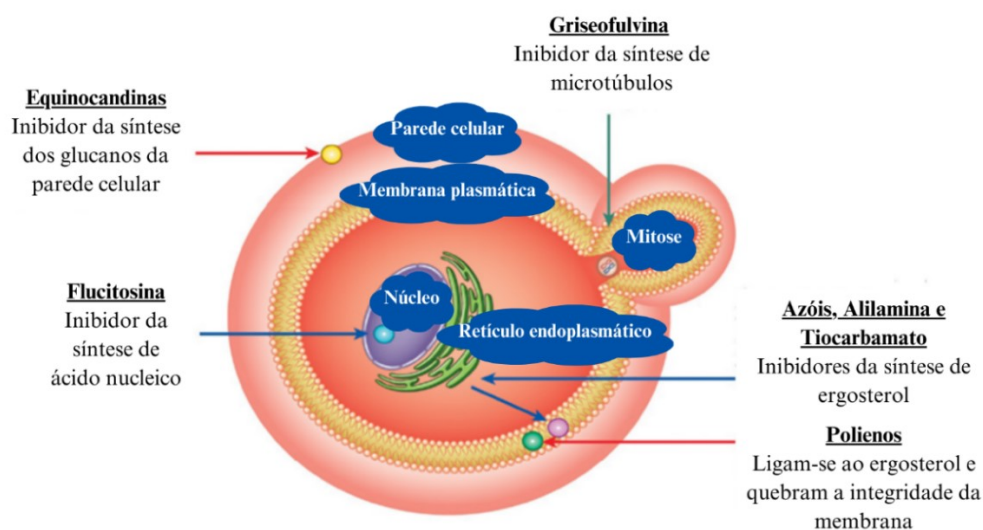


Figura 11. Alvos terapêuticos dos antifúngicos (Adaptado de, Santos et al., 2018)

A classe dos **Azóis** foi utilizada pela primeira vez nos anos oitenta e é responsável por atuar no crescimento e proliferação celular, representando a classe com mais variedade de antifúngicos disponíveis (Lee et al., 2021). No entanto, possuem limitações, uma vez que apenas inibem a proliferação do fungo, não sendo capazes de erradicar o mesmo (G. C. de O. Santos et al., 2018; Lee et al., 2021).

Atuam na síntese da membrana através da inibição da síntese do ergosterol, um constituinte fundamental para a integridade e estabilidade do fungo, e ao contrário do que acontece com as restantes classes de antifúngicos, a classe dos azóis apresenta uma elevada biodisponibilidade, pelo que a sua formulação oral e intravenosa é possível (Branco et al., 2023; Lee et al., 2021).

O Fluconazol, representa um antifúngico triazólico da classe dos azóis mais utilizado e ao qual *C. albicans* é sensível, ao contrário do que acontece com *C. glabrata* e *C. auris* (Lee et al., 2021).

Os azóis de segunda geração incluem o voriconazol, o posaconazol e o isavuconazol, que se caracterizam por apresentar melhor perfil farmacológico e espectro mais alargado contra CNA resistentes ao fluconazol e itraconazol (Pereira et al., 2021).

Como mecanismos de resistência, existem as bombas de efluxo que expõem o fármaco do interior da célula, as mutações nos genes *ERG* presentes na síntese do ergosterol e ainda alterações nas concentrações de lanosterol, composto essencial à síntese do ergosterol (Branco et al., 2023).

Nos anos cinquenta, os **Polienos** começaram a ser utilizados na prática clínica, sendo o mais utilizado e prescrito, a Anfotericina B (Lee et al., 2021). Recentemente o que se pensava ser o mecanismo de ação desta classe sofreu alterações, pelo que passaram a ser descritos como um grupo de antifúngicos capazes de formar agregados extramembranosos que extraem o ergosterol das células, provocando a morte da célula (Branco et al., 2023; Lee et al., 2021).

No entanto, e apesar de um elevado espectro de ação, a Anfotericina B apresenta baixa biodisponibilidade oral e elevada toxicidade para o hospedeiro. Com o passar dos anos, o nível de formulações tem sido melhorado e desenvolvido, no entanto a sua utilização continua diminuída pelos efeitos tóxicos que apesar de inferiores, continuam a ser prejudiciais (Branco et al., 2023; Lee et al., 2021).

Ao contrário de *C. auris*, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* apresentam elevada suscetibilidade à Anfotericina B (Branco et al., 2023; Lee et al., 2021).

A resistência de *C. auris* à Anfotericina B ainda não é bem conhecida, no entanto é descrita como a existência de mutações nos genes responsáveis pela produção de ergosterol. Tal mecanismo gera alterações na constituição do ergosterol, não sendo por isso reconhecido pela Anfotericina B (Branco et al., 2023).

