

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

OBTENÇÃO DE CEPAS MULTIRRESISTENTES DE *Candida glabrata*
ATRAVÉS DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À ANIDULAFUNGINA EM
CÉLULAS PLANCTÔNICAS E DE BIOFILME

CAMILA HATWIG

PORTO ALEGRE, 2017

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

OBTENÇÃO DE CEPAS MULTIRRESISTENTES DE *Candida glabrata*
ATRAVÉS DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À ANIDULAFUNGINA EM
CÉLULAS PLANCTÔNICAS E DE BIOFILME

Dissertação apresentada por **Camila Hatwig** para
obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

PORTO ALEGRE, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27 de março de 2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Andreza Francisco Martins

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Gustavo Pozza Silveira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Hatwig, Camila
OBTENÇÃO DE CEPAS MULTIRRESISTENTES DE *Candida glabrata* ATRAVÉS DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À ANIDULAFUNGINA EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E DE BIOFILME / Camila Hatwig. -- 2017.
78 f.

Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. *Candida glabrata*. 2. biofilme. 3. anidulafungina. 4. resistência cruzada. 5. fluconazol. I. Fuentefria, Alexandre Meneghello, orient. II. Título.

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

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Aplicada do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia UFRGS. A autora recebeu bolsa de estudos do CNPq.

Dedico este trabalho à minha amada família.

Aos meus pais Ângelo e Mônica, e à minha
irmã Carolina, pelo apoio e amor incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Alexandre Meneghello Fuentesfria, pela oportunidade oferecida. Por todos os anos de parceria, iniciados ainda durante a graduação, pelo interesse e dedicação a este trabalho.

Às amigas que fiz em nosso grupo de pesquisa, sempre disponíveis a ajudar no que fosse necessário. Sentirei muitas saudades das risadas, da parceria e do convívio diário.

Um agradecimento especial ao Eduardo, que me auxiliou em todos os experimentos, me acompanhou até a faculdade nos horários mais adversos, me apoiou em todas as etapas.

Aos meus pais, Ângelo e Mônica, e à minha irmã Carolina, pelo apoio em todos os momentos. Por estarem sempre presentes, me incentivando e torcendo pelo meu sucesso.

Ao pessoal do LACT, pela amizade e parceria, sempre.

O meu profundo agradecimento a todos que contribuíram, da mínima forma possível, para que este trabalho pudesse ser concluído.

RESUMO

Candida glabrata, geralmente comensal, surgiu como uma causa comum de infecções fúngicas graves com risco de morte. Dada a resistência crescente aos azóis, a orientação recente é utilizar as equinocandinas como a primeira escolha para o tratamento de infecções sistêmicas por *C. glabrata*. No entanto, esta é a primeira espécie de *Candida* que foi detectada com resistência significativa às equinocandinas. Esta levedura é capaz de colonizar tecidos do hospedeiro, bem como superfícies abióticas (catéteres, próteses) onde desenvolve um crescimento em multicamadas caracterizado como biofilme. A natureza da estrutura do biofilme e os atributos fisiológicos a ele conferidos resultam em uma resistência inerente a agentes antimicrobianos, impactando negativamente na saúde do paciente. Este estudo teve como objetivo a indução *in vitro* de resistência à anidulafungina em células planctônicas e sésseis de sete cepas sensíveis de *C. glabrata*, além da verificação do desenvolvimento de resistência cruzada com fluconazol. A indução de resistência foi realizada submetendo as cepas a concentrações sub-inibitórias do antifúngico. A determinação de concentração inibitória mínima através de microdiluição em caldo foi realizada previamente e posteriormente à indução de resistência e, também, para a verificação de resistência cruzada com fluconazol. O método de indução de resistência resultou em cepas fortemente resistentes à anidulafungina, com concentrações inibitórias mínimas variando de 1 a 2 µg/mL. Antes da indução da resistência, as formas planctônica e séssil das cepas eram todas sensíveis ou sensíveis dose-dependente ao fluconazol. Após a indução de resistência à anidulafungina esta sensibilidade ao fluconazol não foi mantida, tornando as cepas resistentes a este antifúngico. Clinicamente, esta resistência cruzada poderia implicar em falha terapêutica ao utilizar o fluconazol em pacientes previamente expostos a concentrações sub-inibitórias de anidulafungina por longos períodos.

PALAVRAS-CHAVE: *Candida glabrata*; biofilme; anidulafungina; resistência cruzada; fluconazol

ABSTRACT

Obtention of multiresistant strains of *Candida glabrata* by inducing anidulafungin resistance in planktonic and biofilm cells

Candida glabrata, usually commensal, has emerged as a common cause of serious life threatening fungal infections. Given the increasing resistance to azoles, the recent guidance is to use echinocandins as the first choice for the treatment of systemic infections by *C. glabrata*. However, *C. glabrata* is the first species of *Candida* that has been detected with significant resistance to echinocandins. This yeast is able to colonize host tissues as well as abiotic surfaces (catheters, prostheses) where it develops a multi-layer growth characterized as biofilm. The nature of the biofilm structure and the physiological attributes conferred on it, result in an inherent resistance to antimicrobial agents, negatively impacting the patient's health. This study aimed to induce in vitro resistance to anidulafungin in planktonic and sessile cells of seven sensitive *C. glabrata* strains, as well as to verify the development of cross-resistance with fluconazole. The induction of resistance was performed by subjecting the isolates to sub-inhibitory concentrations of the antifungal. The determination of minimum inhibitory concentration by broth microdilution was performed before and after induction of resistance and also for fluconazole cross-resistance verification. The resistance induction test resulted in strains strongly resistant to anidulafungin, with minimum inhibitory concentrations ranging from 1 to 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Prior to induction of resistance, the planktonic and sessile forms of the strains were all sensitive or sensitive dose-dependent to fluconazole. However, after the induction of resistance to anidulafungin, this sensitivity to fluconazole was not maintained, making the strains resistant to this antifungal. Clinically, this cross-resistance could lead to therapeutic failure when using fluconazole in patients previously exposed to sub-inhibitory concentrations of anidulafungin for long periods.

KEYWORDS: *Candida glabrata*; biofilm; anidulafungin; cross-resistance; fluconazole

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	19
OBJETIVOS.....	23
OBJETIVO GERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
REFERENCIAL TEÓRICO.....	27
EMERGÊNCIA DAS CANDIDEMIAS.....	29
INFECÇÃO POR <i>Candida glabrata</i>	30
BIOFILMES.....	31
RESISTÊNCIA ATRIBUÍDA À FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	33
EQUINOCANDINAS.....	34
RESISTÊNCIA DE <i>Candida glabrata</i> A EQUINOCANDINAS.....	35
ANIDULAFUNGINA.....	36
RESISTÊNCIA CRUZADA COM FLUCONAZOL.....	37
CAPÍTULO 1. ARTIGO.....	39
DISCUSSÃO GERAL.....	61
CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente dissertação de mestrado foi redigida na forma de capítulos e encontra-se organizada da seguinte forma:

- Introdução e relevância do tema
- Objetivos: geral e específicos
- Referencial teórico
- Capítulo 1: Multidrug resistant *Candida glabrata* strains obtained by inducing anidulafungin resistance in planktonic and biofilm cells, apresentado na forma de encarte de artigo a ser submetido à publicação
- Discussão geral
- Conclusões gerais

INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

Nas últimas décadas, a frequência de infecções fúngicas invasivas tem aumentado significativamente devido à elevação do número de pacientes com terapia imunossupressora, ao uso de antimicrobianos de amplo espectro e à realização cada vez mais frequente de transplantes de órgãos (KAM e XU, 2002).

