



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

LEILEANE COHN TORRES

**INTERAÇÃO *Candida albicans* COM *Acinetobacter*
baumannii E *Klebsiella pneumoniae* EM BIOFILMES
MULTIESPÉCIES**

2016

LEILEANE COHN TORRES

**INTERAÇÃO *Candida albicans* COM *Acinetobacter baumannii* E
Klebsiella pneumoniae EM BIOFILMES MULTIESPÉCIES**

Dissertação apresentada ao Curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE no Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientador: Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

São José dos Campos

2016

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2016.

Torres, Leilean Cohn

Interação *Candida albicans* com *Acinetobacter baumannii* e
Klebsiella pneumoniae em biofilme multiespécies / Leilean Cohn
Torres. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.
50 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2016.
Orientador: Antonio Olavo Cardoso Jorge.

1. *Candida albicans*. 2. Interações micro-organismos. 3.
Bactérias. 4. *Galleria mellonella*. I. Jorge, Antonio Olavo Cardoso
, orient. II. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos
Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual
Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. IV. UNESP - Univ Estadual
Paulista. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 24 de fevereiro de 2016
E-mail: leilecohn@gmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP- Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos

Instituto Básico de Biociências
UNITAU - Universidade de Taubaté
Campus do Bom Conselho

Prof. Dra. Luciane Dias de Oliveira

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP- Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 24 de Fevereiro de 2016.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que deixaram saudades e me deram a base para tudo que eu conquistei na vida até hoje.

A minha tia, Maria da Conceição Silva, que sempre esteve presente na minha vida.

Ao meu marido, Sidnei Rozado Torres, que incentivou meu ingresso, me acompanhou pacientemente em todos os momentos e me deu muito apoio e inspiração para ultrapassar esta etapa.

Ao meu filho, Daniel Cohn Torres que faz com eu tenha força para lutar sempre.

Aos meus compadres, irmãos que me acompanham na jornada da vida.

Aos meus amigos, irmãos que escolhemos nesta vida. E que sempre me apoiaram, acompanharam e fizeram parte dos momentos maravilhosos e daqueles em que precisei de apoio.

Ao amigo Felipe de Camargo Ribeiro, que esteve presente em todos os momentos do meu trabalho me apoiando e sendo meu parceiro nesta jornada.

A Tamara Rodrigues de Andrade Carneiro, amiga sempre presente que estimulou o meu ingresso no mestrado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge pela sabedoria, paciência, incentivo, orientação e por me acompanhar durante todo o meu trabalho de pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos, na pessoa do diretor Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara e do vice-diretor Profa Adj. Rebeca Di Nicoló.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da Coordenadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À equipe da Biblioteca pela ajuda na elaboração deste trabalho, contribuindo com o acesso ao material bibliográfico e à bibliotecária Renata Aparecida Couto Martins que orientou sua normalização.

Aos colegas da Pós-Graduação e técnicos do laboratório de Microbiologia e Imunologia, e em especial a Mirian Marcolan de Mello, Patrícia Pimentel de Barros, Jessica Diane dos Santos, Marisol Velloso e Jonatas Rafael de Oliveira que contribuíram imensamente para realização deste trabalho.

Ao laboratório Valeclin, que contribuiu cedendo as cepas de isolados clínicos, em especial ao responsável pela microbiologia deste laboratório. Silvio Rubens Alves e a Renata Bernardes, os responsáveis pelo processo de escolha, separação e acondicionamento dos isolados bacterianos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1 <i>Candida albicans</i>	11
2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
2.3 <i>Acinetobacter baumannii</i>	15
2.4 Biofilme e interação microbiana <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	17
3 PROPOSIÇÃO.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Origem e reativação dos micro-organismos.....	22
4.2 Preparo das Suspensões.....	22
4.3 Biofilme.....	23
4.4 Determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro.....	24
4.5 Interação de <i>Acinetobacter baumannii</i> ou <i>Klebsiella pneumoniae</i> com <i>Candida albicans</i> em modelo de <i>Galleria mellonella</i>	24
4.6 Análise estatística.....	26
5 RESULTADOS.....	27
5.1 Contagem de <i>C. albicans</i> na interação com <i>A. baumannii</i> em biofilmes <i>in vitro</i>	27
5.2 Contagem de <i>A. baumannii</i> na interação com <i>C. albicans</i> em biofilme <i>in vitro</i>	27
5.3 Interação de <i>A. baumannii</i> ATCC 19606, <i>A. baumannii</i> cepa clínica 1 e <i>A. baumannii</i> cepa clínica 2 com <i>C. albicans</i> em <i>Galleria mellonella</i>	28
5.4 Interação de <i>K. pneumoniae</i> com <i>C. albicans</i> em biofilme <i>in vitro</i> - UFC/MI.....	30

5.4.1 Contagem de <i>C. albicans</i> na interação com <i>K. pneumoniae</i> em biofilme <i>in vitro</i>	32
5.4.2 Contagem de <i>K. pneumoniae</i> na interação com <i>C. albicans</i> em biofilme <i>in vitro</i>	32
5.5 Interação de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 4352, <i>K. pneumoniae</i> cepa clínica 1 e <i>K. pneumoniae</i> cepa clínica 2 com <i>C. albicans</i> em <i>Galleria mellonella</i>.....	32
6 DISCUSSÃO.....	35
7 CONCLUSÃO.....	42
8 REFERÊNCIAS.....	43
ANEXO.....	49

Torres LC. Interação *Candida albicans* com *Acinetobacter baumannii* E *Klebsiella pneumoniae* em biofilmes multiespécies [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

Interações entre micro-organismos ocorrem na natureza. O conhecimento das modificações estruturais, metabólicas e comportamentais de *Candida albicans* em interações com outros micro-organismos nos biofilmes, podem esclarecer os eventos que ocorrem quando estes micro-organismos interagem na natureza ou nos tecidos do hospedeiro e podem beneficiar as estratégias de controle da candidose. O objetivo do presente trabalho foi avaliar interações microbianas de *C. albicans* em biofilmes multiespécies e avaliar a patogenicidade dessas interações. Foram realizadas interações entre cepas padrão de *C. albicans*, com *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* em biofilmes, avaliando-se a contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Foram também avaliadas interações com cepas padrão de *Candida albicans* com dois isolados clínicos de cada um dos micro-organismos (*A. baumannii* e *K. pneumoniae*). A patogenicidade dos micro-organismos isolados e em interações com *C. albicans* foram avaliadas no modelo experimental *Galleria mellonella*. Houve aumento no crescimento de *C. albicans* em biofilme *in vitro* quando em interação com as cepas clínicas testadas. A interação *in vitro* de *C. albicans* com *A. baumannii* favoreceu o crescimento de *C. albicans* de forma significativa e não afetou *A. baumannii*, com maior aumento na interação com as cepas clínicas. Exceto para a cepa clínica 1, a interação com *K. pneumoniae* também estimulou o crescimento de *C. albicans*, mas em menor intensidade quando comparado à interação entre *C. albicans* e *A. baumannii*. Conclusão: a interação de *C. albicans in vitro* com *A. baumannii* ou *K. pneumoniae* foi favorável para *C. albicans* exceto em interação com cepa clínica 1 de *K. pneumoniae*, onde houve redução no crescimento de *C. albicans*. Houve redução na porcentagem de morte de *G. mellonella* quando inoculada com *C. albicans* e cepa clínica 2 de *K. pneumoniae* ou quando *G. mellonella* foi inoculada com *C. albicans* e cepa clínica 2 de *A. baumannii*.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Interações micro-organismos. Bactérias. *Galleria mellonella*.

Torres LC. Interaction *Candida albicans* with *A. baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in multi-species biofilms. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2015.

ABSTRACT

Interactions among microorganisms occur in nature. The knowledge of structural, metabolic and behavioral modifications of ***Candida albicans*** in interactions with other microorganisms in biofilms can clarify the events that occur when those microorganisms interact in nature or in host tissue and can benefit in strategies to control candidiasis. The aim of this study was to evaluate the microbial interactions of ***C. albicans*** in multispecies biofilms and evaluate the pathogenicity of these interactions. Were performed interactions between standards strains of ***C. albicans*** with standards strains of ***Acinetobacter baumannii*** and ***Klebsiella pneumoniae*** in biofilms, evaluating the counts of colony forming units per milliliter (CFU / mL). Were also performed interactions between standard strain of ***C. albicans*** with two clinical isolates of each one of the microorganisms (***A. baumannii*** and ***K. pneumoniae***). The pathogenicity of the isolated micro-organisms and in interaction with ***C. albicans*** was evaluated in ***Galleria mellonella*** experimental model. There was an increase in the growth of ***C. albicans*** in in vitro biofilm when interacting with the clinical strains tested. The interaction in vitro between ***C. albicans*** and ***A. baumannii*** favored the growth of ***C. albicans*** significantly and did not affect ***A. baumannii***, with the biggest increase in interaction with the clinical strains. Except for clinical strain 1, the interaction with ***K. pneumoniae*** also promoted the growth of ***C. albicans***, but at a lower intensity compared to the interaction between ***C. albicans*** and ***A. baumannii***. Conclusion: The interaction in vitro between ***C. albicans*** with ***Acinetobacter baumannii*** or ***K. pneumoniae*** was favorable for ***C. albicans*** except in the interaction ***K. pneumoniae*** clinical strain 1, in which there was a reduction in the growth of ***C. albicans***. There was a reduction in the percentage of ***G. mellonella*** death when inoculated with ***C. albicans*** and ***K. pneumoniae*** clinical strain 2 or when ***G. mellonella*** was inoculated with ***C. albicans*** and ***A. baumannii*** clinical strain 2.

Keywords: ***Candida albicans***. Microorganisms interactions. Bacteria. ***Galleria mellonella***.

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que 80% dos casos de doenças infecciosas em humanos estão relacionadas a biofilmes patogênicos. Biofilmes são formados por comunidades de micro-organismos embebidos em uma matriz extracelular formando um complexo tridimensional, presentes em superfícies abióticas ou bióticas (Jorge, 2012; Harriot, Noverr, 2011).

A matriz extracelular do biofilme pode restringir a penetração de agentes antimicrobianos e levar a maior resistência dos micro-organismos a estes antimicrobianos. A produção de uma matriz extracelular polimérica e a transferência de genes de resistência favorecida pela alta densidade celular podem contribuir para o aumento da resistência do biofilme aos antibióticos (Kart et al., 2014).

O fungo mais encontrado em biofilmes é *Candida albicans* (Harriot, Noverr, 2011), que pode crescer em forma de leveduras, hifas ou pseudo-hifas (dimorfismo), podendo causar dois tipos de infecções humanas: superficiais como candidoses muco cutâneas e infecções sistêmicas (Mayer et al., 2013).

Interações entre fungos e bactérias ocorrem física e quimicamente (Krom et al., 2014). Os mecanismos de interação dos biofilmes multiespécies associados a *Candida* ainda não estão completamente elucidados, demonstrando uma eminente necessidade de conhecimento destas interações.