As **Equinocandinas** representam uma classe de antifúngicos descoberta na última década, que provem de produtos naturais e que tem a capacidade de quebrar a estrutura da parede celular. Todas as equinocandinas são hexapéptidos cíclicos, estruturalmente semelhantes, com cadeias laterais lipofílicas modificadas que desempenham um papel crucial na ancoragem do núcleo do fármaco à membrana da célula fúngica, permitindo a interação com o alvo (Branco et al., 2023; Lee et al., 2021).

Alguns exemplos de antifúngicos recentes desta classe são: a caspofungina, micafungina e anidulafungina, sendo que este último atua contra biofilmes de *Candida* spp. (Ajetunmobi et al., 2023; Branco et al., 2023).

Devido à sua elevada eficiência e perfil de segurança perante *Candida* spp., são a classe de antifúngicos recomendada como tratamento de primeira linha, no entanto, devido à sua baixa biodisponibilidade oral, apenas podem ser administrados por via intravenosa (Branco et al., 2023; Lee et al., 2021).

Mais recentemente surge a Rezafungina, uma equinocandina mais estável e duradoura que permite que a administração intravenosa ocorra apenas com uma periodicidade semanal e que se encontra indicada para o tratamento de candidêmias, candidoses invasivas e biofilmes de *C. albicans* (Ajetunmobi et al., 2023; Ramage et al., 2023).

Apresentam como mecanismo de resistência as mutações nos genes *FKS*, o que impede que haja a rotura da parede celular do microrganismo (Branco et al., 2023).

Por último, a classe dos Triterpenóides, nomeadamente o antifúngico Ibrexafungerp, passível de administrar via oral, com uma biodisponibilidade entre 35%-50%, boa permeabilidade nos tecidos e um largo espectro de ação, atua ao nível da inibição da síntese dos glucanos da parede celular, à semelhança das equinocandinas, conforme indicado na Fig. 12 e está aprovado no tratamento de candidoses vulvovaginais (Angulo et al., 2022; Hoenigl et al., 2022).

Apresenta como grandes vantagens a baixa toxicidade e um reduzido número de efeitos secundários quando comparado a outras classes de antifúngicos, uma vez que atua numa via enzimática que não é expressa pelo corpo humano. O mesmo pode ser utilizado em monoterapia ou em combinação, de modo a otimizar a terapêutica (Angulo et al., 2022).

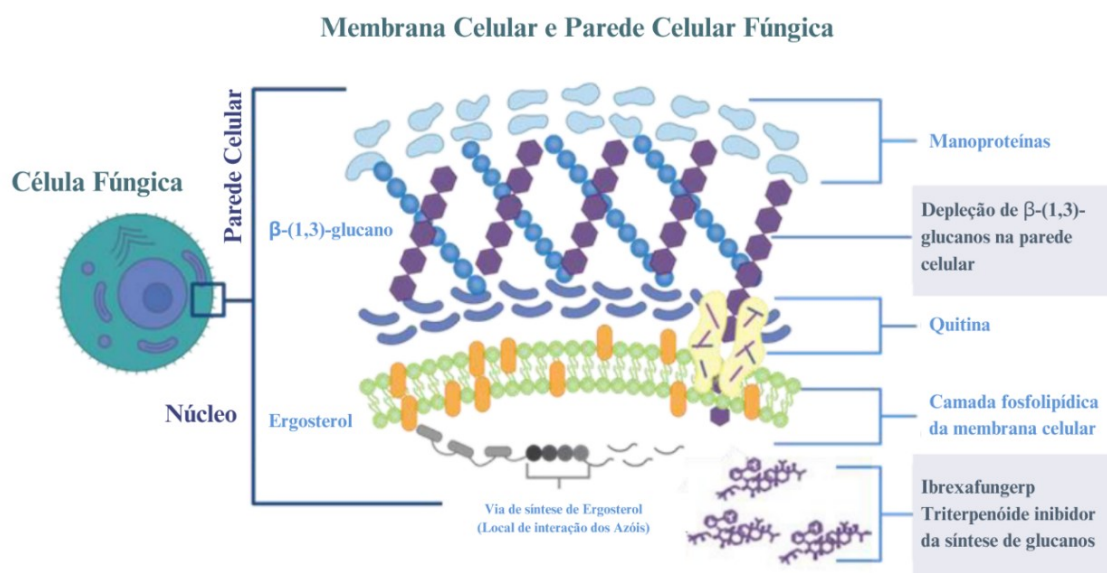


Figura 12. Alvo terapêutico do Ibrexafungerp (Adaptado de, Angulo et al., 2022)

Mais recentemente, encontra-se ainda em fase de estudo e limitado a nível de informação científica, o Fosmanogepix, um novo antifúngico pertencente a uma nova classe, designada de Gepix, disponível em formulação oral e com largo espectro de ação (Ajetunmobi et al., 2023; Ramage et al., 2023).