Infecções sistêmicas por *Candida glabrata* são caracterizadas por uma alta taxa de mortalidade e são difíceis de tratar devido à suscetibilidade reduzida aos antifúngicos azólicos, em especial ao fluconazol (SPREGHINI *et al.*, 2012). Esta levedura é capaz de colonizar tecidos do hospedeiro assim como superfícies abióticas (catéteres, próteses) onde desenvolve um crescimento em multicamadas caracterizado como biofilme (RIERA *et al.*, 2012).

A formação de biofilme é um fator de virulência importante para as espécies de *Candida*, pois confere uma resistência significativa à terapia antifúngica por limitar a penetração de substâncias pela matriz e proteger as células contra a resposta imune do hospedeiro. Além disso, biofilmes formados por isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* têm sido associados com elevadas taxas de morbidade e mortalidade quando comparados com isolados incapazes de formar biofilmes (SILVA *et al.*, 2012).

Levando em conta a importância das micoses invasivas e sua atual epidemiologia, faz-se necessário ter múltiplas estratégias terapêuticas. Há alguns anos o manejo terapêutico era realizado com azóis e anfotericina B. Porém, devido ao aumento da resistência aos azóis, principalmente por espécies de *Candida* não-*albicans* e pela toxicidade renal da anfotericina B, um novo grupo farmacológico – as equinocandinas – surgiu como uma nova opção terapêutica (McCORNACK e PERRY, 2005). As equinocandinas inibem o complexo 1,3- β -D-glucana sintase (GS) que catalisa a biossíntese da 1,3- β -D-glucana, principal componente glucano da parede celular dos fungos.

Nos últimos anos, a levedura *Candida glabrata*, normalmente comensal, surgiu como uma causa comum de infecções fúngicas graves com risco de morte. Isso deve-se, em grande parte, a sua baixa suscetibilidade aos antifúngicos azólicos amplamente utilizados no tratamento destas infecções. Consequentemente, a orientação recente é utilizar as equinocandinas como

primeira escolha para o tratamento de infecções sistêmicas por *C. glabrata* (KATIYAR *et al.*, 2012).

Alarmantemente, *C. glabrata* é a primeira espécie de *Candida* que se tem detectado com resistência importante às equinocandinas. Relatos de casos de resistência dessa espécie durante e após o tratamento com equinocandinas estão tornando-se mais comuns. A maioria desses isolados resistentes possui mutações específicas em um dos dois “hot spots” dos genes FKS1 e FKS2, que codificam uma das subunidades da GS, alvo desse grupo farmacológico (LOCKHART *et al.*, 2012).

Isolados de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol têm a probabilidade aumentada de serem resistentes às equinocandinas e vice-versa. *Candida glabrata* é capaz de criar mutações de ponto, assim como mudanças na estrutura cromossômica, alterações estas que podem ser mecanismos de adaptação a mudanças no seu ambiente. Estas alterações genômicas podem ser um mecanismo de defesa que permite torná-la rapidamente resistente a múltiplas drogas, após uma exposição limitada (PHAM *et al.*, 2014).

Apesar de ainda não haver um grande número de relatos na literatura, a ocorrência de mutações em FKS1 e FKS2 é responsável por uma suscetibilidade reduzida de isolados de *C. glabrata* frente às equinocandinas. A prevalência dessas mutações parece ser baixa, mas deve-se levar em consideração que uma quantidade relativamente pequena de isolados de *Candida* foi triada até o momento no mundo inteiro. A identificação destas mutações pode ser uma forma mais sensível de detectar isolados resistentes a equinocandinas quando comparada ao teste de suscetibilidade que é amplamente utilizado. No presente estudo, induziu-se resistência à anidulafungina em células planctônicas e sésseis de cepas de *C. glabrata* sensíveis e verificou-se a possibilidade de desenvolvimento de resistência cruzada com fluconazol.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Induzir resistência em células planctônicas e de biofilme de cepas de *Candida glabrata* sensíveis à anidulafungina e verificar a existência de resistência cruzada com fluconazol.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar e selecionar, dentre 21 cepas de *C. glabrata*, quais são as melhores formadoras de biofilme.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da anidulafungina frente às formas planctônica e séssil das cepas selecionadas.
- Padronizar a técnica de indução de resistência à anidulafungina em células planctônicas e sésseis de *C. glabrata*.
- Verifica resistência cruzada nas cepas com resistência adquirida à anidulafungina.

REFERENCIAL TEÓRICO

EMERGÊNCIA DAS CANDIDEMIAS

Nos últimos 30 anos, houve um aumento significativo na incidência de infecções fúngicas em humanos. Estas infecções podem ser superficiais, afetando a pele, cabelos, unhas e mucosas, ou sistêmicas, envolvendo os principais órgãos do corpo humano (SILVA *et al.*, 2012).

Existe uma série de possíveis razões para o aumento da ocorrência de infecções graves e com risco de morte causadas por fungos. Uma razão importante seria a elevação da expectativa de vida da população mundial e a perda da imunocompetência com o passar da idade (RODLOFF, KOCH e SCHAUMANN, 2011). Um aumento das infecções fúngicas sistêmicas também pode ser causado por terapias intensivas em pacientes hematológicos e oncológicos, que causam fases neutropênicas prolongadas. Além disso, tratamentos antibacterianos mais efetivos permitem que pacientes com infecções vivam por tempo prolongado, sem necessariamente resolver a doença de base, tornando-os mais susceptíveis a outras infecções oportunistas (RODRIGUES, SILVA e HENRIQUES, 2014).

Dentre os fungos considerados patogênicos aos humanos, os membros do gênero *Candida* são os mais frequentemente identificados como causadores de infecções. Este gênero possui uma infinidade de espécies heterogêneas, mas apenas uma minoria tem implicado em candidíase humana. Além disso, sabe-se que aproximadamente 65% das espécies de *Candida* não são capazes de crescer à temperatura de 37°C, o que as exclui de serem patógenos ou comensais em humanos (MCCARTY e PAPPAS *et al.*, 2016).

As candidemias são um problema crescente nos hospitais do mundo inteiro. A utilização de terapias com antibióticos de amplo espectro, colocação de cateter venoso central, nutrição parenteral, terapia imunossupressora e procedimentos médicos invasivos são fatores de risco para a ocorrência destas infecções (RODLOFF, KOCH e SCHAUMANN, 2011; COLOMBO *et al.*, 2014). *Candida albicans* é a espécie mais isolada, tanto em indivíduos saudáveis quanto em doentes (PFALLER *et al.*, 2007). Entretanto, mesmo a maioria dos estudos mostrando que *C. albicans* representa cerca de 50% dos fungos isolados em candidíases humanas, nas duas últimas décadas o número de infecções causadas

por *Candida não-albicans* (CNAs) tem aumentando significativamente. Este aumento aparente do envolvimento de CNAs pode estar relacionado à evolução dos métodos de diagnóstico, como meios cromogênicos para identificação a nível de espécie e a introdução de técnicas de biologia molecular na rotina laboratorial. A alta prevalência de CNAs em infecções também pode ser um reflexo do elevado nível de resistência inerente que estas espécies têm a certos antifúngicos (MATSUMOTO *et al.*, 2014; DOI *et al.*, 2016).

Mais de 20 espécies diferentes de *Candida* têm sido identificadas como agentes etiológicos de candidíase invasiva humana. Entretanto, cerca de 90% das infecções invasivas por *Candida* sp. podem ser atribuídas a seis espécies, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. auris* (MCCARTY e PAPPAS *et al.*, 2016). Esta lista tende a crescer à medida que novas espécies sejam relatadas e que os laboratórios façam o diagnóstico a nível de espécie, a fim de otimizar o tratamento dos pacientes (PFALLER *et al.*, 2007).