A capacidade de resistência dos micro-organismos Gram-negativos *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* aos antimicrobianos torna-os importantes alvos de estudo no presente trabalho. *K. pneumoniae* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, atríquio, pertencente à família Enterobacteriaceae. Vivem em

águas superficiais do solo, nas plantas e como comensal residente da nasofaringe e trato gastrointestinal de mamíferos. É considerado atualmente um dos patógenos oportunistas mais importantes, causando infecções hospitalares e infecções polimicrobianas, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. As taxas de infecção aumentam em ambientes hospitalares quando relacionados a utilização de agentes antimicrobianos. O trato gastrointestinal serve como um reservatório e muitas vezes é fonte de infecções latentes (El Fertas-Aissani et al., 2013).

Outro patógeno hospitalar de importância é *Acinetobacter baumannii*, um cocobacilo Gram-negativo que causa infecção na corrente sanguínea, trato urinário, pele, infecções dos tecidos moles e pneumonia (Higuchi et al., 2013; Vinogradov et al., 2014; Longo et al., 2014).

Galleria mellonella tem sido usada como modelo para estudo da patogenicidade de isolados clínicos de levedura e bactérias pois, tem uma resposta imune similar aos mamíferos e a defesa do hospedeiro contra a candidose invasiva baseia-se principalmente na ingestão e eliminação de células fúngicas, por células denominadas hemócitos que farão a fagocitose, semelhante as células fagocitárias de mamíferos (Borghi et al., 2014; Thomas et al., 2013).

Este trabalho contribui para elucidar o comportamento de *C. albicans* em interação *in vitro* e *in vivo* com *A. baumannii* e *K. pneumoniae*, para que futuramente possamos compreender como eliminar estes micro-organismos em biofilme, pois os mesmos geralmente não se encontram isolados na natureza e o comportamento destes em biofilme multiespécie ainda não está bem esclarecido.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Candida albicans*

Candida albicans é um fungo polimórfico, membro da microbiota humana endógena podendo colonizar a mucosa da orofaringe, genital e gastrointestinal de 30 a 70% dos indivíduos saudáveis. Por outro lado, *Candida* spp. é também a causa mais comum de infecções fúngicas, podendo causar candidose vulvovaginal, candidose orofaríngea ou infecções sistêmicas graves e com risco de vida, tais como candidose disseminada e fungemia. Nos EUA, a infecção por *Candida* é a quarta mais comum em hospitais e candidose sistêmica está associada a taxas de mortalidade de até 50% (Polke et al., 2015).

Quase todos os seres humanos são infectados com este fungo. Na maioria das pessoas, a infecção não produz quaisquer sintomas porque o sistema imunológico é capaz de controlar o fungo. No entanto, se a defesa do organismo falhar, o fungo é capaz de se espalhar e pode conduzir a uma doença grave, podendo ser fatal em 42% dos casos (Ford et al., 2015).

Candidose orofaríngea é prevalente em 90% dos pacientes com HIV / AIDS, durante a progressão da infecção pelo vírus. Também é comum (estimado de 20-80% dos doentes) em indivíduos após a radioterapia para o tratamento de neoplasias de cabeça e pescoço. Durante os períodos de trauma, ou neutropenia *C. albicans* pode disseminar para a corrente sanguínea e causar doença sistêmica (Hall, 2015).

Sendo o fungo patogênico mais comumente adquirido no hospital, *C. albicans* frequentemente forma biofilmes em dispositivos

médicos implantados e muitas vezes leva à doença disseminada letal (Mitchell et al., 2015).

O fungo é controlado pela microbiota normal, barreiras epiteliais e pelo sistema imune inato (Gow, Hube, 2012). Fatores de risco comuns para o desenvolvimento de candidemia incluem tratamentos em unidades de terapia intensiva, cateteres venosos centrais, múltiplos traumas, idade avançada, imunossupressão grave, neutropenia, antibiótico terapia, tumores sólidos e neoplasias hematológicas malignas (Polke et al., 2015).

As mulheres são mais propensas a desenvolver infecção por *Candida*, assim como a presença de alguns fatores pré-existentes como Diabetes mellitus e infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos (Padawer et al., 2015).

A habilidade de *C. albicans* habitar diversos nichos do hospedeiro é suportada pelos seus fatores de virulência como capacidade de aderência, morfismo de leveduras para hifas, secreção de proteinases, habilidade de formar biofilmes, dentre outras (Mayer et al., 2013; Junqueira et al., 2011). Segundo Rane et al. (2014) a inibição de aderência de *C. albicans* é um alvo promissor para interromper os estágios iniciais de formação de biofilme de *C. albicans*

Uma das características do biofilme é a resistência a antimicrobianos de largo espectro. Vários estudos têm demonstrado que as leveduras sésseis (biofilme) são mais resistentes a anfotericina B, fluconazol, azóis e equinocandinas quando comparadas com células planctônicas (Zarei Mahmoudabadi et al., 2014).

Anfotericina B e fluconazol são dois importantes antifúngicos sistêmicos rotineiramente utilizados para o tratamento e profilaxia de candidose sistêmica. No entanto, alguns isolados de *Candida* tais como, *C. glabrata* e *C. krusei* são resistentes ao fluconazol (Zarei Mahmoudabadi et al., 2014).

Apesar da competição que ocorre entre bactérias e fungos, pouco se sabe sobre as identidades das moléculas do *quorum sensing* (Qs) e seus efeitos na associação de micro-organismos. O complexo microbiano presente na natureza e em ambientes clínicos, como trato intestinal humano, envolve uma série de redes de sinalizações. Alguns estudos demonstraram que a sinalização extracelular de moléculas bacterianas pode mediar o *quorum sensing* e moléculas produzidas por um organismo podem afetar populações inteiras de células. Muitos genes bacterianos, incluindo genes de fatores de virulência, são estimulados por estas sinalizações de moléculas produzidas por células individuais da mesma ou de diferentes espécies. Semelhante às bactérias *Candida albicans* produz pelo menos duas moléculas de sinalização chamadas farnesol e tirosol que influenciam seu crescimento e virulência (Oh et al., 2012).

Um dos principais fatores de virulência de *C. albicans* é a capacidade de formação de hifas, um fenômeno chamado morfogênese que contribui para a invasão nos tecidos. Mutantes de *C. albicans* incapazes de formar pseudohifas ou hifas verdadeiras têm virulência atenuada. A secreção de enzimas hidrolíticas, tais como fosfolipases, que degradam glicerolfosfolípidos das membranas celulares também são importantes na destruição das células hospedeiras (Silva-Rocha et al., 2015).

2.2 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é uma bacilo Gram-negativo não flagelado, anaeróbio facultativo, imóvel, pertencente à família Enterobacteriaceae (El Fertas-Aissani et al., 2013).

K. pneumoniae é onipresente na natureza. Como habitam a mucosa da nasofaringe e intestinal de seres humanos, *K. pneumoniae* com frequência está envolvida em uma ampla gama de doenças clínicas, tais como pneumonia, infecções do trato urinário, infecções supurativas, bacteriemia, meningite e septicemia. Infecções causadas por esta bactéria têm alto índice de mortalidade. Cepas clínicas de *K. pneumoniae* produzem quantidades significativas de polissacáridos capsulares (Chen et al., 2014).

O aumento da incidência de *K. pneumoniae* produtora de carbapenases é um desafio para saúde pública pois, se espalhou pelo mundo inteiro e atingiu proporções endêmicas em países como Israel e Grécia. As β -lactamases produzidas por Enterobacteriaceae hidrolisam eficientemente todas as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenases e também inibidores de β -lactamases (Lee GC, Burges, 2012; Munoz-Price et al., 2013).

K. pneumoniae carbapenase resistente foi relatada pela primeira vez nos Estados Unidos em 2001. Sua propagação tem sido bem documentada em todo o mundo. Segundo dados do Sistema Nacional de Vigilância de Infecções Hospitalares, a proporção de Enterobacteriaceae resistente ao carbapenem aumentou de 1,2% em 2001 para 4,2% em 2011. Foram relatados casos de bacteriemia devido à falta de antibióticos eficazes (Siu et al., 2014).

A patogenicidade de *K. pneumoniae* é devido a vários fatores de virulência que lhe permitem superar a imunidade inata. Esses fatores incluem cápsula, hipermucoviscosidade, lipopolissacarídeos, adesinas, a aquisição de sistemas de ferro, resistência ao soro, formação de biofilmes e fimbrias tipo 1 e 3. Acredita-se que a cápsula pode ser o maior fator de virulência contra fagocitose e destruição por peptídeos antimicrobianos. Há diferenças nas características clínicas de infecções por *K. pneumoniae*. As infecções são relacionadas com a natureza e o número de fatores de virulência expressos. *K. pneumoniae* tem o

potencial para causar principalmente infecções respiratórias, urinárias, no sangue, feridas e recentemente, síndrome de abscesso no fígado (El Fertas-Aissani et al., 2013; Lery et al., 2014; Vuotto et al., 2014; Bandeira et al., 2014).

O modelo *Galleria mellonella* tem sido utilizado para avaliar a virulência de *K. pneumoniae*, pois a implementação de modelos de infecção que apresentem respostas aproximadas a doença humana é essencial não só para compreensão da patogênese humana, como também para testar novas terapias antes que sejam inseridas em estágios clínicos. Embora a infecção de animais vertebrados forneça informações valiosas, modelos de infecções alternativas fornecem informação comparável e são mais fáceis de usar e eticamente aceitável, além de que o sistema imunológico deste inseto se assemelhar a estágios precoces de defesas de mamíferos após infecção (Insua et al., 2013).

2.3 *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii são cocobacilos Gram-negativos que não fermentam lactose (Kim et al., 2015), sendo um importante patógeno oportunista associada com focos de infecções em unidades de cuidados intensivos e serviços de cuidados de longo prazo em hospitais de todo o mundo (Kenyon et al., 2015; KuoLee et al., 2015). *A. baumannii* é responsável por uma variedade de infecções em seres humanos, tais como pneumonia associada à ventilação, meningite secundária, infecções no sangue, feridas e trato urinário, entre outras (Martínez et al., 2015; Cristina et al., 2011). As taxas de mortalidade de 35-70% foram relatadas por pneumonia causada por *A. baumannii*, bem como o surgimento de cepas multirresistentes e de tratamento cada vez mais difícil (KuoLee et al., 2015). Estas cepas são resistentes a vários antibióticos, incluindo β -

lactâmicos de amplo espectro, carbapenêmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinonas (Zarrilli et al., 2007).

A resistência a multidrogas em *A. baumannii* é atribuída a diferentes mecanismos, incluindo degradação, modificação, redução da permeabilidade e aumento do efluxo de moléculas de antibióticos (Sharma et al., 2014; Higuchi et al., 2013).