Atualmente, os antifúngicos utilizados no tratamento dos biofilmes atuam maioritariamente ao nível de quatro fases: na adesão, na síntese da matriz celular, na atenuação dos fatores de virulência e no fenómeno de *Quorum Sensing* (Khan et al., 2021).

No que diz respeito à resistência dos biofilmes aos antifúngicos, esta é mil vezes superior à apresentada pelas células na sua forma planctónica e manifesta-se através de vários mecanismos como é exemplo: a existência de bombas de efluxo, a transferência de genes de resistência e a formação de células persistentes (Khan et al., 2021).

Quanto à matriz que envolve os biofilmes, a mesma tem a capacidade de proteger outros agentes patogénicos que estejam envolvidos na sua constituição, sendo que esta proteção é sobretudo vantajosa para resistir aos agentes antimicrobianos (Koo et al., 2018).

Tabela 2. Classes de antifúngicos e respetivas ações

Classe de Antifúngicos	Ação
Azóis	Fungistático
Polienos	Fungicida
Equinocandinas	Fungicida
Triterpenóides	Fungicida

4.6. Profilaxia

Devido ao aumento da incidência dos biofilmes, a terapêutica profilática tem sido proposta como uma possibilidade de impedir a formação e desenvolvimento destes mesmos biofilmes (Rinaldi et al., 2021).

Em indivíduos transplantados em que há risco de desenvolvimento de infecções invasivas é recomendado efetuar pós cirurgia, a profilaxia antifúngica direcionada, ao invés da tradicional profilaxia universal, de modo a diminuir as probabilidades de desenvolvimento de infecção e posterior formação de biofilmes (Breitkopf et al., 2023; Rinaldi et al., 2021). No entanto, são necessárias precauções na utilização dos agentes antifúngicos como profilaxia, uma vez que nos indivíduos onde a infecção acaba por se desenvolver, existe uma tendência para que esta seja mais resistente, aumentando a morbidade e consequentemente, a mortalidade (Jenks et al., 2020).

A utilização de soluções de limpeza e desinfecção à base de clorohexidina são aconselhadas e eficazes no controlo da proliferação de células planctónicas, o que irá consequentemente diminuir a probabilidade de desenvolvimento de infecção e posterior formação de um biofilme (Sherry et al., 2017).

A toma de probióticos como os *Lactobacillus* demonstrou eficácia na instalação da infecção e consequentemente na não formação de biofilmes vaginais, uma vez que têm um papel de barreira defensiva, não permitindo que o fungo se ligue à membrana epitelial do hospedeiro (Rodríguez-Cerdeira et al., 2019).

Apesar de a prevenção ser o fator essencial para evitar o desenvolvimento de infecções e posterior formação de biofilmes, quando o mesmo não é possível, é fundamental que o diagnóstico da infecção seja feito o mais precocemente possível, de modo a possibilitar um tratamento bem-sucedido e erradicação da infecção (Ramage et al., 2023).

5. Discussão de Resultados

C. albicans, conforme mencionado anteriormente, representa o agente fúngico mais recorrente de causar infeções invasivas, originando na sua maioria biofilmes associados a superfícies do hospedeiro ou a dispositivos médicos, contribuindo para elevadas taxas de morbilidade e mortalidade associada a esta espécie (Pereira et al., 2021).

Segundo Mafalda Cavalheiro e Miguel Cacho Teixeira, um estudo efetuado com isolados de biofilmes de *C. albicans*, apresentou uma resistência cinco a oito vezes superior quando comparado com o fungo na sua forma de células planctónicas (Cavalheiro & Teixeira, 2018). Tal facto contribui para um portfólio reduzido de antifúngicos ativos contra *C. albicans* e uma necessidade de descoberta de novas opções terapêuticas de largo espectro (Pereira et al., 2021).

Das espécies *Candida* não *albicans*, *C. tropicalis* é caracterizada como tendo uma capacidade normal a elevada de produzir biofilmes, sendo isolada frequentemente nas infeções em articulações próstética, em pacientes com problemas endodónticos e com colite ulcerosa (Atencia-Carrera et al., 2022).

C. glabrata e *C. kruzei* foram identificadas respetivamente como segunda e terceira espécie com maior capacidade de formar biofilmes, apesar de *C. glabrata* se encontrar associada a biofilmes em pacientes com nutrição parenteral, patologias periodontais, que utilizam ventiladores e que possuem feridas cirúrgicas sem cicatrização, enquanto *C. kruzei* está associada a infeções nas mucosas do hospedeiro e pneumonias (Atencia-Carrera et al., 2022).