INFECÇÃO POR *Candida glabrata*

C. glabrata é uma preocupação crescente em situações clínicas, causando infecções em mucosas, além de estar envolvida em cerca de 15% das infecções sistêmicas causadas por *Candida* sp. Em ágar Sabouraud dextrose, *C. glabrata* forma colônias brilhantes, lisas e de cor creme, indistinguíveis das outras espécies de *Candida*, exceto por seu tamanho, que pode ser relativamente menor. Em meios de cultura cromogênicos, as colônias de *C. glabrata* podem aparecer brancas, púrpuras e, em relação às reações bioquímicas ela fermenta e assimila glicose e trealose (FIDEL, VAZQUEZ e SOBEL, 1999). Finalmente, em relação à parte genética, esta espécie tem genoma haploide, em contraste com o genoma diploide de *C. albicans* e de diversas outras CNAs (SILVA *et al.*, 2012; RODRIGUES, SILVA e HENRIQUES, 2014).

Limitação de nutrientes, resposta oxidativa, competição com outros microorganismos e a impossibilidade de gerar esporos resistentes são causas de stress, intrínsecas ou de origem ambiental, para *C. glabrata*. Em comparação a outras espécies de *Candida*, *C. glabrata* parece ser uma das mais robustas, podendo sobreviver em superfícies inanimadas por mais de 5 meses, enquanto a

viabilidade da *C. albicans* é limitada a 4 meses e as células de *C. parapsilosis* morrem após duas semanas. Para manterem-se viáveis fora do organismo do hospedeiro, as células demandam uma tolerância muito elevada ao stress (RODRIGUES, SILVA e HENRIQUES, 2014).

As células de *C. glabrata* são capazes de colonizar comensalmente a boca, esôfago, intestino, mucosa vaginal, mas pouco se sabe a respeito da sua interação com o hospedeiro e de seus mecanismos de defesa. Espera-se que o hospedeiro consiga suprimir a expressão de propriedades patogênicas, prevenindo a infecção (ROETZER, GABALDÓN e SCHÜLLER, 2011).

BIOFILMES

Décadas atrás, considerava-se que as leveduras contribuía passivamente para o estabelecimento de uma infecção fúngica. Consequentemente, uma fraqueza do organismo ou uma imunossupressão do hospedeiro eram os únicos mecanismos considerados responsáveis por estabelecer uma infecção oportunista (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012). Nos dias atuais, este conceito foi modificado e sabe-se que estes microorganismos participam de forma dinâmica na fisiopatologia do processo de instauração da doença, utilizando mecanismos de agressão chamados fatores e virulência. Como exemplos destes fatores estão a habilidade em aderir-se a superfícies, a capacidade de produzir enzimas hidrolíticas, como as fosfolipases, causadoras de danos aos tecidos, e a formação de biofilmes em tecidos do hospedeiro e em dispositivos médicos (D'ENFERT e JANBON, 2016).

Biofilmes são, por definição, comunidades sésseis caracterizadas por células aderidas irreversivelmente a um substrato, a uma interface ou umas às outras (COSTERTON, STEWART e GREENBERG, 1999). São envoltas por uma matriz extracelular de substâncias poliméricas e exibem um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e transcrição gênica. Fragmentos destas estruturas podem desprender-se de dispositivos médicos que estejam colonizados, passando a circular nos fluidos corporais e levando consigo todas as características de resistência de sua comunidade de origem (DONLAN e COSTERTON, 2002).

A formação do biofilme é constituída de várias etapas (figura 1). A aderência a superfícies (por exemplo, dispositivos médicos) mediada por proteínas da parede celular é a primeira fase da formação do biofilme. Mais tarde, durante a fase intermediária, ocorre a proliferação do microorganismo na superfície à qual está aderido, através do desenvolvimento de hifas e da formação da matriz de polissacarídeos, carboidratos, proteínas e outros componentes. Essa matriz tem a função de defender o microorganismo de células fagocíticas, manter nutrientes e servir como barreira contra a difusão de drogas e substâncias tóxicas. Na última fase, chamada de maturação, o biofilme está no seu estágio máximo de desenvolvimento. Algumas células desprendem-se da estrutura, penetram nos tecidos e alcançam a corrente sanguínea, assim disseminando-se pelo organismo do hospedeiro. Durante a formação e desenvolvimento dos biofilmes, as células coexistem e comunicam-se através de um mecanismo intercelular conhecido como “quorum sensing”, que modula o desenvolvimento e impede a dispersão de células (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012).

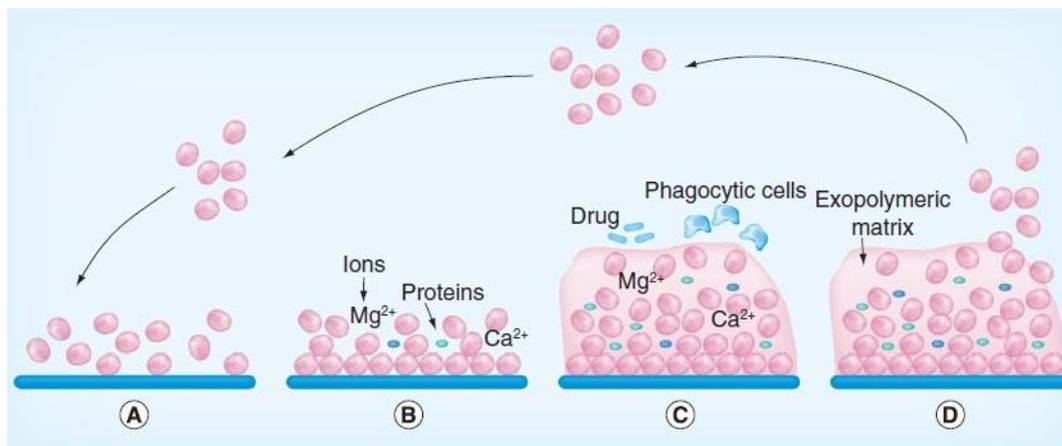


Figure 1. Phases of *Candida* biofilm formation on medical devices. (A) Adherence of *Candida* by cell wall proteins to inert material. **(B)** *Candida* starts to proliferate by forming a matrix of polysaccharides, carbohydrates, proteins and unknown components. **(C)** Growth continues, giving rise to the formation of mature biofilm, where *Candida* is protected from phagocytic cells, drugs and toxic substances. **(D)** Finally, some of the fungal cells break off and colonize tissues or other implanted devices of the host.

Figura 1: Etapas de formação de um biofilme. (FONTE: CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012).

Candida glabrata tem-se mostrado capaz de formar biofilmes em diferentes dispositivos médicos como catéteres vasculares e urinários e válvulas cardíacas, preferencialmente feitos de silicone. Intensas remodelações da parede celular e alterações nas propriedades físicas da superfície celular são alguns dos eventos

associados à formação de biofilme de *C. glabrata*. Não se sabe exatamente qual a composição da matriz extracelular do biofilme de *C. glabrata*, mas inclui proteínas e carboidratos, como β -1,3 glucanas (D'ENFERT e JANBON, 2016).