Segundo Obeidat et al. (2014), *A. baumannii* emergiu nos últimos anos como um agente infeccioso importante em todo o mundo em doentes hospitalizados especialmente nos países em desenvolvimento. A capacidade de *A. baumannii* de sobreviver em condições desfavoráveis por prolongados períodos de tempo pode ter contribuído para a endemia e comportamento epidemiológico deste patógeno oportunista. A aderência formação de biofilme deste micro-organismo parece estar associado a resistência a antibióticos.

A capacidade de *A. baumannii* formar biofilmes e aderir a células do epitélio respiratório tornam virulentas e aumentam o seu potencial de colonizar pele humana e mucosa do trato respiratório. A colonização bacteriana do trato respiratório frequentemente precede o início de infecção invasiva grave. Os investigadores relataram que a produção de biofilme pode tornar as bactérias até mil vezes mais resistentes ao tratamento com antibióticos do que o mesmo organismo cultivado em estágios planctônicos. Por isso, uma das principais razões para a persistência de *A. baumannii* em ambiente parece estar relacionada à sua capacidade de crescer em biofilmes, que os protegem contra os fatores ambientais adversos (Obeidat et al., 2014).

O estudo de Wand et al. (2012), demonstrou que *G. mellonella* pode ser utilizado como um modelo muito eficaz para avaliar os fatores que afetam a virulência de *A. baumannii*. O modelo também foi capaz de avaliar os efeitos de tratamento antimicrobiano em cepas sensíveis e resistentes de *A. baumannii* (Hornsey, Wareham, 2011).

2.4 Biofilme e interação microbiana *in vitro* e *in vivo*

No corpo humano, uma variedade de bactérias e fungos interagem e coexistem independentemente em hospedeiros saudáveis ou doentes. As interações em biofilmes monotípicos ou heterotípicos podem ser benéficas ou antagônicas para as espécies (Park et al., 2014).

Entretanto, biofilmes encontrados fora do laboratório não são apenas produzidos por várias bactérias, mas também incluem eucariontes. Quase 60% a 70% de infecções hospitalares recentes tem sido associadas aos dispositivos médicos inseridos dentro do organismo e tem sido verificadas bactérias e fungos interagindo juntos sob a forma de biofilmes. O biofilme ocorre em três estágios. O primeiro é aderência na camada basal que ocorre após o início da incubação. Este estágio de aderência virtual é regulado por fatores não específicos tais como interações eletrostáticas ou hidrofóbicas e através de fatores específicos como receptores para fibrinogênio e fibronectina. O segundo estágio é o processo em que *C. albicans* aderida se multiplica continuamente e as células de levedura se transformam em hifas formando estruturas tridimensionais, as quais são geralmente compostas de leveduras, pseudohifas e hifas. O último processo é o de maturação que é um aumento quantitativo de substâncias extracelulares; o biofilme maduro permite a levedura *Candida* se fixar na superfície extracelular, formando uma estrutura transversal com quadros estruturais. O dimorfismo da *Candida* serve como maior fator de influência na formação de biofilme (Park et al., 2014; Uppuluri et al., 2010).

Biofilmes multiespécies são comunidades sésseis em que as células de vários micro-organismos estão presentes. Estas células são ligadas umas às outras e estão rodeadas por uma matriz extracelular polimérica (MEP). A MEP é constituída essencialmente por polissacáridos, proteínas, DNA e células mortas. Isso pode restringir a

penetração de agentes antimicrobianos e conduzir à acumulação de enzimas de degradação antibiótica. A MEP também afeta o pH, a concentração de oxigênio e a disponibilidade de nutrientes nas camadas mais profundas do biofilme. A produção de uma MEP e a transferência de genes de resistência é favorecida por uma elevada densidade celular que contribuem para um aumento da resistência de biofilmes (Kart et al., 2014).

As bactérias podem se comunicar com *C. albicans* por meio de vários processos. Por exemplo, as bactérias podem interagir com *C. albicans* por interações célula-célula, embora a importância dessa interação em infecção seja desconhecida. Na interação fúngica-bacteriana é estudada a densidade de células dependente de secreção de mensageiros químicos solúveis no ambiente conhecidos como *quorum sensing*. A secreção de moléculas de *quorum sensing* de fungos e bactérias regula a expressão de fatores de virulência em ambos, o doador e o receptor. *C. albicans* responde as moléculas de *quorum sensing* de uma variedade de bactérias, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis* (Hall, 2015)

A resistência intrínseca de biofilmes é multifatorial, mas é em grande parte devido à matriz extracelular que encerra as células do biofilme. Embora o acúmulo de matriz seja considerado um atributo específico do biofilme, não está claro se a matriz resulta do descamamento do material da parede celular ou se reflete diferentes atividades das células do biofilme. A primeira evidência da constituição da secreção veio da descoberta de que os componentes da matriz polissacarídea tem um componente diferente da parede celular e a proteína componente da matriz é semelhante as proteínas liberadas, encontradas na suspensão (Mitchell et al., 2015).

Os biofilmes podem se desenvolver tanto nas superfícies biológicas como inertes, tais como cateteres intravasculares, próteses e

implantes. Estudos mostraram que a maior resistência a antifúngicos em biofilmes de *Candida* não depende apenas da densidade ou da idade celular, mas que as propriedades estruturais do biofilme podem ser tão ou mais importantes (Watamoto et al., 2009).

Alguns dos agentes patogênicos que predominam em dispositivos médicos invadindo e desenvolvendo biofilmes incluem bacilos Gram-negativos entéricos, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, espécies de *Klebsiella* e leveduras do gênero *Candida* (Samaranayake et al., 2014).

Interações entre micro-organismos podem ser antagônicas ou benéficas entre as espécies (Piva et al., 2011), diferentes espécies podem fornecer proteção uma para outra contra uma resposta imune ou contra um agente antimicrobiano. Em interações de bactérias e fungos também pode haver modificação do ambiente, tal como uma alteração de pH, que pode influenciar a formação de hifas em *C. albicans* (Peleg et al., 2010).

Foi realizada microscopia eletrônica de um biofilme de *Staphylococcus epidermidis* e *C. albicans* sobre material de cateter vascular, que mostrou que a bactéria aderiu a ambas as formas do fungo. Em comparação com um biofilme monoespécie, o biofilme misto parecia mais resistente a antibióticos como o fluconazol e vancomicina. Concluiu-se que a matriz extracelular formada por *S. epidermidis* pode proteger *C. albicans* do agente fúngico (Peleg et al., 2010). *Klebsiella pneumoniae* e *P. aeruginosa* são frequentemente encontrados em biofilmes, isolados de feridas apesar da relação antagônica da *P. aeruginosa* com outros micro-organismos (Childers et al., 2013).

Desde o final da década de 1980, são relatados crescimento de *K. pneumoniae* em biofilme *in vitro*, mas a evidência clara de um biofilme *in vivo* foi fornecida apenas em 1992 por Reid e colaboradores, que investigou em microscopia eletrônica de varredura algumas bactérias aderidas às células epiteliais da bexiga de um paciente

com infecção do trato urinário assintomático causado por *K. pneumoniae*. Mais tarde, estudos *in vitro* demonstraram que cerca de 40% de *K. pneumoniae* são isoladas não só a partir da urina, mas também a partir de expectoração, sangue e esfregaços de feridas, foram capazes de produzir biofilme, bem como cerca de 63% de *K. pneumoniae* isolados a partir de amostras de urina de pacientes que sofrem de infecções do trato urinário cateterizados foram positivas para a produção *in vitro* de biofilme. Recentemente, uma elevada taxa de *K. pneumoniae* isolada a partir de tubos endotraqueais (ETT) de doentes que sofrem de pneumonia associada ao ventilador (PAV) foram capazes de formar um biofilme *in vitro* (Vuotto et al., 2014).

A formação de biofilme também é um fator de virulência de *A. baumannii*, associado a sobrevivência a longo prazo em ambientes hospitalares que oferece resistência aos antibióticos. (Kim et al., 2015). As cepas de *A. baumannii* capazes de formar biofilme podem ser selecionadas sob pressão antibiótica e adquirir resistência a múltiplos antimicrobianos nas comunidades de biofilme. Em qualquer dos casos, a elevada capacidade de colonização de *A. baumannii*, combinada com a sua resistência a múltiplos antimicrobianos, irá contribuir para a sobrevivência do organismo e subsequente disseminação no ambiente hospitalar. Assim, as funções do biofilme formado por *A. baumannii* incluem ampliar a sua capacidade para resistir a terapias antimicrobianas, bem como proteger contra tensões externas, tais como desidratação e disponibilidade limitada de nutrientes (Badave, Kulkarni, 2015).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar interações de *Candida albicans* com *Acinetobacter baumannii* e com *Klebsiella pneumoniae* em biofilmes multiespécies e avaliar a patogenicidade destas interações em modelo experimental *Galleria mellonella*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem e reativação dos micro-organismos

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista (ICT/UNESP) Campos de São José dos campos, sob registro 874.660.

Foram utilizadas cepas padrão de *Candida albicans* (ATCC 18804), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), além de dois isolados clínicos de *A. baumannii* e *K. pneumoniae*. Os micro-organismos estavam armazenados em freezer a menos 70 °C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São Jose dos Campos/ UNESP.

As amostras clínicas de *K. pneumoniae* foram provenientes do Hospital Pio XII de São José dos Campos, SP, e as amostras de *A. baumannii* foram provenientes do Hospital Santa Casa de São Jose dos Campos, isoladas de pacientes com infecções pelos respectivos micro-organismos e identificados pelo Laboratório de Análises Clínicas Valeclin da cidade de São José dos Campos, São Paulo.

Para ativação desses micro-organismos, a cepa de *C. albicans* foi cultivada em ágar Sabouraud Dextrose (Himedia Laboratories, Mumbai, India) e incubada por por 48 h a 37°C e *K. pneumoniae* e *A. baumannii* cultivados em ágar MacConkey (Himedia Laboratories, Mumbai, India), respectivamente.

4.2 Preparo das Suspensões

Após ativação dos micro-organismos as células microbianas foram centrifugadas (2000 xg/10 min), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em 6 mL de solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS). Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. A contagem do número de células da suspensão foi realizada em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) obtendo-se a concentração de 10^7 micro-organismos /mL. Os parâmetros de densidade óptica e comprimento de ondas utilizados foram 0,381 e 530 nm para *C. albicans*. A densidade optica e comprimento de ondas utilizado para as bactérias Gram-negativas foi 0,6 e 600 nm.

4.3 Biofilme

Os biofilmes foram formados em placas de microtitulação de 96 poços (Costar Corning, Nova York, EUA). Foram inoculados 100 µL da suspensão padronizada de células de *C. albicans* (10^7 células/mL) e a placa foi incubada em agitação a uma rotação de 75 rpm (Quimis, Diadema, São Paulo) à 37°C por 90 min para efetuar a adesão inicial de *C. albicans*.

Depois da fase de adesão, a suspensão de células foi aspirada e cada poço foi lavado duas vezes com PBS para remover as células frouxamente aderidas. Um total de 100 µL de soro fetal bovino foi transferido para cada poço e a placa reincubada por 2 h. Após o período de reincubação, o soro fetal bovino foi aspirado e os poços lavados duas vezes com PBS. Em cada poço foram inoculados 50 µL da suspensão

padronizada dos micro-organismos das associações (*A. baumannii* ou *K. pneumoniae*). No grupo controle, foram inoculados 50 µL de PBS.