Em 2017, segundo Sherry et al., 2017, biofilmes de *C. auris* demonstraram o seu perfil de resistência à caspofungina, ao contrário do que acontece em células planctónicas de *C. auris* e na grande maioria dos biofilmes de *Candida* spp. em que a mesma se mostra eficaz (Sherry et al., 2017).

O aumento da esperança média de vida, o surgimento de doenças imunológicas, as elevadas taxas de utilização de imunossupressores e terapêuticas antimicrobianas de largo espectro e a frequente colocação de dispositivos médicos, tornam as infeções por *Candida* spp. mais difíceis de controlar e erradicar (Atencia-Carrera et al., 2022).

O Ibrexafungerp, aprovado para o tratamento da candidose vulvovaginal em 2021, surge como sendo o primeiro antifúngico aprovado de uma nova classe, que também já demonstrou atividade sobre os biofilmes de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. auris* por último (Ajetunmobi et al., 2023).

Alguns autores referem uma outra nova molécula promissora, a Turbinmicina, capaz de inibir a produção da matriz do biofilme e que em estudos mostrou-se eficaz contra biofilmes de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. auris* (Ajetunmobi et al., 2023).

Os desenvolvimentos são preocupantes, uma vez que em ambiente de cuidados de saúde, torna mais provável a disseminação e mais difícil o tratamento e erradicação (Sherry et al., 2017). Como consequência das constantes tentativas de tratamentos com medicamentos antifúngicos realizadas sem sucesso, as espécies de *Candida* tornam-se com o passar do tempo cada vez mais resistentes, apresentando recorrentes níveis baixos de suscetibilidade à terapêutica (Pereira et al., 2021).

As infecções contraídas nos cuidados de saúde e que evoluem para biofilmes, resultam da adesão às superfícies do hospedeiro e/ou a dispositivos médicos (Atiencia-Carrera et al., 2022). Cerca de 60 a 70% de todas as infecções geradas em hospitais são derivadas da colocação de dispositivos médicos, onde os biofilmes ocupam grande parte desta percentagem (Ramage et al., 2023).

Dentro dos dispositivos médicos, os cateteres e as próteses são exemplos de estruturas facilmente colonizáveis por *Candida* spp. onde se desenvolvem infecções que tratadas nas primeiras 24h apresentam razoáveis taxas de sucesso, caso contrário, a taxa de mortalidade pode ascender a valores 30 vezes superiores (Ramage et al., 2023). Alguns autores defendem que a remoção do dispositivo médico, associado a uma terapêutica antifúngica adequada ao tipo de biofilme se repercutem em melhores resultados clínicos e menores taxas de mortalidade (Ramage et al., 2023).

Abordagens como o revestimento dos dispositivos médicos com agentes antimicrobianos têm vindo a ser instituídas, de modo a minimizar o desenvolvimento de infecções, aumentar as taxas de sucesso cirúrgicas e diminuir os índices de mortalidade (Cavalheiro & Teixeira, 2018).

Nos últimos anos tem sido recorrente a tentativa de descobrir/desenvolver outras substâncias naturais e/ou sintéticas, que em sinergia com o atual tratamento convencional, reduzam a resistência e otimizem o sucesso da terapêutica (Pereira et al., 2021; Ponde et al., 2021).

Atualmente no mercado não existem fármacos específicos para o tratamento de biofilmes de *Candida* dada a elevada resistência aos antifúngicos e a complexidade do processo que faz com que o desenvolvimento não seja transversal e ocorra de forma lenta (Kaur & Nobile, 2023).

Grande parte das novas possibilidades terapêuticas continuam focadas na inibição da síntese de ergosterol e de glucanos, alvo terapêutico dos azóis e das equinocandinas respectivamente (Ajetunmobi et al., 2023). O fenômeno de QS surge como uma possibilidade de alvo terapêutico, no entanto esta etapa do processo de formação necessita de mais certezas relativamente ao seu processo e desenvolvimento (Ramage et al., 2023; C. F. Rodrigues & Černáková, 2020).

Outra via de tratamento que tem vindo a ser estudada é a possibilidade de *Candida* spp. e as bactérias constituintes da flora comensal do homem interagirem entre si, gerando uma competição ou um efeito antagonista entre ambas que, por conseguinte, vai impedir que se dê a formação e proliferação do biofilme (Ajetunmobi et al., 2023).

Segundo Roilides et al., 2015, uma das maiores barreiras no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para os biofilmes é a dificuldade em obter modelos que simulem as reais defesas do hospedeiro nos vários locais onde é possível o desenvolvimento de biofilmes (Cavalheiro & Teixeira, 2018; Roilides et al., 2015).