RESISTÊNCIA ATRIBUÍDA À FORMAÇÃO DE BIOFILME

A natureza da estrutura do biofilme e os atributos fisiológicos a ele conferidos, resultam em uma resistência inerente a agentes antimicrobianos, sendo estes antibióticos, desinfetantes ou germicidas (D'ENFERT e JANBON, 2016). Existem mecanismos responsáveis por essa resistência, dentre eles 1) penetração reduzida dos agentes antimicrobianos pela matriz do biofilme; 2) taxa de crescimento alterada dos organismos e 3) outras mudanças fisiológicas decorrentes do modo de crescimento do biofilme. Esta resistência impacta negativamente na saúde do paciente, uma vez que o dispositivo médico colonizado precisa ser retirado quando a infecção não responde adequadamente ao tratamento, podendo causar danos aos tecidos adjacentes (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012). Estima-se que 65 a 80% das infecções em humanos estejam relacionadas à formação de biofilmes, com grandes implicações na terapêutica dos pacientes. Como exemplos temos a fibrose cística, periodontite e infecções sistêmicas e do trato urinário em que estão presentes dispositivos médicos, como catéteres (DONLAN e COSTERTON, 2002; VITALI *et al.*, 2016).

Uma característica diferenciada do biofilme é a sua tolerância intrínseca aos antimicrobianos e resistência à resposta imune do hospedeiro. As células de biofilme podem sobreviver a concentrações até 1000 vezes maiores do que a concentração inibitória mínima (CIM) definida para as células planctônicas. Tolerância antimicrobiana deve ser diferenciada de resistência antimicrobiana, pois não é herdada geneticamente, envolvendo mecanismos alternativos como o sequestro de drogas pela matriz polimérica extracelular e a ocorrência de uma subpopulação de células chamadas persisters, que mantêm seu metabolismo em estado dormente. Biofilmes de *Candida* são especialmente resistentes aos azóis e à anfotericina B, mas sensíveis às equinocandinas (D'ENFERT e JANBON, 2016).

EQUINOCANDINAS

Infecções fúngicas invasivas são uma preocupação, principalmente para pacientes imunodeprimidos. Eles contam com uma alta taxa de mortalidade e o sucesso clínico depende da resposta à terapia antifúngica (ALEXANDER *et al.*, 2013). Infelizmente, as opções de tratamento são restritas, pois estão limitadas a apenas algumas classes de antifúngicos disponíveis. Para muitos pacientes, a classe das equinocandinas (micafungina, anidulafungina e caspofungina) é recomendada como primeira escolha no tratamento de candidíases invasivas e 60% dos pacientes com candidemia são tratados com essa classe de antifúngicos (EMRI *et al.*, 2013). Segundo diretrizes para o tratamento de sepse grave, publicadas por Salomão *et al.* (2011), pacientes com candidemia e não neutropênicos devem receber uma dose de ataque de fluconazol ou, preferencialmente, uma equinocandina se a infecção for causada por *C. glabrata*. À medida que a utilização das equinocandinas é ampliada, aumenta a falha terapêutica devido a organismos que se tornaram resistentes, principalmente entre espécies de *Candida* (PERLIN, 2015; WIEDERHOLD, 2016).

A primeira equinocandina a ser isolada foi a anidulafungina, em 1974, seguida da caspofungina, em 1989 e da micafungina, em 1990. Entretanto, somente em 2001 estes medicamentos foram aprovados para o uso em humanos, com a introdução da caspofungina no mercado, seguida pela micafungina, em 2005 e, finalmente, pela anidulafungina no ano de 2006. A anidulafungina é a única equinocandina não metabolizada pelo citocromo P450, mas sim por degradação química espontânea. Ao contrário da anfotericina B, não causa insuficiência renal e não são conhecidas interações importantes. (CORTÉS e RUSSI, 2011).

Em relação à estrutura química, as equinocandinas são um grupo de lipopeptídeos semi-sintéticos, produtos da fermentação de vários fungos. A micafungina deriva do fungo *Coleophoma empedri*, a anidulafungina do *Aspergillus nidulans* e a caspofungina é sintetizada a partir da *Glarea lozoyensis* (CORTÉS e RUSSI, 2011). Para entender seu mecanismo de ação é necessário tomar conhecimento de que, na maioria dos fungos, o esqueleto da parede celular é formado por dois polissacarídeos: 1,3-β-D-glucana e quitina, responsáveis pela

integridade estrutural e pela forma da célula. Esta estrutura é frequentemente rodeada por outros compostos polissacarídicos como manose, galactose e outros açúcares que podem estar ligados covalentemente às proteínas da parede da célula fúngica. A ausência de qualquer um desses polímeros geralmente é letal para os fungos patogênicos. Como consequência, as enzimas responsáveis pela síntese dos polissacarídeos da parede celular são alvos muito específicos para drogas antifúngicas (WALKER, GOW e MUNRO, 2010).

As equinocandinas têm como mecanismo de ação a inibição não-competitiva da enzima (1,3)- β -D-glucana sintase (GS), que é responsável pela produção de (1,3)- β -D-glucana, componente da parede celular fúngica. A inibição dessa enzima e a consequente redução da produção deste componente importante da parede celular torna o fungo vulnerável a estresses externos. GS é um complexo enzimático com pelo menos duas subunidades, Fksp e Rho1p. Fksp, codificada por três genes relacionados, FKS1, FKS2 e FKS3, é a subunidade catalítica e o alvo das equinocandinas. (GARCIA-EFFRON, PARK e PERLIN, 2011). Uma vez que as células dos mamíferos não possuem parede celular e enzimas homólogas, este alvo molecular é específico dos fungos. Deste modo, as interações medicamentosas e efeitos adversos associados com a anfotericina B e com os azóis, por causa da interação com enzimas do citocromo P450 e de ligações não específicas com colesterol, são evitadas (WIEDERHOLD, 2016).

RESISTÊNCIA DE *Candida glabrata* A EQUINOCANDINAS

A resistência à terapia com equinocandinas tem sido associada com substituições de aminoácidos devido a mutações nos genes FKS1 e FKS2 para *C. glabrata*. Essas mutações de ponto ocorrem em regiões altamente conservadas, chamadas de hot spots, em que trocas de aminoácidos levam a um decréscimo da potência das equinocandinas contra a enzima alvo. Como as equinocandinas atuam via inibição não-competitiva, estas mudanças nos aminoácidos não resultam em uma diminuição da afinidade da ligação do fármaco com a enzima, mas sim em um decréscimo da atividade da enzima GS (WIEDERHOLD, 2016)

Em 2008, o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) propôs pontos de corte para concentração inibitória mínima (CIM), sendo $CIM \leq 2\mu\text{g/mL}$ considerada para susceptibilidade a todas equinocandinas frente a todas espécies de *Candida*. O breakpoint para resistência não foi definido, pois naquele momento não havia relatos de resistência de isolados de *Candida* às equinocandinas. Com o passar do tempo, ficou claro que este ponto de corte poderia não identificar todos os isolados com resistência relacionada à falha terapêutica. Então, em 2012, o CLSI alterou a CIM da anidulafungina, tratando-se especificamente de *C. glabrata*, para $\leq 0,12\mu\text{g/mL}$ para ser considerada susceptível, assegurando uma máxima detecção de cepas com mutações em FKS (ALEXANDER *et al.*, 2013).

Elevados valores de CIM servem como um screening fenotípico sensível, mas não específico, para a presença de mutações em FKS clinicamente relevantes. A presença de CIM elevada e uma mutação característica em FKS estão correlacionados com resultados clínicos reduzidos. Alterações em FKS reduzem, em diferentes graus, a sensibilidade da enzima GS à inibição pelo fármaco e se manifestam fenotipicamente como mudanças de diferentes magnitudes nos valores de CIM (ALEXANDER *et al.*, 2013).