Para promoção do crescimento de biofilme, 70 µL de Yeast Nitrogen Base (YNB- Difco, Detroit, USA) acrescido de 100 mM de glicose e 30 µL de caldo BHI foram acrescentados em cada poço. Após 24 h houve a troca do caldo. As placas foram incubadas à 37°C em estufa com agitação de 75 rpm por 48 h.

4.4 Determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

Após 48 h, cada poço foi lavado duas vezes com PBS. Em seguida, 100 µL de PBS foram transferidos para cada poço e o biofilme aderido ao fundo da placa foi cuidadosamente homogeneizado por 30 s utilizando homogeneizador ultrassônico (Vibra Cell VCX 130, Sonics, São José dos Campos, Brasil) com potência de 50 W e amplificação de 25% para romper os agregados microbianos. A partir da suspensão obtida foram realizadas diluições decimais, as quais foram semeadas em placas contendo meios de cultura seletivos específicos para cada micro-organismo, ágar MacConkey para *A. baumannii* e para *K. pneumoniae* e ágar Saboraud Dextrose com Cloranfenicol para *C. albicans*. As placas foram incubadas à 37°C por 48 h. Após incubação, as colônias foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

4.5 Interação de *Acinetobacter baumannii* ou *Klebsiella pneumoniae* com *Candida albicans* em modelo de *Galleria mellonella*

Foram utilizadas *G. mellonella* em estágio final da fase larval, as quais foram criadas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus de São José dos Campos/UNESP.

A suspensão de *C. albicans* foi preparada a partir de cultura de 18 h em 6 mL de caldo Yeast Nitrogen Base (YNB- Difco, Detroit, USA) a 37 °C. A seguir, as células foram centrifugadas a 2000 xg por 10 min, sendo o sobrenadante descartado. O depósito foi ressuspendido em PBS e misturado em agitador de tubos (vortex) por 30 s. A lavagem das células foi repetida por mais 2 vezes. A suspensão de bactérias foi padronizada na concentração de 10^8 células/mL com o auxílio do espectrofotômetro, usando os parâmetros anteriormente descritos e diluída na concentração de 10^7 células/mL.

Quadro 1- Concentração de micro-organismos utilizada em *G. mellonella*

Micro-organismo	Concentração utilizada (UFC/ mL)
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	10^8
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 4352	$2,5 \times 10^2$
<i>C. albicans</i> ATCC 18804	10^8
<i>A. baumannii</i> cepa clínica 1	$1,2 \times 10^2$
<i>A. baumannii</i> cepa clínica 2	10^8
<i>K. pneumoniae</i> cepa clínica 1	10^6
<i>K. pneumoniae</i> cepa clínica 2	10^6

Inóculo de 10 µL da suspensão padronizada de *Candida* foi injetado na hemolinfa de cada lagarta através da última prolegue esquerda e 10 µL da suspensão de bactérias, da respectiva associação, na última prolegue direita utilizando seringa Hamilton. Foram utilizadas 5 seringas Hamilton para cada grupo experimental. Para os grupos com infecção por um único micro-organismo, 10 µL da suspensão do micro-organismo foi inoculada na última prolegue direita. Em todos os experimentos foi realizado um grupo inoculado apenas PBS para

acompanhar o estado de saúde das larvas de *G. mellonella* durante todo o experimento.

Após a inoculação, as lagartas (30 unidades por grupo) foram colocadas em placas de Petri e incubadas a 37°C em estufa e o número de *G. mellonella* mortas foi anotado, diariamente, durante 7 dias. As larvas foram consideradas mortas quando não apresentavam nenhum movimento ao toque. A morte de todas as larvas do grupo experimental ou a transição para a forma de pupa determinou o término do experimento. A seguir, foram realizadas as curvas de sobrevivência.

4.6 Análise estatística

A análise estatística dos dados de UFC/mL foi realizada Análise t de Student e teste de Tukey, utilizando-se o Programa Graph Pad Prism. Em relação aos experimentos com *G. mellonella*, foi realizada a curva de sobrevivência e estimativa das diferenças na sobrevivência pelo método de Log-rank (Mantel - Cox) utilizando o Programa Graph Pad Prism. Em todos os testes, foi considerado nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Contagem de *C. albicans* na interação com *A. baumannii* em biofilmes *in vitro*

Na contagem de *C. albicans* ATCC 18804 (UFC/mL) houve um aumento significativo deste micro-organismo quando na interação com as cepas clínicas 1 e 2 de *A. baumannii* ATCC 19906 no biofilme multiespécie. Na interação com *A. baumannii* e cepa de *C. albicans* o aumento também foi significativo (Figura 1).

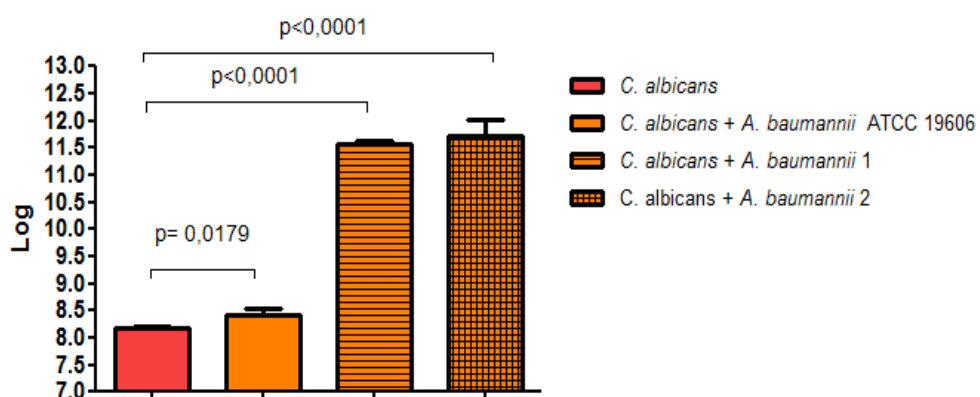


Figura 1 – Contagem de *C. albicans*, média e desvio-padrão dos dados de UFC/mL (Log 10) em biofilme monoespécie e multiespécie. Teste *t* de Student ($p \leq 0,05$).

5.2 Contagem de *A. baumannii* na interação com *C. albicans* em biofilme *in vitro*

Houve discreto aumento na contagem de *A. baumannii* quando em interação com *C. albicans*, sendo este acréscimo observado

em relação às três cepas utilizadas, porém o aumento não foi significativo em relação a nenhuma das três cepas analisadas (Figura 2).

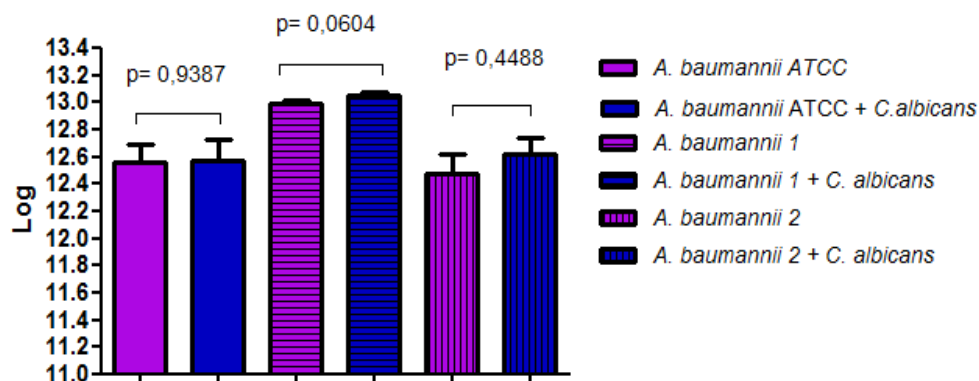


Figura 2 – Contagem de *A. baumannii*, média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) em biofilme monoespécie e multiespécie. Teste *t* de Student ($p \leq 0,05$).

5.3 Interação de *A. baumannii* ATCC 19606, *A. baumannii* cepa clínica 1 e *A. baumannii* cepa clínica 2 com *C. albicans* em *Galleria mellonella*

Inicialmente foram realizadas curvas de sobrevivência inoculando suspensões de *C. albicans* em diversas concentrações, sendo escolhida a concentração de 10^8 , na qual ocorreu em torno de 50% de morte das lagartas utilizadas.

O mesmo foi realizado com *A. baumannii*, onde para *A. baumannii* ATCC e cepa clínica 2 a suspensão utilizada foi 10^8 , que matou em torno de 50% dos indivíduos na curva de sobrevivência realizada, já para a cepa clínica 1 foi utilizada a suspensão de 10^2 .

Foram realizadas injeções contendo 10 μ L em cada lagarta dos grupos: PBS, *C. albicans*, *A. baumannii* e interação de *C. albicans* com *A. baumannii*. Como previsto houve melanização dos espécimes inoculados com os micro-organismos testados (Figura 3)



Figura 3 – Melanização de *Galleria mellonella* inoculada com *Acinetobacter baumannii* cepa clínica 2.

Nos grupos onde foram injetados micro-organismos individualmente, a taxa de sobrevivência de *G. mellonella* foi maior se comparada ao grupo injetado com interação dos dois micro-organismos. Os testes realizados com *A. baumannii* ATCC 19606 e com a cepa clínica 2.

Em interação de *C. albicans* com *A. baumannii* ATCC 19606 houve morte de 100% das lagartas em até 72 h (Figura 4) e com a cepa clínica 2 foi observada uma taxa de morte de 97% dos indivíduos considerando o mesmo tempo (Figura 6).

Nos experimentos com a cepa clínica 1 tanto nos indivíduos injetados com *A. baumannii* cepa clínica 1 como na interação houve 73% de morte das lagartas em até 72 h (Figura 5).

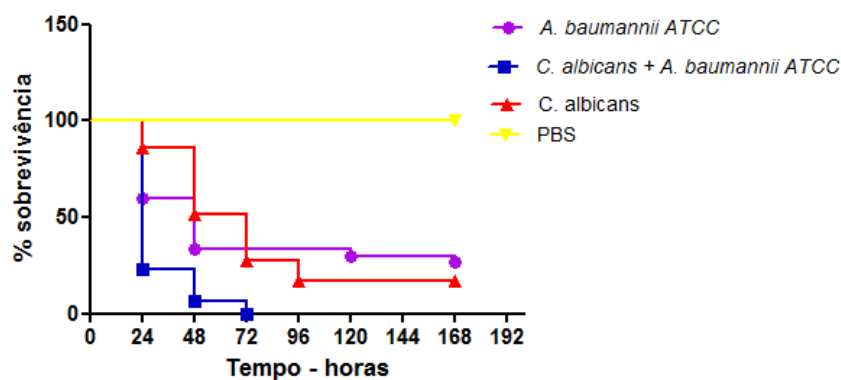


Figura 4 – Contagem de larvas sobreviventes de *G. mellonella* nos diferentes grupos experimentais. No grupo inoculado com interação de *C. albicans* e *A. baumannii* ATCC 19606 houve morte de 100% dos indivíduos em até 72 h. A curva de morte de *A.*

baumannii quando comparada com a interação demonstrou valor de $p = 0,0002$ e $p < 0,001$ para curva de morte de *C. albicans* comparada com a interação.