Com o objetivo de acelerar o processo de descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos, é necessário contrariar a tendência adotada nos últimos anos e fornecer recursos financeiros às empresas de investigação, a fim de potenciar estas novas descobertas (Ajetunmobi et al., 2023).

6. Conclusão

Na última década, *Candida* spp. tem visto a sua prevalência a aumentar, encontrando-se inclusivamente cinco destas espécies (*C. auris*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) incluídas na lista de fungos prioritários para a saúde pública em investigar e tratar, desenvolvida pela Organização Mundial de Saúde.

Este aumento da prevalência e a constante falência de tratamentos preocupa os clínicos e está maioritariamente associada à elevada resistência, à baixa biodisponibilidade e à fraca capacidade de atravessar e invadir o biofilme que as principais classes de antifúngicos demonstram.

Mais recentemente, surgiu a classe dos Triterpenóides, com reduzidos efeitos adversos e uma boa biodisponibilidade quando administrado via oral, dando um novo alento ao desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos.

A descoberta e utilização de novos fármacos pode ser utilizado em monoterapia, no entanto, e de modo a minimizar o desenvolvimento de resistências é aconselhado sempre que possível, a implementação de uma terapia combinada.

O desenvolvimento e proliferação de infeções ocorre maioritariamente nos cuidados de saúde e em indivíduos imunocomprometidos que por exemplo tenham sido submetidos a colocação de próteses, cateteres ou que possam conter feridas e/ou queimaduras expostas.

No caso do desenvolvimento de biofilmes associados a superfícies abióticas como as próteses e onde ocorre falência de tratamentos, as mesmas vêm-se obrigadas a ser retiradas ou substituídas pelos clínicos, gerando mais comprometimento para o organismo e mais custos para as unidades de saúde.

Dado o aumento da esperança média de vida e consequentemente da dependência de intervenções cirúrgicas no ser humano é necessário que ocorram cada vez mais desenvolvimentos de terapêuticas antifúngicas e/ou alternativas para fazer face a este constante desenvolvimento dos fungos.

Uma vez que *Candida* é um microrganismo da flora comensal com capacidade patogénica, é importante que os cuidados de higiene nos cuidados de saúde sejam adotados e controlados, diminuindo a probabilidade de desenvolvimento de infeções e consequentemente da formação de biofilmes.

Em suma, é necessário que seja realizada mais investigação ao estudo dos biofilmes e dos seus respetivos mecanismos de resistência, de modo a desenvolver terapêuticas que potenciem a diminuição das taxas de morbilidade e mortalidade associada aos biofilmes de *Candida*.

7. Bibliografía

- Ajetunmobi, O. H., Badali, H., Romo, J. A., Ramage, G., & Lopez-Ribot, J. L. (2023). Antifungal therapy of *Candida* biofilms: Past, present and future. *Biofilm*, 5. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2023.100126>
- Angulo, D. A., Alexander, B., Rautemaa-Richardson, R., Alastruey-Izquierdo, A., Hoenigl, M., Ibrahim, A. S., Ghannoum, M. A., King, T. R., Azie, N. E., & Walsh, T. J. (2022). Ibrexafungerp, a Novel Triterpenoid Antifungal in Development for the Treatment of Mold Infections. In *Journal of Fungi* (Vol. 8, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jof8111121>
- Atiencia-Carrera, M. B., Cabezas-Mera, F. S., Tejera, E., & Machado, A. (2022). Prevalence of biofilms in *Candida* spp. bloodstream infections: A meta-analysis. *PLoS ONE*, 17(2 February). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263522>
- Branco, J., Miranda, I. M., & Rodrigues, A. G. (2023). *Candida* parapsilosis Virulence and Antifungal Resistance Mechanisms: A Comprehensive Review of Key Determinants. In *Journal of Fungi* (Vol. 9, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jof9010080>
- Breitkopf, R., Treml, B., Senoner, T., Bukumirić, Z., & Rajsic, S. (2023). Invasive Fungal Breakthrough Infections under Targeted Echinocandin Prophylaxis in High-Risk Liver Transplant Recipients. *Journal of Fungi*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/jof9020272>
- Brunke, S., Mogavero, S., Kasper, L., & Hube, B. (2016). Virulence factors in fungal pathogens of man. *Current Opinion in Microbiology*, 32(Figure 1), 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.010>
- Cangui-Panchi, S. P., Ñacato-Toapanta, A. L., Enríquez-Martínez, L. J., Salinas-Delgado, G. A., Reyes, J., Garzon-Chavez, D., & Machado, A. (2023). Battle royale: Immune response on biofilms – host-pathogen interactions. In *Current Research in Immunology* (Vol. 4). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.crimmu.2023.100057>