ANIDULAFUNGINA

Anidulafungina é uma equinocandina que tem ação fungicida contra muitas espécies de *Candida*, incluindo cepas resistentes aos azóis, e uma atividade melhor contra *C. glabrata* quando comparada à caspofungina (figura 2). Por causa de sua baixa biodisponibilidade oral, ela deve ser administrada via intravenosa. É excretada por via biliar e não é degradada por enzimas hepáticas. Como não interage com as enzimas do citocromo P450, não tem interações limitantes com outros medicamentos e, especialmente, não altera níveis sanguíneos de imunossupressores. O fluconazol também é um potente agente antifúngico contra espécies de *Candida*, pode ser administrado via oral e é relativamente seguro em doses baixas. Porém, interage potencialmente com ciclosporinas e tacrolimus, além de ser hepatotóxico e nefrotóxico em doses altas. Por esses motivos, dá-se preferência à anidulafungina como opção de tratamento (SGANGA *et al.*, 2012).

Diferentemente das outras equinocandinas, a anidulafungina pode ser administrada sem ajuste de dose em pacientes com qualquer nível de dano renal ou insuficiência hepática, além de não necessitar de ajuste de dose de outros medicamentos administrados concomitantemente. Estas propriedades fazem este medicamento particularmente ideal para pacientes com candidemia em unidades de terapia intensiva, pois tendem a apresentar disfunção de órgãos e estar em regimes de terapia multidrogas (MAYR, AIGNER e LASS-FLÖRL, 2011).

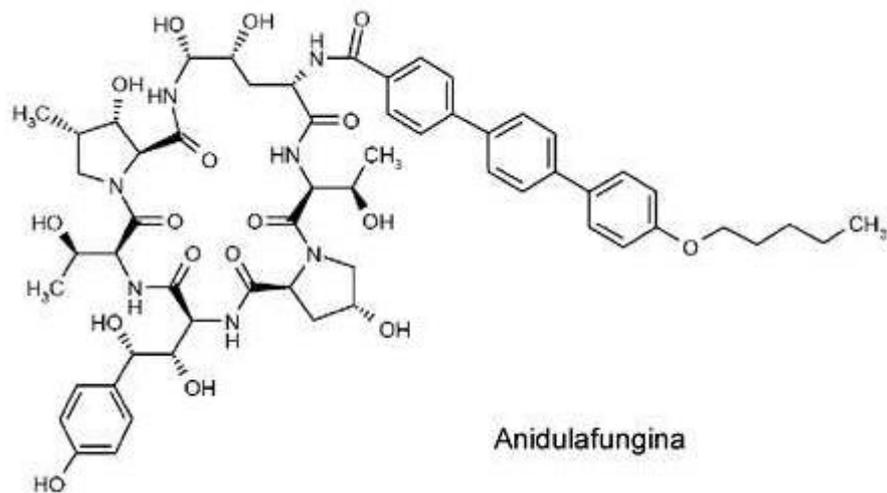


Figura 2: Estrutura química da anidulafungina.

RESISTÊNCIA CRUZADA COM FLUCONAZOL

Mesmo não havendo dados que comprovem a ocorrência de resistência cruzada entre azóis e equinocandinas, o intenso uso de equinocandinas na última década, incentivado pela ampla resistência aos azóis, tem promovido uma pressão de seleção para o desenvolvimento de resistência multidrogas (resistência a 2 ou mais classes de agentes antifúngicos) em *C. glabrata*. Estudos indicam que terapia prévia com azóis prediz resistência ao fluconazol e terapia prévia com equinocandinas prediz resistência ao fluconazol e a equinocandinas (ALEXANDER *et al.*, 2013).

Em um grande estudo de vigilância em 4 regiões metropolitanas dos Estados Unidos, envolvendo 80 hospitais e cerca de 1400 isolados, percebeu-se

que 32,9% dos isolados classificados como não-susceptíveis às equinocandinas eram, também, resistentes ao fluconazol. Em contraste, apenas 8,1% dos isolados susceptíveis a equinocandinas eram resistentes ao fluconazol (VALLABHANENI *et al.*, 2015).

A razão exata para o aumento de isolados de *C. glabrata* resistentes a azóis e equinocandinas é desconhecida. Pode ser porque os pacientes acometidos por candidíases invasivas são expostos a múltiplos antifúngicos por terem outras comorbidades que os colocam em risco para infecções invasivas fúngicas. O genoma haploide de *C. glabrata* também torna esta espécie mais susceptível ao desenvolvimento de resistência (WIEDERHOLD, 2016).

A observação do aumento da resistência multidrogas em isolados de *C. glabrata* é clinicamente preocupante devido às opções limitadas de tratamento disponíveis para o tratamento de infecções invasivas causadas por estes isolados. Pacientes com infecções causadas por isolados resistentes tanto a equinocandinas, quanto a azóis precisam ser tratados com uma formulação de anfotericina B, de toxicidade elevada, principalmente a pacientes de idade avançada ou com comorbidades múltiplas (WIEDERHOLD, 2016).

CAPÍTULO 1. Artigo

A ser submetido

INTRODUÇÃO

A resistência às equinocandinas entre as espécies de *Candida* é considerada incomum, com exceção de *C. glabrata*. Esta levedura tem uma menor susceptibilidade relatada e relacionada a alguns sítios clínicos, frequentemente associada à resistência aos azóis. Existem fatores ligados ao hospedeiro que podem facilitar essa resistência, dentre eles a formação de biofilmes em superfícies bióticas e abióticas e o uso crescente de profilaxia com equinocandinas (PERLIN, 2015).

Este capítulo trata da indução de resistência à anidulafungina em células planctônicas e sésseis de isolados de *Candida glabrata* sensíveis e o desenvolvimento de resistência cruzada com fluconazol.

É apresentado na forma de artigo a ser submetido para publicação no periódico *Current Microbiology*.

Multidrug resistant *Candida glabrata* strains obtained by inducing anidulafungin resistance in planktonic and biofilm cells

Camila Hatwig¹, Eduardo A. Balbuena¹, Vanessa Z. Bergamo^{1,2}, Bruna Pippi^{1,2}, Alexandre M. Fuentefria^{1,2}

¹ Laboratory of Applied Mycology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, Brazil

² Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, Brazil

CORRESPONDING AUTHOR

Alexandre M. Fuentefria

Laboratory of Applied Mycology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil.

E-mail: alexandre.fuentefria@ufrgs.br

ABSTRACT

Candida glabrata, usually commensal, has emerged as a common cause of serious threatening fungal infections. This yeast is able to colonize host tissues as well as abiotic surfaces (catheters, prostheses) where it develops a multi-layer growth characterized as biofilm. Given the increasing resistance to azoles, the recent guidance is to use echinocandins as the first choice for the treatment of systemic infections by *C. glabrata*. However, *C. glabrata* is the first species of *Candida* that has been detected with significant resistance to echinocandins. This study presents an *in vitro* induction of resistance to anidulafungin in planktonic and sessile cells of seven sensitive *C. glabrata* strains and also the development of cross-resistance with fluconazole. The resistance induction test resulted in strains strongly resistant to anidulafungin, with minimum inhibitory concentrations ranging from 1 to 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Prior to induction of resistance, the planktonic and sessile forms of the strains were all sensitive or sensitive dose-dependent to fluconazole. However, after the induction of resistance to anidulafungin, the sensitivity to fluconazole was not maintained, because the strains became resistant to it.