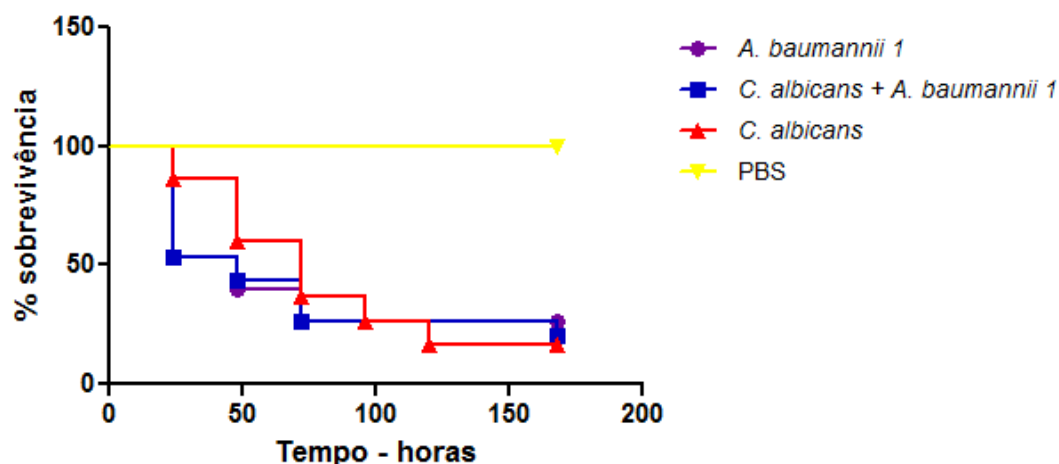


Figura 5 – Contagem de larvas sobreviventes de *G. mellonella* nos diferentes grupos experimentais. No grupo inoculado com interação de *C. albicans* com *A. baumannii* cepa clínica 1 houve morte de 73% dos indivíduos em até 72 h. *A. baumannii* cepa clínica 1 + interação de *C. albicans* com *A. baumannii* cepa clínica 1 ($p = 0,7595$). *C. albicans* e interação de *C. albicans* com *A. baumannii* cepa clínica 1 ($p = 0,5466$).

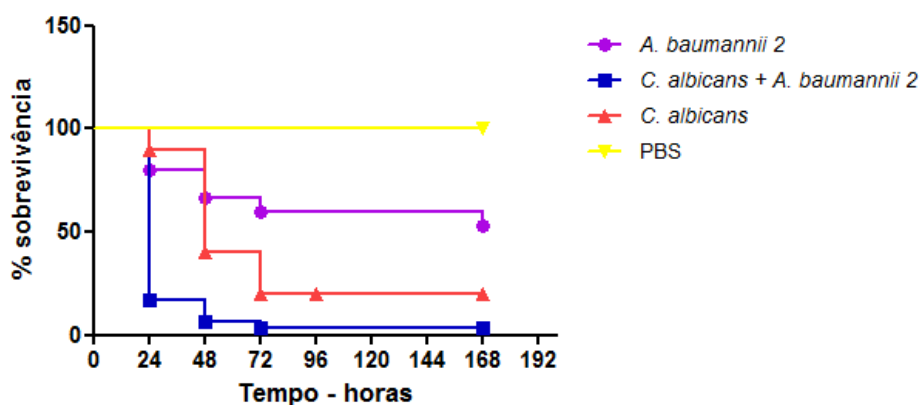


Figura 6 – Contagem de larvas sobreviventes de *G. mellonella* nos diferentes grupos experimentais. No grupo inoculado com interação de *C. albicans* com *A. baumannii* cepa clínica 2 houve morte de 97% dos indivíduos em até 72 h. *A. baumannii* cepa clínica 2 x interação de *C. albicans* com *A. baumannii* cepa clínica 2 ($p < 0,0001$). *C. albicans* x interação de *C. albicans* com *A. baumannii* cepa clínica 1 ($p < 0,0001$).

5.4 Interação de *K. pneumoniae* com *C. albicans* em biofilme *in vitro* - UFC/mL

Foram analisados os dados do biofilme monoespécie e multiespécies de *C. albicans* e *K. pneumoniae*. A cepa clínica 1 inibiu o crescimento de *C. albicans* e estes dados podem ser vistos nas figuras 7 e 8.

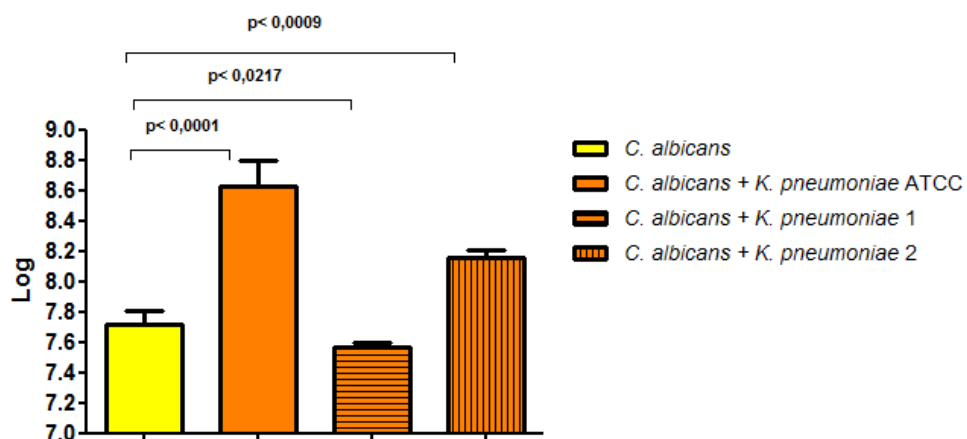


Figura 7 – Média e desvio padrão dos dados da contagem de UFC/mL (Log 10) de *C. albicans* em biofilme in vitro de *C. albicans* com *K. pneumoniae* cepa ATCC 4352, cepa clínica 1 e cepa clínica 2.

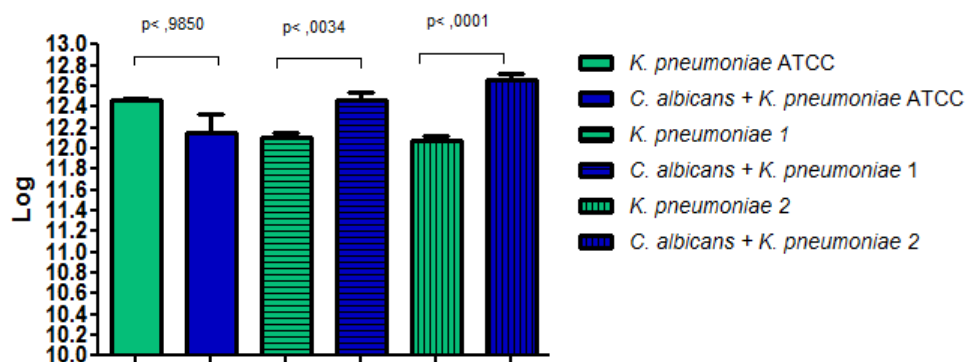


Figura 8 – Média e desvio padrão dos dados da contagem de UFC/mL (Log 10) de *K. pneumoniae* em biofilme in vitro de *C. albicans* com *K. pneumoniae*, cepa ATCC 4352, cepa clínica 1 e cepa clínica 2.

5.4.1 Contagem de *C. albicans* na interação com *K. pneumoniae* em biofilme *in vitro*

Foi observado aumento significativo no crescimento de *C. albicans* quando em interação com *K. pneumoniae* ATCC 4352, tendo sido o mesmo verificado mesmo quando em interação com a cepa clínica 2 (Figura 7).

O resultado da contagem de *C. albicans* em interação com *K. pneumoniae* cepa clínica 1 foi redução significativa no crescimento (Figura 7).

5.4.2 Contagem de *K. pneumoniae* na interação com *C. albicans* em biofilme *in vitro*

Foram testados em biofilme *in vitro* *C. albicans* em interação com *K. pneumoniae* ATCC 4352, *K. pneumoniae* cepa clínica 1 e 2, onde houve aumento significativo na contagem de *K. pneumoniae* cepa clínica 1 e 2 quando em interação (Figura 8). A contagem de *K. pneumoniae* ATCC 4352 teve uma redução não significativa na contagem de unidades formadoras de colônias quando em interação (Figura 8).

5.5 Interação de *K. pneumoniae* ATCC 4352, *K. pneumoniae* cepa clínica 1 e *K. pneumoniae* cepa clínica 2 com *C. albicans* em *Galleria mellonella*

A suspensão utilizada para os testes de *K. pneumoniae* ATCC foi de $2,5 \times 10^2$ UFC/mL e para as cepas clínicas 1 e 2 foi utilizada

uma suspensão de 10^6 , em ambos os casos ocorreu a morte de 50% das lagartas.

Após realização dos testes de interação nos grupos de *K. pneumoniae* individualmente e em interação com *C. albicans* houve em torno de 63% de morte das lagartas em até 48 h (Figura 9). Na interação com *K. pneumoniae* cepa clínica 1 os resultados da curva de morte foram semelhantes entre os grupos inoculados com o micro-organismos individualmente. Nos grupos inoculados com *C. albicans* houve 67% de morte em até 120 h e nos testes com *K. pneumoniae* cepa clínica 1 houve no mesmo espaço de tempo houve 60% de morte das lagartas, fato que se repetiu na interação, com 60% de morte em até 120 h (Figura 10).

Nos testes realizados em interação com cepa clínica 2 houve 100% de morte dos indivíduos em até 48 h, enquanto que nos grupos com inóculos das cepas individualmente as mortes das lagartas foram gradativas, demonstrando aumento da virulência dos micro-organismos quando em interação (Figura 11).