- Cavalheiro, M., & Teixeira, M. C. (2018). Candida Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 5, Issue FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>
- Chaffin, W. L. (2008). Candida albicans Cell Wall Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(3), 495–544. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00032-07>
- Childers, D. S., Avelar, G. M., Bain, J. M., Larcombe, D. E., Pradhan, A., Budge, S., Heaney, H., & Brown, A. J. P. (2020). Impact of the environment upon the Candida albicans cell wall and resultant effects upon immune surveillance. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 425, pp. 297–330). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/82_2019_182
- Conchon Costa, I., Felipe, I., & Carlos Jabur Gaziri, L. (2008). Resposta imune a Candida albicans. *Semina: Ciências Biológicas e Da Saúde*, 29(1), 27–40.
- Czechowicz, P., Nowicka, J., & Gościński, G. (2022). Virulence Factors of Candida spp. and Host Immune Response Important in the Pathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23115895>
- de Souza, C. M., dos Santos, M. M., Furlaneto-Maia, L., & Furlaneto, M. C. (2023). Adhesion and biofilm formation by the opportunistic pathogen Candida tropicalis: What do we know? *Canadian Journal of Microbiology*, 69(6), 207–218. <https://doi.org/10.1139/cjm-2022-0195>
- Del Pozo, J. L., & Cantón, E. (2015). Candidiasis asociada a biopelículas. *Revista Iberoamericana de Micología*, 33(3), 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2015.06.004>
- dos Santos, M. M., & Ishida, K. (2023). We need to talk about Candida tropicalis: Virulence factors and survival mechanisms. *Medical Mycology*, 61(8). <https://doi.org/10.1093/mmy/myad075>

- Du, H., Bing, J., Hu, T., Ennis, C. L., Nobile, C. J., & Huang, G. (2020). *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS Pathogens*, 16(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008921>
- Faria-Ramos, I., Neves-Maia, J., Ricardo, E., Santos-Antunes, J., Silva, A. T., Costa-de-Oliveira, S., Cantón, E., Rodrigues, A. G., & Pina-Vaz, C. (2014). Species distribution and in vitro antifungal susceptibility profiles of yeast isolates from invasive infections during a Portuguese multicenter survey. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(12), 2241–2247. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2194-8>
- Fernandes, L., Costa, R., Henriques, M., & Rodrigues, M. E. (2023). Simulated vaginal fluid: *Candida* resistant strains' biofilm characterization and vapor phase of essential oil effect. *Journal of Medical Mycology*, 33(1). <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2022.101329>
- Freitas, G. (2010). Fungos. In Lidel (Ed.), *Microbiologia* (pp. 145–165).
- Garcia-Bustos, V., Pemán, J., Ruiz-Gaitán, A., Cabañero-Navalon, M. D., Cabanilles-Boronat, A., Fernández-Calduch, M., Marcilla-Barreda, L., Sigona-Giangreco, I. A., Salavert, M., Tormo-Mas, M. Á., & Ruiz-Saurí, A. (2022). Host–pathogen interactions upon *Candida auris* infection: fungal behaviour and immune response in *Galleria mellonella*. *Emerging Microbes and Infections*, 11(1), 136–146. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.2017756>
- Hoenigl, M., Sprute, R., Arastehfar, A., Perfect, J. R., Lass-Flörl, C., Bellmann, R., Prattes, J., Thompson, G. R., Wiederhold, N. P., Al Obaidi, M. M., Willinger, B., Arendrup, M. C., Koehler, P., Oliverio, M., Egger, M., Schwartz, I. S., Cornely, O. A., Pappas, P. G., & Krause, R. (2022). Invasive candidiasis: investigational drugs in the clinical development pipeline and mechanisms of action. In *Expert Opinion on Investigational Drugs* (Vol. 31, Issue 8, pp. 795–812). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/13543784.2022.2086120>
- Jenks, J. D., Cornely, O. A., Chen, S. C. A., Thompson, G. R., & Hoenigl, M. (2020). Breakthrough invasive fungal infections: Who is at risk? In *Mycoses* (Vol. 63, Issue 10, pp. 1021–1032). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/myc.13148>