KEYWORDS

Candida glabrata; biofilm; anidulafungin; cross-resistance; fluconazole

INTRODUCTION

In the last decades, the frequency of invasive yeast infections has increased significantly due to the rise of the number of patients with immunosuppressive therapy, the use of broad spectrum antimicrobials and the increasing frequency of organ transplants [24]. Systemic infections caused by *Candida glabrata* are characterized by a high mortality rate and are difficult to treat due to the reduced susceptibility to azole antifungals, especially fluconazole [12, 16, 23]. This yeast is able to colonize host tissues as well as abiotic surfaces (catheters, prostheses) where it develops a multi-layer growth characterized as biofilm [12].

Biofilms are described as communities of microorganisms adhered to a surface and embedded in a polymeric extracellular matrix [7]. It is known that this is the most prevalent form of growth of the microorganisms in the environment which they live. Biofilm formation is an important virulence factor for *Candida* species. It confers significant resistance to antifungal therapy by limiting the penetration of substances by the matrix and protecting the cells against the immune response of the host [17].

Considering the importance of invasive mycoses and their current epidemiology, it is necessary multiple therapeutic strategies. A few years ago therapeutic management was performed with azoles and amphotericin B. However, given the increasing resistance to azoles, mainly by species of *Candida non-albicans* and renal toxicity of amphotericin B, a new pharmacological group - the echinocandins - emerged as a new therapeutic option [20].

Echinocandins inhibit the 1,3- β -D-glucan synthase (GS) complex that catalyzes the biosynthesis of 1,3- β -D-glucan, the main glucan component of the fungal cell wall. GS is an enzyme complex with at least two subunits, Fksp and Rho1p. Fksp, encoded by three related genes, FKS1, FKS2 and FKS3, is the catalytic subunit and is the target of echinocandins. Resistance to these antifungal agents, which results in therapeutic failure, has been linked to mutations in the Fksp subunit of GS [22].

Recently, yeast *Candida glabrata*, usually commensal, has emerged as a common cause of serious fungal infections that are life threatening. This is largely due to their low susceptibility to azole antifungals which are widely used in the

treatment of these infections. Consequently, the recent guidance indicates the use of echinocandins as the first choice drug for the treatment of systemic infections by *C. glabrata*. Alarmingly, *C. glabrata* is the first species of *Candida* that has been detected with significant resistance to echinocandins [24].

Fluconazole resistant isolates of *C. glabrata* have an increased likelihood of being resistant to echinocandins and vice versa. *Candida glabrata* is able to create point mutations, as well as changes in the chromosome structure, which may be related to mechanisms of adaptation to environmental changes. These genomic modifications may be a consequence of defense-mechanism which makes this fungus rapidly resistant to multiple drugs after limited exposure to the drug. For *C. glabrata* resistant to azoles and echinocandins, the only remaining antifungal agent available is amphotericin B. This is very worrying as the frequency of infections increases with the age of the population and amphotericin B is not very well tolerated by elderly patients [25].

In the present study, we induced *in vitro* resistance to anidulafungin in planktonic and sessile cells of sensitive *C. glabrata* strains and checked the development of cross-resistance with fluconazole.

MATERIALS AND METHODS

Fungal strains

Twenty one clinical strains of *Candida glabrata* (RL37m, RL03m, RL09m, RL02, RL03, HCCG01, CG08, RL09, CG06, CG03, CG04, CG40039, RL12, CG18S, RL22, RL24, RL25, RL26, RL45, RL49 and RL51) belonging to the micology collection of the Applied Mycology Laboratory of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil, were used in this study. In some tests, the characterized clinical isolate CG40039 was included as control.

Antifungal compounds

Stock solutions of anidulafungin (Ecalta®, Pfizer, São Paulo, Brazil) and fluconazole (Cristália®, São Paulo, Brazil) were prepared in sterile distilled water. For the experiments, antifungal agents were diluted with RPMI 1640.

Biofilm formation assay on tracheal catheter material

The applied methodology is an adaptation of the literature [15, 26]. Initially, the strains were cultured on Sabouraud agar for 24h at 35°C. Seven young colonies were added to 2mL of TSB and incubated for 24h at 35°C. 1 x 1 cm² polyvinyl polychloride (PVC, Mark Med, number 12) catheter fragments were added to 9mL of peptone water containing 1mL of standardized inoculum in TSB and incubated for 96h at 35°C. After the incubation period, the catheter fragments were washed three times with peptone water to remove poorly adhered cells. Catheter fragments were added to other flasks with 50mL of peptone water, and the adhered cells were released from the catheter by sonication at 40KHz for 10min. The water resulting from the sonication was diluted (dilution factor 10) allowing the determination of Colony Forming Units (CFU) and 20µL of each dilution were plated on Sabouraud agar. Plates were incubated for 24 h at 35°C and values of CFU cm⁻² were determined. All counts were performed in triplicate. The best biofilm forming strains cells obtained with this test were cultivated on Sabouraud agar and stored for further use.

Planktonic and sessile minimum inhibitory concentration (MIC)

MIC values of the planktonic and sessile cells of *C. glabrata* were determined in microplates by broth microdilution method as proposed by CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), according to protocol M27-A3 [4], taking into account the updates of document M27-S4 [5], with modifications. The antifungal was tested at concentrations of 0.0075 to 4.0 µg mL⁻¹.

Induction of resistance to anidulafungin in planktonic and sessile cells and evaluation of its stability

This test was performed exposing the strains to increasing concentrations of antifungal, as described by Fekete-Forgacs et al [8], with modifications.

One colony of each *C. glabrata* strain, originally anidulafungin sensitive, was incubated in 10 mL RPMI 1640 containing 4% glucose for 24 h at 35°C. After centrifugation, the supernatant was discarded, leaving only the yeast cells in the vials. RPMI 1640 was added until reaching a final absorbance of 0.1 ($\lambda = 640$ nm). After 10 h of incubation, the material was centrifuged, the supernatant was discarded and 10 mL of anidulafungin diluted in RPMI at the desired concentration (MIC/8) was added. After 14 h of incubation, the previous procedure was repeated three consecutive times, but with a 24 h incubation interval. After the third incubation, 20 μ L of each culture was grown on Sabouraud agar for 24 h. A sample of cells was subcultured for MIC determination and saved for further testing. After another centrifugation and discard of the supernatant, the antifungal was added at the MIC/8 concentration until reach the final absorbance of 0.1. After 10 h of incubation, the culture was centrifuged again, the supernatant discarded. Then, 10 mL of the desired concentration of anidulafungin (MIC/4) were added and incubated for 14 h as described above. The experiment was repeated, doubling the concentration of anidulafungin until reach the final concentration of 0.25 μ g mL⁻¹ for all strains.

Fluconazole cross-resistance detection

Fluconazole cross-resistance was assessed by MIC determination of anidulafungin resistant strains and compared to MIC prior to induction of resistance.

RESULTS

Screening for identification of optimum biofilm formation on tracheal cateter material, reveled seven outstanding biofilm-forming strains which were selected to follow the induction experiments of resistance to anidulafungin (table 1). These strains were chosen based on the colony count results (CFU cm⁻² and log).

Table 1: *C. glabrata* biofilm forming strains.