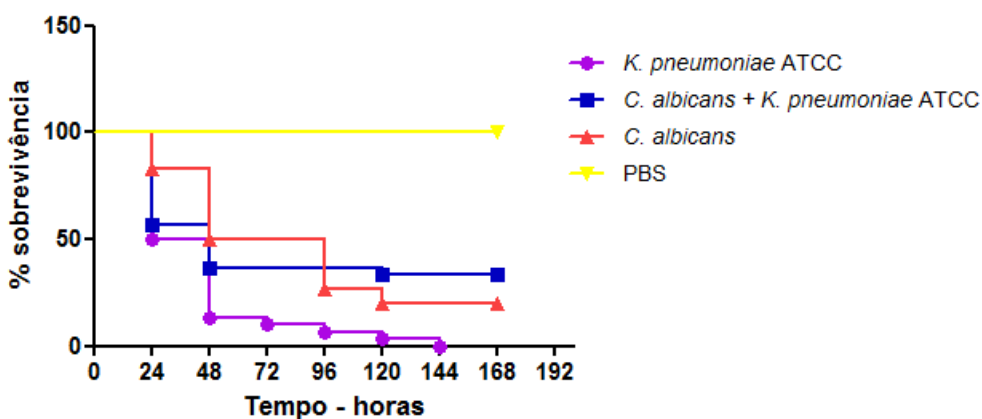


Figura 9 – Contagem de larvas sobreviventes de *G. mellonella* nos diferentes grupos experimentais. No grupo inoculado com interação de *C. albicans* com *K. pneumoniae* cepa ATCC 4352 houve morte de 63% dos indivíduos em até 48 h. *K. pneumoniae* ATCC 4352 + interação de *C. albicans* com *K. pneumoniae* ATCC 4352 ($p = 0,0053$). *C. albicans* + interação de *C. albicans* com *K. pneumoniae* ATCC 4352 ($p = 0,9495$).

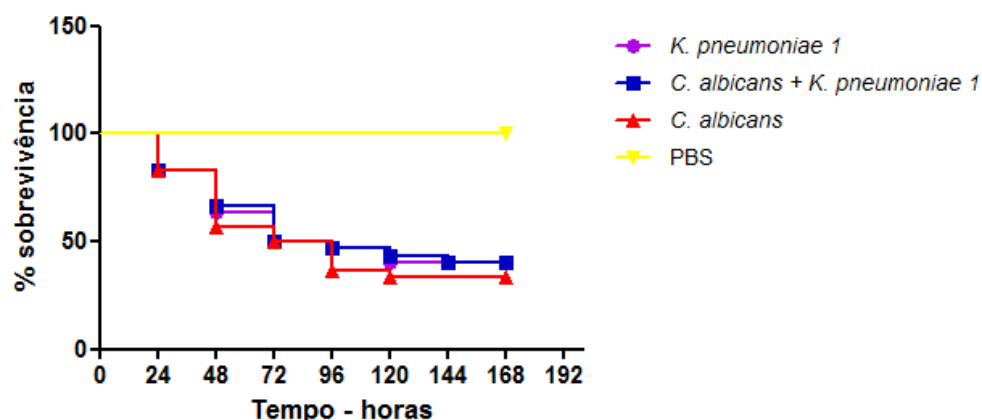


Figura 10 – Contagem de larvas sobreviventes de *G. mellonella* nos diferentes grupos experimentais. No grupo inoculado com interação de *C. albicans* com *K. pneumoniae* cepa clínica 1 houve morte de 50% dos indivíduos em até 72 h. *K. pneumoniae* cepa clínica 1 x interação de *C. albicans* com *K. pneumoniae* cepa clínica 1 ($p = 0,9606$). *C. albicans* + interação de *C. albicans* com *K. pneumoniae* ATCC 4352 ($p = 0,5993$).

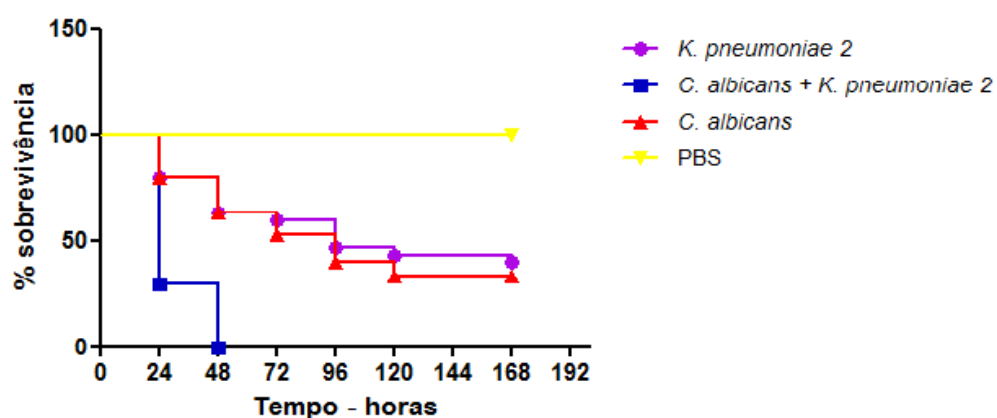


Figura 11 – Contagem de larvas sobreviventes de *G. mellonella* nos diferentes grupos experimentais. Nos grupos inoculados apenas com *C. albicans* houve 67% de morte com 96 h do inoculo e para o grupo de *K. pneumoniae* houve 53% de morte das lagartas em até 96 h, porém no grupo inoculado com interação de *C. albicans* com *K. pneumoniae* cepa clínica 2 houve morte de 100% dos indivíduos em até 48 h. *K. pneumoniae* cepa clínica 2 x interação de *C. albicans* com *K. pneumoniae* cepa clínica 2 ($p < 0,0001$). *C. albicans* + interação de *C. albicans* com *K. pneumoniae* cepa clínica 2 ($p < 0,0001$).

6 DISCUSSÃO

Em comunidades polimicrobianas, bactérias e fungos, direta e indiretamente influenciam o crescimento, sobrevivência e fisiologia de cada espécie por meio de vias multifatoriais. A virulência de bactérias ou fungos pode ser influenciada por substâncias produzidas por outros micro-organismos e as moléculas segregadas atuam em muitos tipos de interações entre esses micro-organismos. No entanto, apesar da concorrência fúngica-bacteriana, pouco se sabe sobre as identidades dessas moléculas sinalizadoras e seus efeitos. Na microbiologia, os estudos que investigam estas interações são particularmente valiosos, porque uma comunidade microbiana complexa que envolve um certo número de redes de sinalização está presente na natureza, bem como em ambientes clínicos, incluindo a cavidade bucal e o trato intestinal humano (Oh et al., 2012).

Sanchez et al. (2013) destacaram descobertas relacionando a importância do fenótipo de biofilme bacteriano como um fator de virulência potencial que pode contribuir para reincidência de infecções.

Os biofilmes tornam os micro-organismos mais resistentes aos antimicrobianos, demonstrando uma necessidade eminente de estudá-los, porém não são encontrados muitos trabalhos correlacionando bactérias Gram-negativas e micro-organismos eucariontes como *C. albicans*, portanto neste trabalho foi estudada a interação de *C. albicans* com *K. pneumoniae* e também com *A. baumannii* na formação de biofilmes. Foram avaliados isolados clínicos e cepas padrão e os resultados demonstraram diferenças entre o comportamento destas cepas. O isolado clínico 1 de *A. baumannii* foi proveniente de material de

secreção extenotomia e o isolado clínico 2 de material de secreção sacra, ambos isolados no Hospital Santa Casa de São José dos Campos, SP.

A. baumannii sobrevive com escassez de nutrientes por vários dias em diversos ambientes e também é capaz de resistir a dessecação e desinfecção. Supõe-se que esta característica de resistir a efeitos adversos, bem como a sua virulência, seja resultado da sua capacidade de formar biofilmes (Espinal et al., 2012). Esta propriedade desempenha importante papel nas infecções hospitalares, devido à sua capacidade de colonização dos dispositivos hospitalares como cateteres, dentre outros (Longo et al., 2014).

O estudo de Lee HW et al. (2008) demonstrou que isolados clínicos de *A. baumannii* têm capacidade de formar grandes quantidades de biofilme e que esta capacidade mostra uma correlação com a adesão das células epiteliais, sendo possivelmente uma estratégia para aumentar a invasão do hospedeiro e sobrevivência do micro-organismo a terapias antimicrobianas. A capacidade de transferência de genes é reforçada no interior das comunidades de biofilme, facilitando a disseminação de resistência a antibióticos, sendo esta capacidade disseminada no ambiente hospitalar contribuindo para a resistência do micro-organismo. As células de *A. baumannii* que crescem no biofilme são altamente resistentes aos componentes do sistema imunológico humano.

De acordo com o trabalho de Richards et al. (2015), *A. baumannii* tem a capacidade de inibir filamentação de *C. albicans* e a formação de biofilme, porém se o biofilme de *C. albicans* já estiver maduro, pode inibir o crescimento de *A. baumannii* por meio da produção de moléculas de farnesol no *quorum-sensing*. Kostoulas et al. (2015) demonstraram que farnesol afeta a viabilidade de diferentes cepas de *A. baumannii* e também é capaz de destruir as membranas das células bacterianas.

Entretanto, no presente estudo, o crescimento de *A.*

baumannii em biofilme *in vitro* de 48 h não foi significativamente afetado quando em interação com *C. albicans*. *A. baumannii* apresentou contagem do número de células abundante no biofilme monoespécie (aproximadamente 12 logs), que foi mantido na interação entre os dois micro-organismos e nos biofilmes com cada uma das três cepas testadas: *A. baumannii* ATCC 19606 e os isolados clínicos 1 e 2.

A. baumannii é um micro-organismo Gram-negativo que possui tempo de geração curto, aumentando sua população em um breve período de tempo. Foi possível observar essa característica nos biofilmes realizados neste trabalho, mesmo quando em interação com *C. albicans* e de acordo com os resultados obtidos não houve efeito inibitório de *C. albicans* sobre o crescimento de *A. baumannii*.

Na literatura, tem sido demonstrada inibição ou morte de hifas de *C. albicans* na interação com *Pseudomonas aeruginosa*, como por exemplo, no trabalho de Samaranayake et al. (2014), no qual concluiu-se que *C. albicans* é um micro-organismo muito importante para colonização inicial de um biofilme multiespécie em superfície de cateteres. Em biofilmes de *C. albicans* e *P. aeruginosa*, *P. aeruginosa* parece superior em matar a forma filamentosa (hifas) de *C. albicans* quando em comparação com *Escherichia coli*. O efeito inibidor das células bacterianas vivas foi identificado como proveniente de lipopolissacarídeos de *P. aeruginosa*, porém poucas cepas foram investigadas.

Com relação à contagem de *C. albicans* no presente estudo, observamos em média um aumento de 3 log na contagem de Unidades Formadoras de Colônias no biofilme quando na interação com as cepas clínicas de *A. baumannii* utilizadas neste estudo, se comparado com a contagem de células do biofilme monoespécie de *C. albicans*. O acréscimo de soro fetal bovino neste experimento pode ter favorecido a formação de hifas por *C. albicans* inibindo a ação de *A. baumannii* sobre as hifas, e dessa forma não houve efeito inibitório de *A. baumannii* sobre *C. albicans*.

Embora no presente trabalho a contagem de células de *C. albicans* tenha aumentado significativamente quando em interação com *A. baumannii* sugere-se que sejam realizados testes de filamentação para poder verificar se algo foi provocado para estímulo à filamentação das hifas de *C. albicans* aumentando assim sua capacidade invasora.

O isolado clínico 1 de *K. pneumoniae* foi proveniente de material de secreção de reto e o isolado clínico 2 de material de secreção nasal, ambos isolados no Hospital Pio XII de São José dos Campos, SP.