- Kaur, J., & Nobile, C. J. (2023). Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 71). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102237>
- Khan, F., Bamunuarachchi, N. I., Pham, D. T. N., Tabassum, N., Khan, M. S. A., & Kim, Y. M. (2021). Mixed biofilms of pathogenic *Candida*-bacteria: regulation mechanisms and treatment strategies. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 47, Issue 6, pp. 699–727). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1921696>
- Koo, H., Andes, D. R., & Krysan, D. J. (2018). *Candida*–streptococcal interactions in biofilm-associated oral diseases. In *PLoS Pathogens* (Vol. 14, Issue 12). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007342>
- Lang, S. N., Germerodt, S., Glock, C., Skerka, C., Zipfel, P. F., & Schuster, S. (2019). Molecular cryptic by pathogenic fungi using human factor H. A numerical model. *PLoS ONE*, 14(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212187>
- Leal, F. (2019). Special issue: Fungal pathogenesis in humans: The growing threat. *Genes*, 10(2), 5–8. <https://doi.org/10.3390/genes10020136>
- Lee, Y., Puumala, E., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2021). Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and beyond. In *Chemical Reviews* (Vol. 121, Issue 6, pp. 3390–3411). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00199>
- López, R. (2010). Candidosis , a new challenge. *Clinics in Dermatology*, 28(2), 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.12.014>
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. In *Virulence* (Vol. 4, Issue 2, pp. 119–128). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- Medeiros, P. De, Patri, A., Melo, V. De, Bento, O., Ba, L., Neto, B., Garcia, J. B., Zuza-alves, D. L., Francisco, C., Salles, A., Melo, D. A., Maranh, G., & Id, C. (2019). *Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil : A six-year retrospective study.*

- Morales-Menchén, A., Navarro-García, F., Guirao-Abad, J. P., Román, E., Prieto, D., Coman, I. V., Pla, J., & Alonso-Monge, R. (2018). Non-canonical activities of Hog1 control sensitivity of *Candida albicans* to killer toxins from *Debaryomyces hansenii*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(MAY), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00135>
- Mulet Bayona, J. V., Salvador García, C., Tormo Palop, N., & Gimeno Cardona, C. (2020). Evaluation of a novel chromogenic medium for *Candida* spp. identification and comparison with CHROMagar™ *Candida* for the detection of *Candida auris* in surveillance samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 98(4). <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115168>
- Nailis, H., Kucharíková, S., Řičicová, M., Dijck, P. Van, Deforce, D., Nelis, H., & Coenye, T. (2010). Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and-independent gene expression. In *BMC Microbiology* (Vol. 10). <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/114>
- Naves, P. L. F., Pinto Santana, D., Leão Ribeiro, E., & Severo Menezes, A. C. (2013). Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 12(2), 229. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v12i2.6953>
- Oliveira, E. E. De, Silva, S. C., Soares, A. J., Attux, C., Cruvinel, B., & Silva, R. (1998). Toxinas killer e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer Killer toxin sensitivity and production of enzymes by *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with cancer. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31(6), 523–527.
- Organization, W. H. (2022). *WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action*.
- Palareti, G., Legnani, C., Cosmi, B., Antonucci, E., Erba, N., Poli, D., Testa, S., & Tosetto, A. (2016). *Candida pyralidae* killer toxin disrupts the cell wall of *Brettanomyces bruxellensis* in red grape juice. *International Journal of Laboratory Hematology*, 38(1), 42–49. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>

- Pereira, R., dos Santos Fontenelle, R. O., de Brito, E. H. S., & de Moraes, S. M. (2021). Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 131, Issue 1, pp. 11–22). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jam.14949>
- Pierce, C. G., Srinivasan, A., Uppuluri, P., Ramasubramanian, A. K., & López-Ribot, J. L. (2013). Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. In *Current Opinion in Pharmacology* (Vol. 13, Issue 5, pp. 726–730). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.08.008>
- Plinio Da Silva-Rocha, W., Luiz De Brito Lemos, V., Inês, T., Svidizisnki, E., Milan, E. P., & Chaves, G. M. (2014). *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*. <http://www.biomedcentral.com/1472-6831/14/20>
- Ponde, N. O., Lortal, L., Ramage, G., Naglik, J. R., & Richardson, J. P. (2021). *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 47, Issue 1, pp. 91–111). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1843400>
- Ramage, G., Borghi, E., Rodrigues, C. F., Kean, R., Williams, C., & Lopez-Ribot, J. (2023). Our current clinical understanding of *Candida* biofilms: where are we two decades on? In *APMIS*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/apm.13310>
- Rinaldi, M., Bartoletti, M., Ferrarese, A., Franceschini, E., Campoli, C., Coladonato, S., Pascale, R., Tedeschi, S., Gatti, M., Cricca, M., Ambretti, S., Siniscalchi, A., Morelli, M. C., Cescon, M., Cillo, U., Di Benedetto, F., Burra, P., Mussini, C., Cristini, F., ... Giannella, M. (2021). Breakthrough invasive fungal infection after liver transplantation in patients on targeted antifungal prophylaxis: A prospective multicentre study. *Transplant Infectious Disease*, 23(4). <https://doi.org/10.1111/tid.13608>
- Rodrigues, A., & Vaz, C. P. (2014a). Mecanismos de patogénese fúngica. In Lidel (Ed.), *Microbiologia Médica* (pp. 285–290).