<i>Candida glabrata</i> Strain	Colony count (CFU cm ⁻²)	Colony count (log)
RL 37m	1,5x10 ⁴	4,1
RL 03m	2,2x10 ⁴	4,3
RL 09m	7,5x10⁴	4,8
RL 02	0,2x10 ⁴	3,2
RL 03	0,2x10 ⁴	3,2
HCCG 01	1,5x10 ⁴	4,1
CG 08	1,5x10 ⁴	4,1
RL 09	1,5x10 ⁴	4,1
CG 06	0,2x10 ⁴	3,2
CG 03	0,2x10 ⁴	3,2
CG 04	0,2x10 ⁴	3,2
CG 40039	7,5x10⁴	4,8
RL 12	12,5x10⁴	5,1
CG 18S	12,5x10⁴	5,1
RL 22	7,5x10⁴	4,8
RL 24	0,7x10 ⁴	3,8
RL 25	4,0x10⁴	4,6
RL 26	3,5x10⁴	4,5
RL 45	1,5x10 ⁴	4,1
RL 49	2,2x10 ⁴	4,3
RL 51	1,5x10 ⁴	4,1

MIC values of the planktonic and sessile cells of *C. glabrata*, determined by broth microdilution method as proposed by the CLSI, are described in table 2. MICs ranged from <0.0075 to 0.03 µg mL⁻¹ to planktonic cells, and 0.015 to 0.06 µg mL⁻¹ to sessile cells.

Table 2: Minimum inhibitory concentration (MIC) of anidulafungin against planktonic and sessile cells of *C. glabrata*.

<i>Candida glabrata</i> strain	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	Planktonic cells	Sessile cells
RL 12	0.03	0.03
CG 18S	< 0.0075	0.06
CG 40039	0.03	0.03
RL 09m	0.015	0.03
RL 22	< 0.0075	0.015
RL 25	0.015	0.03
RL 26	< 0.0075	0.03

Following the induction of anidulafungin resistance against the sessile and planktonic forms of *C. glabrata* strains, MICs were determined again. It was observed that six out seven strains tested (86%) acquired strong resistance to anidulafungin (table 3). It was not observed differences between MICs of the biofilm and planktonic cells after induction of resistance, which was verified previously this test.

Table 3: MIC of sessile and planktonic cells of *C. glabrata* before and after induction of resistance to anidulafungin.

<i>Candida glabrata</i> strain	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	Planktonic cells	Resistant planktonic cells	Sessile cells	Resistant sessile cells
RL 12	0.03	1.0	0.03	1.0
CG 18S	< 0.0075	2.0	0.06	2.0
CG 40039	0.03	2.0	0.03	2.0
RL 09m	0.015	0.03	0.03	0.03
RL 22	< 0.0075	2.0	0.015	2.0
RL 25	0.015	2.0	0.03	2.0
RL 26	< 0.0075	2.0	0.03	2.0

After 30 days subcultivating the resistant strains, MICs were determined and the resistance were maintained for six strains.

The occurrence of cross-resistance with fluconazole was determined by performing MIC of this antifungal with the strains obtained by induction of resistance to anidulafungin. For comparative purposes, MIC of fluconazole with the anidulafungin-sensitive strains was previously performed (table 4).

Table 4: Comparison between fluconazole MIC of planktonic and sessile forms of *C. glabrata* strains before and after induction of resistance to anidulafungin.

<i>Candida glabrata</i> strain	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	Resistant planktonic cells	Planktonic cells control	Resistant sessile cells	Sessile cells control
CG40039	>64	16	>64	16
RL12	>64	32	>64	8
RL09m	64	32	>64	4
RL22	>64	1	>64	32
RL25	>64	32	>64	32
RL26	>64	4	>64	4
CG18S	>64	4	>64	4

DISCUSSION

According to protocol M27-A3 [4] and taking into account the updates of document M27-S4 [5], an isolate is considered susceptible to anidulafungin if its MIC is $\leq 0.12 \mu\text{g mL}^{-1}$. All selected strains were sensitive to the antifungal tested, both in their planktonic and sessile forms (table 2), as found by Pfaller et al. (2013). They showed that only 3.8% of the isolates of *C. glabrata* obtained from the Asian region had resistance to anidulafungin, whereas none of the isolates obtained in Latin America had resistance to this antifungal [18, 19]. The sessile form of the strains was less or equally sensitive to anidulafungin when compared to the planktonic form (table 2). This result is in agreement with that published by Kucharikova et al. (2011) suggesting that *Candida glabrata* biofilms formed in vitro or in animal models demonstrate to be resistant to azoles, but sensitive to echinocandins and lipid formulations of amphotericin B [13].

The induction of resistance test resulted in strains strongly resistant to anidulafungin, with MICs ranging from 1 to 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (table 3). Bordallo-Cardona et al. also obtained resistant *C. glabrata* strains after *in vitro* exposure to increasing concentrations of micafungin and anidulafungin. In their experiment, the authors used Sabouraud agar plates containing the desired antifungal concentrations, obtaining MICs ranging from 0.06 to 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for micafungin and 1 to 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for anidulafungin [2].

As a final result of induction of resistance, a larger MIC was expected for sessile cells compared to planktonic cells, but was not observed in the experiments (table 3). It is known that biofilm cells have antimicrobial resistance characteristics and can withstand drug concentrations 1000 times greater than MIC determined for planktonic cells [6]. It was verified that both biofilm and planktonic cells obtained the same final MIC, not maintaining their susceptibility characteristics prior to the induction of resistance.

In order to analyze the stability of the resistance developed, the strains were harvested for 30 consecutive days in antifungal free Sabouraud agar. The result obtained was the maintenance of the resistance in all tested strains. In a study published by Pippi et al. (2015), resistance loss was demonstrated in 60% of the *C. glabrata* isolates tested, differently from our experiments, but the antifungal used was fluconazole [21]. Previously, Borst et al. (2005) demonstrated maintenance of acquired resistance to fluconazole in strains of *C. glabrata* for at least 4 months after removal of antifungal [3]. This result is clinically relevant and worrying because once resistant, these cells will continue to express resistance genes for a long period. Treatment with the antifungal becomes ineffective and a second therapeutic choice is necessary. In addition, there is a risk of transmission of these isolates already resistant to other patients, further limiting the therapeutic options.

Morphological changes (phenotypic switching) were observed in resistant *C. glabrata* strains. Phenotypic switching enables micro-organisms to undergo rapid microevolution and to adapt to a constantly changing microenvironment. It also facilitates pathoadaptation in the host [10]. Like *C. albicans*, *C. glabrata* is capable of expressing different cellular phenotypes in colonizing populations, amongst them the phenotype irregular wrinkle [14]. In *C. albicans*, this effect was

correlated to high levels of antifungal resistance, indicating that morphological change may have an effect on drug sensitivity [28].

According to the CLSI, it is considered resistant to fluconazole, the *C. glabrata* strain that obtained $\text{MIC} \geq 64 \mu\text{g mL}^{-1}$; sensitive dose-dependent when the MIC is between 16 and $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ and sensitive when the MIC is $\leq 8 \mu\text{g mL}^{-1}$. It was observed that, prior to induction of resistance, the planktonic and sessile forms of the strains were all sensitive or sensitive dose-dependent to fluconazole, with MICs ranging from 1 to $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ (table 4). Interestingly, after the induction of resistance to anidulafungin, this sensitivity to fluconazole was not maintained, making the strains resistant to this antifungal.

Resistance to fluconazole has been associated with non-susceptibility to echinocandins in many studies [18, 19]. This resistance is the result of overexpression of efflux pumps, but is not involved in echinocandin resistance. *C. glabrata* has a unique ability to sequentially acquire and express mutations responsible for conferring resistance. It is possible that previous treatments with fluconazole exert a selective pressure resulting in changes in the genome of the pathogen even in the absence of evident resistance to fluconazole. These organisms may persist as colonizers in patients and, with subsequent exposure to antifungal agents, emerge as resistant to echinocandins [27]. In our study, the opposite was observed: the emergence of fluconazole-resistant strains after previous exposure to anidulafungin. This finding is in agreement with Alexander et al. (2013), who suggests that previous therapy with azoles predicts resistance to fluconazole and previous therapy with echinocandins predicts resistance to fluconazole and echinocandins [1].