Nas interações entre *C. albicans* e *K. pneumoniae* ATCC 4552 foi observado redução na contagem de células de *K. pneumoniae* no biofilme em interação com *C. albicans*, e neste mesmo biofilme, observamos aumento na contagem de células de *C. albicans*. Pode ter ocorrido a interferência de um micro-organismo no crescimento do outro durante a formação deste biofilme, em contrapartida, nos testes com *K. pneumoniae* isolado clínico 1, observamos aumento na contagem de UFC/mL de *K. pneumoniae* enquanto as contagens de UFC/mL de *C. albicans* foi reduzida em comparação com os grupos controle (biofilme monoespécie).

Embora tenhamos percebido alterações nas interações de *C. albicans* com *K. pneumoniae* cepa ATCC 4352 e com *K. pneumoniae* isolado clínico 1, o mesmo não foi observado nos testes de *C. albicans* com *K. pneumoniae* isolado clínico 2, no qual tanto *C. albicans* quanto *K. pneumoniae* tiveram aumento nas contagens de células quando na formação do biofilme em interação.

Nos testes *in vivo* foi utilizado o modelo de infecção experimental *Galleria mellonella* também conhecido como “larva da traça da cera”. Esta lagarta é cada vez mais utilizada como modelo animal para o estudo de bactérias patogênicas, pois apresentam um relativamente avançado sistema de defesa antimicrobiano e são mais susceptíveis de produzir informações relevantes para o posterior estudo do processo de infecção em mamíferos. Assim como os mamíferos, *G. mellonella*

possuem um sistema circulatório e um sistema de resposta imune inata complexo. As células da hemolinfa de *G. mellonella* são capazes ou fagocitar micro-organismos, e as respostas humorais incluem a produção de lisozima e proteínas antibacterianas (Jander et al., 2000).

Segundo Insua et al. (2013) o progresso da infecção de *G. mellonella* por cepas que causam a morte das lagartas foi acompanhada por um aumento da pigmentação, sendo indicativo de atividade proteolíticas (PO) na hemolinfa, resultando na deposição de melanina, também observada no presente estudo.

Houve 60% de morte em 72 h de *G. mellonella* ao ser realizada a curva de sobrevivência na concentração de 10^6 células por lagarta para as cepas de *A. baumannii* ATCC 19606 e clínica 2, ao ponto que para cepa clínica 1 foi necessário reduzir esta concentração para $1,2 \times 10^2$ UFC/mL, sendo estas concentrações utilizadas para os experimentos realizados no presente trabalho.

No estudo *in vivo* desta pesquisa, quando utilizada a cepa ATCC 19606 de *A. baumannii* observou-se que 66,7% das lagartas morreram em 72 h de experimento, ao ponto que na interação com *C. albicans*, neste mesmo tempo, todas as lagartas já haviam morrido.

A. baumannii isolado clínico 1, foi mais virulento para *G. mellonella*, pois a curva de sobrevivência realizada com uma quantidade menor de inóculo, apresentou 73,3% de morte em 72 h tanto no grupo em que foi inoculado apenas *A. baumannii* quanto no grupo em que foram inoculados *A. baumannii* e *C. albicans*.

Para o isolado clínico 2 de *A. baumannii* observou-se 40% de mortes das lagartas com inóculo na mesma quantidade da cepa ATCC 19606. No grupo experimental em que foram inoculados *A. baumannii* e *C. albicans* a mortalidade de *G. mellonella* foi de 96,7%, concluindo-se que ao inocular os dois micro-organismos na lagarta a virulência aumentou, provocando um aumento na mortalidade destes organismos.

No trabalho de Wand et al. (2013) foi utilizada *G. mellonella* como modelo para estudar a infecção, virulência e resposta do hospedeiro contra isolados clínicos de *K. pneumoniae* de hospitais do Reino Unido. Utilizando *G. mellonella* os autores foram capazes de estudar a virulência dos diferentes isolados de *K. pneumoniae* e observaram que os isolados mais virulentos mostraram aumento da sobrevivência de *G. mellonella* e causaram mais danos celulares ao hospedeiro do que aquelas cepas que foram avirulentas.

No presente estudo, assim como no trabalho de Wand et al. (2013), pôde-se observar que diferentes isolados clínicos de *K. pneumoniae* demonstraram variações na porcentagem de sobrevivência de *G. mellonella*. Aproximadamente 50% de *G. mellonella* inoculadas com *C. albicans* e *K. pneumoniae* ATCC morreram em 24 h, porém observou-se que em 48 h todas as lagartas inoculadas com interação de *C. albicans* e *K. pneumoniae* isolado clínico 2 obtiveram taxa de mortalidade de 100%. Através destes resultados foi perceptível que o isolado clínico 2 associada a *C. albicans* foram mais virulentas para o modelo de invertebrado utilizado neste estudo.

Apesar de ter sido observada uma sobrevivência sensivelmente maior das lagartas inoculadas com *C. albicans* e *K. pneumoniae* isolado clínico 1 em relação ao grupo inoculado apenas com *C. albicans*, esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Em relação a associação de *C. albicans* com o isolado clínico 1 de *K. pneumoniae* em torno de 60% das lagartas morreram em 144 h demonstrando menor patogenicidade em relação aos testes de *C. albicans* com o isolado clínico 1 e a cepa ATCC 4352. Embora tenha sido observada uma sobrevivência sensivelmente maior das lagartas inoculadas com *C. albicans* e *K. pneumoniae* isolado clínico 1 ou *C. albicans* e *K. pneumoniae* ATCC 4352 em relação ao grupo inoculado apenas com *C. albicans*, entretanto esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Comparando esses resultados de sobrevivência de *G. mellonella* podemos considerar que houve uma possível interferência da *C. albicans* sobre *K. pneumoniae* durante o processo de infecção experimental, porém seriam necessários outros testes para confirmação desses dados.

Estudos sobre interações entre micro-organismos são de grande importância para tentarmos elucidar caminhos para novas possibilidades de substituições dos medicamentos atuais utilizados para combater estes micro-organismos que vem desenvolvendo mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Seriam necessários novos estudos para determinar se as interações entre estes micro-organismos afetam a produção de hifas de *C. albicans* e quais moléculas ou genes sofrem interferências nessas interações.

7 CONCLUSÃO

Após análise dos dados obtidos concluiu-se que:

- Aumento do crescimento de *C. albicans* quando em interação com *A. baumannii* *in vitro*;
- Não houve aumento significativo no crescimento de *A. baumannii* ATCC 19606 e cepas clínicas testadas quando em interação com *C. albicans* nos testes de biofilme *in vitro*;
- O modelo de *G. mellonella* quando inoculado com *A. baumannii* ATCC 19606 ou cepa clínica 2 em interação com *C. albicans* reduziu a sobrevida de *G. mellonella* se comparado com as larvas inoculadas com estes micro-organismos separadamente;
- *C. albicans* sofreu efeitos inibitórios quando em interação com *K. pneumoniae* cepa clínica 1 no biofilme *in vitro*, já em interação com *K. pneumoniae* cepa clínica 2 ambos os micro-organismos obtiveram um aumento significativo no seu crescimento. Na interação de *C. albicans* com cepa ATCC 4352 de *K. pneumoniae* houve um grande aumento no crescimento de *C. albicans*;
- Quando *G. mellonella* foi inoculada com a interação de *K. pneumoniae* ATCC 4352 com *C. albicans* houve maior sobrevida destas lagartas se comparado ao grupo inoculado com estes micro-organismos isolados.

8 REFERÊNCIAS*

Badave GK, Kulkarni D. Biofilm producing multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: an emerging challenge. J Clin Diagn Res. 2015 Jan;9(1): DC08-10. doi: 10.7860/JCDR/2015/11014.5398.

Bandeira M, Carvalho PA, Duarte A, Jordao L. Exploring dangerous connections between *Klebsiella pneumoniae* biofilms and healthcare-associated infections. Pathogens. 2014 Aug 19;3(3):720-31. doi: 10.3390/pathogens3030720.

Borghi E, Romagnoli S, Fuchs BB, Cirasola D, Perdoni F, Tosi D, et al. Correlation between *Candida albicans* biofilm formation and invasion of the invertebrate host *Galleria mellonella*. Future Microbiol. 2014 Feb;9(2):163-73. doi: 10.2217/fmb.13.159.

Chen KM, Chiang MK, Wang M, Ho HC, Lu MC, Lai YC. The role of *pgaC* in *Klebsiella pneumoniae* virulence and biofilm formation. Microb Pathog. 2014 Dec;77:89-99. doi: 10.1016/j.micpath.2014.11.005.

Childers BM, Van Laar TA, You T, Clegg S, Leung KP. MrkD1P from *Klebsiella pneumonia* strain IA565 allows for coexistence with *Pseudomonas aeruginosa* and protection from protease-mediated biofilm detachment. Infect Immun. 2013 Nov;81(11):4112-20. doi: 10.1128/IAI.00521-13.

Cristina ML, Spagnolo AM, Ottria G, Sartini M, Orlando P, Perdelli F, et al. Spread of multidrug carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in different wards of an Italian hospital. Am J Infect Control. 2011 Nov;39(9):790-4. doi: 10.1016/j.ajic.2011.01.016.

El Fertas-Aissani R, Messai Y, Alouache S, Bakour R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. Pathol Biol (Paris). 2013 Oct;61(5):209-16. doi: 10.1016/j.patbio.2012.10.004.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Espinal P, Martí S, Vila J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. J Hosp Infect. 2012 Jan;80(1):56-60. doi: 10.1016/j.jhin.2011.08.013.

Ford CB, Funt JM, Abbey D, Issi L, Guiducci C, Martinez DA, et al. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. Elife. 2015 Feb 3; 4:e00662. doi: 10.7554/eLife.00662.

Gow NA, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. Curr Opin Microbiol. 2012 Aug;15(4):406-12. doi: 10.1016/j.mib.2012.04.005.

Hall RA. Dressed to impress: Impact of environmental adaptation on the *C. albicans* cell wall. Mol Microbiol. 2015 Jul;97(1):7-17. doi: 10.1111/mmi.13020.

Harriott MM, Noverr MC. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. Trends Microbiol. 2011 Nov;19(11):557-63. doi: 10.1016/j.tim.2011.07.004.

Higuchi S, Onodera Y, Chiba M, Hoshino K, Gotoh N. Potent in vitro antibacterial activity of DS-8587, a novel broad-spectrum quinolone, against *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Apr;57(4):1978-81. doi: 10.1128/AAC.02374-12.

Hornsey M, Wareham DW. In vivo efficacy of glycopeptide-colistin combination therapies in a *Galleria mellonella* model of *Acinetobacter baumannii* infection. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Jul;55(7):3534-7. doi: 10.1128/AAC.00230-11.

Insua JL, Llobet E, Moranta D, Pérez-Gutiérrez C, Tomás A, Garmendia J, et al. Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth *Galleria mellonella*. Infect Immun. 2013 Oct; 81(10):3552-65. doi: 10.1128/IAI.00391-13.

Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. J Bacteriol. 2000 Jul;182(13):3843-5.