- Rodrigues, A., & Vaz, C. P. (2014b). Micoses oportunistas. In Lidel (Ed.), *Microbiologia Médica* (pp. 359–363).
- Rodrigues, C. F., & Černáková, L. (2020). Farnesol and tyrosol: Secondary metabolites with a crucial quorum-sensing role in candida biofilm development. In *Genes* (Vol. 11, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes11040444>
- Rodrigues, C., Rodrigues, M., Silva, S., & Henriques, M. (2017). Candida glabrata Biofilms: How Far Have We Come? *Journal of Fungi*, 3(1), 11. <https://doi.org/10.3390/jof3010011>
- Rodríguez-Cerdeira, C., Gregorio, M. C., Molaes-Vila, A., López-Barcenas, A., Fabbrocini, G., Bardhi, B., Sinani, A., Sánchez-Blanco, E., Arenas-Guzmán, R., & Hernandez-Castro, R. (2018). *Biofilms and vulvovaginal candidiasis*. November.
- Rodríguez-Cerdeira, C., Gregorio, M. C., Molaes-Vila, A., López-Barcenas, A., Fabbrocini, G., Bardhi, B., Sinani, A., Sánchez-Blanco, E., Arenas-Guzmán, R., & Hernandez-Castro, R. (2019). Biofilms and vulvovaginal candidiasis. In *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (Vol. 174, pp. 110–125). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.011>
- Roilides, E., Simitsopoulou, M., Katragkou, A., & Walsh, T. J. (2015). How Biofilms Evade Host Defenses. *Microbiology Spectrum*, 3(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0012-2014>
- Rossoni, R. D., de Barros, P. P., Freire, F., dos Santos, J. D., Jorge, A. O. C., & Junqueira, J. C. (2017). Study of microbial interaction formed by Candida krusei and Candida glabrata: In vitro and In vivo studies. *Brazilian Dental Journal*, 28(6), 669–674. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201701393>
- Sabino, R., Veríssimo, C., Brandão, J., Martins, C., Alves, D., Pais, C., & Denning, D. W. (2017). Serious fungal infections in Portugal. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 36(7), 1345–1352. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2930-y>

- Salvatore, M. M., Maione, A., Pietra, A. La, Carraturo, F., Staropoli, A., Vinale, F., Andolfi, A., Salvatore, F., Guida, M., & Galdiero, E. (2022). A model for microbial interactions and metabolomic alterations in *Candida glabrata* *Staphylococcus epidermidis* dual-species biofilms. *PLoS ONE*, 17(12 December). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279069>
- Santos, G. C. de O., Vasconcelos, C. C., Lopes, A. J. O., Cartágenes, M. do S. de S., Filho, A. K. D. B., do Nascimento, F. R. F., Ramos, R. M., Pires, E. R. R. B., de Andrade, M. S., Rocha, F. M. G., & Monteiro, C. de A. (2018). *Candida* infections and therapeutic strategies: Mechanisms of action for traditional and alternative agents. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01351>
- Schelenz, S., Hagen, F., Rhodes, J. L., Abdolrasouli, A., Chowdhary, A., Hall, A., Ryan, L., Shackleton, J., Trimlett, R., Meis, J. F., Armstrong-James, D., & Fisher, M. C. (2016). First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s13756-016-0132-5>
- Sherry, L., Ramage, G., Kean, R., Borman, A., Johnson, E. M., Richardson, M. D., & Rautemaa-Richardson, R. (2017). Biofilm-forming capability of highly virulent, multidrug-resistant *Candida auris*. *Emerging Infectious Diseases*, 23(2), 328–331. <https://doi.org/10.3201/eid2302.161320>
- Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., & Škrlec, I. (2021). *Candida albicans*-the virulence factors and clinical manifestations of infection. *Journal of Fungi*, 7(2), 1–19. <https://doi.org/10.3390/jof7020079>
- Tamura, N. K., Negri, M. F. N., Bonassoli, L. A., & Svidzinski, T. I. E. (2007). Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(1), 91–93.
- Thaper, D., & Prabha, V. (2018). Molecular mimicry: An explanation for autoimmune diseases and infertility. In *Scandinavian Journal of Immunology* (Vol. 88, Issue 2). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/SJI.12697>

Young, T., Alshanta, O. A., Kean, R., Bradshaw, D., Pratten, J., Williams, C., Woodall, C., Ramage, G., & Brown, J. L. (2021). *Candida albicans* as an essential “keystone” component within polymicrobial oral biofilm models? *Microorganisms*, 9(1), 1–23. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010059>