Jorge AOC. Microbiologia e Imunologia oral. São Paulo: Elsevier; 2012.

Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, Coleman JJ, Suleiman JM, Vilela SF, et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. BMC Microbiol. 2011 Nov 4;11:247. doi: 10.1186/1471-2180-11-247.

Kart D, Tavernier S, Van Acker H, Nelis HJ, Coenye T. Activity of disinfectants against multispecies biofilms formed by *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. Biofouling. 2014;30(3):377-83. doi: 10.1080/08927014.2013.878333.

Kenyon JJ, Marzaioli AM, Hall RM, De Castro C. Structure of the K12 capsule containing 5,7-di-N-acetylacinetaminic acid from *Acinetobacter baumannii* isolate D36. Glycobiology. 2015 Aug;25(8):881-7. doi: 10.1093/glycob/cwv028.

Kim HA, Ryu SY, Seo I, Suh SI, Suh MH, Baek WK. Biofilm Formation and Colistin Susceptibility of *Acinetobacter baumannii* Isolated from Korean Nosocomial Samples. Microb Drug Resist. 2015 Aug;21(4):452-7. doi: 10.1089/mdr.2014.0236.

Kostoulas X, Murray GL, Cerqueira GM, Kong JB, Bantun F, Mylonakis E, et al. Impact of a Cross-Kingdom Signalling Molecule of *Candida albicans* on *Acinetobacter baumannii* physiology. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Oct 19;60(1):161-7. doi: 10.1128/AAC.01540-15.

Krom BP, Kidwai S, Ten Cate JM. *Candida* and other fungal species: forgotten players of healthy oral microbiota. J Dent Res. 2014 May;93(5):445-51. doi: 10.1177/0022034514521814.

KuoLee R, Harris G, Yan H, Xu HH, Conlan WJ, Patel GB, et al. Intranasal immunization protects against *Acinetobacter baumannii*-associated pneumonia in mice. Vaccine. 2015 Jan 1;33(1):260-7. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.02.083.

Lee GC, Burgess DS. Treatment of *Klebsiella pneumonia* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2012 Dec 13;11:32. doi: 10.1186/1476-0711-11-32.

Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. Clin Microbiol Infect. 2008 Jan;14(1):49-54.

Lery LM, Frangeul L, Tomas A, Passet V, Almeida AS, Bialek-Davenet S, et al. Comparative analysis of *Klebsiella pneumonia* genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence factor. BMC Biol. 2014 May 29;12(1):41. doi: 10.1186/1741-7007-12-41.

Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. New Microbiol. 2014 Apr;37(2):119-27.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms.

Virulence. 2013 Feb 15;4(2):119-28. doi: 10.4161/viru.22913.

Martínez T, Ropelewski AJ, González-Mendez R, Vázquez GJ, Robledo IE. Draft Genome Sequence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Acinetobacter baumannii* Strain M3AC9-7, Isolated from Puerto Rico. Genome Announc. 2015 Apr 9;3(2). pii: e00274-15. doi: 10.1128/genomeA.00274-15.

Mitchell KF, Zarnowski R, Sanchez H, Edward JA, Reinicke EL, Nett JE, et al. Community participation in biofilm matrix assembly and function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Mar 31;112(13):4092-7. doi: 10.1073/pnas.1421437112.

Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. Lancet Infect Dis. 2013 Sep;13(9):785-96. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70190-7.

Obeidat N, Jawdat F, Al-Bakri AG, Shehabi AA. Major biologic characteristics of *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital environmental and patients' respiratory tract sources. Am J Infect Control. 2014 Apr;42(4):401-4. doi: 10.1016/j.ajic.2013.10.010.

Oh S, Go GW, Mylonakis E, Kim Y. The bacterial signaling molecule indole attenuates the virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. J Appl Microbiol. 2012 Sep;113(3):622-8. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05372.x.

Padawer D, Pastukh N, Nitzan O, Labay K, Aharon I, Brodsky D, et al. Catheter-associated candiduria: Risk factors, medical interventions, and antifungal susceptibility. Am J Infect Control. 2015 Jul 1;43(7):19-22. doi: 10.1016/j.ajic.2015.03.013.

Park SJ, Han KH, Park JY, Choi SJ, Lee KH. Influence of bacterial presence on biofilm formation of *Candida albicans*. Yonsei Med J. 2014 Mar;55(2):449-58. doi: 10.3349/ymj.2014.55.2.449.

Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. Nat Rev Microbiol. 2010 May;8(5):340-9. doi: 10.1038/nrmicro2313.

Piva E, Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SFG, Jorge AOC, Junqueira JC. Interação entre *Escherichia coli* e *Candida albicans* em biofilmes

formados in vitro: análise da viabilidade celular por método colorimétrico Rev Odontol UNESP, Araraquara. 2011 Set-Out;40(5):222-7.

Polke M, Hube B, Jacobsen ID. *Candida* Survival strategies. Adv Appl Microbiol. 2015 Feb 24;91:139-235. doi: 10.1016/bs.aambs.2014.12.002.

Rane HS, Bernardo SM, Howell AB, Lee SA. Cranberry-derived proanthocyanidins prevent formation of *Candida albicans* biofilms in artificial urine through biofilm and adherence specific mechanisms. Antimicrob Chemother. 2014 Feb;69(2):428-36. doi: 10.1093/jac/dkt398.

Richards AM, Abu Kwaik Y, Lamont RJ. Code blue: *Acinetobacter baumannii*, a nosocomial pathogen with a role in the oral cavity. Mol Oral Microbiol. 2015 Feb;30(1):2-15. doi: 10.1111/omi.12072.

Samaranayake YH, Bandara HM, Cheung BP, Yau JY, Yeung SK, Samaranayake LP. Enteric Gram-negative bacilli suppress *Candida* biofilms on foley urinary catheters. APMIS. 2014 Jan;122(1):47-58. doi: 10.1111/apm.12098.

Sanchez CJ Jr, Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. BMC Infect Dis. 2013 Jan 29;13:47. doi: 10.1186/1471-2334-13-47.

Sharma R, Arya S, Patil SD, Sharma A, Jain PK, Navani NK, et al. Identification of novel regulatory small RNAs in *Acinetobacter baumannii*. PLoS One. 2014 Apr 4;9(4):93833. doi: 10.1371/journal.pone.0093833.

Silva-Rocha WP, de Brito Lemos VL, Ferreira MR, Soares LA, Svidzinski TI, Milan EP, et al. Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. BMC Complement Altern Med. 2015 Feb 5;15:6. doi: 10.1186/s12906-015-0522-x.

Siu LK, Huang DB, Chiang T. Plasmid transferability of KPC into a virulent K2 serotype *Klebsiella pneumoniae*. BMC Infect Dis. 2014 Mar 31;14:176. doi: 10.1186/1471-2334-14-176.

Thomas RJ, Hamblin KA, Armstrong SJ, Müller CM, Bokori-Brown M, Goldman S, et al. *Galleria mellonella* as a model system to test the pharmacokinetics and efficacy of antibiotics against *Burkholderia pseudomallei*. Int J Antimicrob Agents. 2013 Apr;41(4):330-6. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.12.009.

Uppuluri P, Pierce CG, Thomas DP, Bubeck SS, Saville SP, Lopez-Ribot JL. The transcriptional regulator Nrg1p controls *Candida albicans* biofilm formation and dispersion. *Eukaryot Cell*. 2010 Oct;9(10):1531-7. doi: 10.1128/EC.00111-10.

Vinogradov E, Maclean L, Xu HH, Chen W. The structure of the polysaccharide isolated from *Acinetobacter baumannii* strain LAC-4. *Carbohydr Res*. 2014 May 22;390:42-5. doi: 10.1016/j.carres.2014.03.001.

Vuotto C, Longo F, Balice MP, Donelli G, Varaldo PE. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens*. 2014 Sep 5;3(3):743-58. doi: 10.3390/pathogens3030743.

Wand ME, Bock LJ, Turton JF, Nugent PG, Sutton JM. *Acinetobacter baumannii* virulence is enhanced in *Galleria mellonella* following biofilm adaptation. *J Med Microbiol*. 2012 Apr;61(Pt 4):470-7. doi: 10.1099/jmm.0.037523-0.

Wand ME, McCowen JW, Nugent PG, Sutton JM. Complex interactions of *Klebsiella pneumoniae* with the host immune system in a *Galleria mellonella* infection model. *J Med Microbiol*. 2013 Dec;62(Pt 12):1790-8. doi: 10.1099/jmm.0.063032-0.

Watamoto T, Samaranayake LP, Jayatilake JA, Egusa H, Yatani H, Seneviratne CJ. Effect of filamentation and mode of growth on antifungal susceptibility of *Candida albicans*. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Oct;34(4):333-9. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.03.008.

Zarei Mahmoudabadi A, Zarrin M, Kiasat N. Biofilm Formation and Susceptibility to Amphotericin B and Fluconazole in *Candida albicans*. *Jundishapur J Microbiol*. 2014 Jul;7(7):17105. doi: 10.5812/jjm.17105.

Zarrilli R, Casillo R, Di Popolo A, Tripodi MF, Bagattini M, Cuccurullo S, et al. Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. *Clin Microbiol Infect*. 2007 May;13(5):481-9.

ANEXO – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA CAMPUS SÃO JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP 	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA	
Título da Pesquisa: Interação <i>Candida albicans</i> com <i>Acinetobacter baumannii</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> em biofilmes multiespécie	
Pesquisador: Leileane Cohn	
Área Temática:	
Versão: 1	
CAAE: 38228314.0.0000.0077	
Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP	
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio	
DADOS DO PARECER	
Número do Parecer: 874.660	
Data da Relatoria: 16/11/2014	
Apresentação do Projeto:	
Interação <i>Candida albicans</i> com <i>Acinetobacter baumannii</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> em biofilmes multiespécie	
Objetivo da Pesquisa:	
• Avaliar interações microbianas de <i>Candida albicans</i> em biofilmes multiespécies e avaliar a patogenicidade destas interações	
Avaliação dos Riscos e Benefícios:	
Com a análise, poderá ser feitas propostas de novos tratamentos, de acordo com o resultado encontrado	
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:	
Nada a declarar	
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:	
satisfatórios (termo de doação das cepas clínicas)	
Recomendações:	
Relatório Científico: Deverá o pesquisador enviar via plataforma Brasil (notificação) o Relatório Científico conforme segue:-	
Projeto de 01(um) ano ou mais enviar RC semestral.	
Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777 Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000 UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS Telefone: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9010 E-mail: cep@fosjc.unesp.br	

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 874-693

Projeto menos que um 01(ano) somente RC final.

A não observância deste compromisso, acarretará a não análise de novos projetos por este Comitê de Ética, até a sua regularização.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

nada a declarar

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer da relatora, solicitando ao pesquisador que se atenha as recomendações com relação ao Relatório Científico.

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS, 17 de Novembro de 2014

Assinado por:
Denise Nicodemo
(Coordenador)

Endereço: Av. Eng.º Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: cep@sjc.unesp.br