In conclusion, all *C. glabrata* strains were susceptible to anidulafungin, both in planktonic and sessile forms. However, in all strains, the sessile form had a slightly reduced susceptibility when compared to planktonic form. The strains submitted to resistance induction test became strongly resistant to anidulafungin. All of the anidulafungin sensitive *C. glabrata* strains were sensitive or sensitive dose-dependent to fluconazole. After induction of resistance, they became resistant to fluconazole, with MICs $> 64 \mu\text{g / mL}$, corroborating with reports of cross-resistance between the classes of azoles and echinocandins. Clinically, this cross-

resistance could lead to therapeutic failure when using fluconazole in patients previously exposed to sub-inhibitory concentrations of anidulafungin for long periods.

In future studies, the presence of mutations in FKS, responsible for the drastic decrease in the susceptibility of *C. glabrata* strains to anidulafungin will be evaluated and results presented in the due time.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Brazilian agency Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support.

CONFLICT OF INTEREST

No conflict of interest is declared.

REFERENCES

1. ALEXANDER BD, JOHNSON MD, PFEIFFER CD, JIMENEZ-ORTIGOSA C, CATANIA J, BOOKER R, CASTANHEIRA M, MESSER SA, PERLIN DS, PFALLER MA (2013) Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. Clin Infect Dis 56:1724-1732
2. BORDALLO-CARDONA MA, ESCRIBANO P, PEDROSA EGG, MARCOS-ZAMBRANO LJ, CANTON R, BOUZA E, GUINEA J (2016) *In vitro* exposure to increasing micafungin concentrations easily promotes echinocandin resistance in *Candida glabrata* isolates. Antimicrob Agents Chemoter doi:10.1128/AAC.01542-16
3. BORST A, RAIMER MT, WARNOCK DW, MORRISON CJ, ARTHINGTON-SKAGGS BA (2005) Rapid acquisition of stable azole resistance by *Candida glabrata* isolates obtained before the clinical introduction of fluconazole. Antimicrob Agents Chemother 49:783-787
4. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Third Informational. Supplement M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
5. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI Document M27-S4. CLSI, Wayne, PA, USA, 2013
6. D'ENFERT C, JANBON G (2016) Biofilm formation in *Candida glabrata*: what have we learnt from functional genomics approaches? FEMS Yeast Res 16:1-13

7. DONLAN RM, COSTERTON JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167-193
8. FEKETE-FORGACS K, GYURE L, LENKEY B (2000) Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses* 43:273-279
9. GARCIA-EFFRON G, PARK S, PERLIN DS (2011) Improved detection of *Candida* sp. *Fks* hot spot mutants by using the method of the CLSI M27-A3 document with the addition of bovine sérum albumin. *Antimicrob Agents Chemoter* 55:2245-2255
10. JAIN N, HASAN F, FRIES BC (2008) Phenotypic Switching in Fungi. *Curr Fungal Infect Rep* doi:10.1007/s12281-008-0026-y
11. KAM AP, XU J (2002) Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. *Diagn Microbiol Infect Dis* 43:19-28
12. KATIYAR SK, ALASTRUEY-IZQUIERDO A, HEALEY K, JOHNSON M, PERLIN D, EDLIND T (2012) *Fks1* and *Fks2* are functionally redundant but differentially regulated in *Candida glabrata*: implications for echinocandin resistance. *Antimicrob Agents Chemoter* 56:6304-6309
13. KUCHARIKOVA S, TOURNU H, LAGROU K, VAN DIJCK P, BUJAKOVA H (2011) Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under diferente conditions and their susceptibility to caspofungin na anidulafungin. *J Med Microbiol* 60:1261-1269
14. LACHKE AS, JOLY S, DANIELS K, SOLL DR (2002) Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. *Microbiol Res* 148:2661-2674
15. MALHEIROS PS, PASSOS CT, CASARIN LS, SERRAGLIO L, TONDO EC (2010) Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from

poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. *Food Control* 21: 298–301.

16. McCORNACK PL, PERRY CM (2005) Caspofungin: a review of its use in the treatment of fungal infections. *Drugs* 65:2049-2068
17. MUKHERJEE PK, CHANDRA J (2004) *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat* 7:301-309
18. PFALLER MA, CASTANHEIRA M, LOCKHART AM, AHLQUIST AM, MESSER SA, JONES RN (2012) Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* doi:10.1128/JCM.06112-11
19. PFALLER MA, MESSER SA, WOOSLEY LN, JONES RN, CASTANHEIRA M (2013) Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends to antifungal resistance. *J Clin Microbiol* 51:2571-2581
20. PHAM CD, IQBAL N, BOLDEN C, KUYKENDALL R, HARRISON L, FARLEY M, SCHAFFNER W, BELDAVS Z, CHILLER T, PARK B, CLEVELAND A, LOCKHART S (2014) Role of FKS Mutations in *Candida glabrata*: MIC Values, Echinocandin Resistance, and Multidrug Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 58:4690-4696
21. PIPPI B, LANA AJD, MORAES RC, GÜEZ CM, MACHADO M, OLIVEIRA LFS, VON POSER GL, FUENTEFRIA AM (2014) *In vitro* evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* sp. *J Appl Microbiol* 118:839-850
22. RIERA M, MOGENSEN E, D'ENFERT C, JANBON G (2012) New regulators of biofilm development in *Candida glabrata*. *Res Microbiol* 163:297-307

23. RODRIGUES C, SILVA S, HENRIQUES M (2014) *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 33: 673-688
24. SILVA S, NEGRI M, HENRIQUES M, OLIVEIRA R, WILLIAMS D, AZEREDO J (2012) *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev 36:288-305
25. SPREGHINI E, ORLANDO F, SANGUINETTI M, POSTERARO B, GIANINNI D, MANSO E (2012) Comparative Effects of Micafungin, Caspofungin, and Anidulafungin against a Difficult-To-Treat Fungal Opportunistic Pathogen, *Candida glabrata*. Antimicrob Agents Chemoter 56:1215-1222
26. TONDO EC, MACHADO TRM, MALHEIROS PS, PADRÃO DK, DE CARVALHO AL, BRANDELLI A (2010) Adhesion and biocides inactivation of salmonella on stainless steel and polyethylene. Braz J Microbiol 41:1027–1037
27. VALLABHANENI S, CLEVELAND AA, FARLEY MM, HARRISON LH, SCHAFFNER W, BELDAVS ZG, DERADO G PHAM CD, LOCKHART SR, SMITH RM (2015) Epidemiology and risk factors for echinocandin nonsusceptible *Candida glabrata* bloodstream infections: data from a large multisite population-based candidemia surveillance program, 2008–2014. Open Forum Infect Dis doi: 10.1093/ofid/ofv163
28. VARGAS K, MESSER SA, PFALLER M, LOCKHART SR, STAPLETON JT, HELLSTEIN J, SOLL DR (2000) Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode. J Clin Microbiol 38:3595-3607

DISCUSSÃO GERAL

A presente dissertação foi desenvolvida tendo como referência os relatos de aumento de casos de resistência da levedura *Candida glabrata* frente à classe de antifúngicos das equinocandinas, em especial, à anidulafungina. Além disso, muitos estudos têm concluído que, quando em sua forma séssil (biofilme), *C. glabrata*, assim como as outras espécies de *Candida*, demonstram uma maior resistência aos antifúngicos quando comparada à sua forma planctônica.

C. glabrata é um importante patógeno fúngico humano que causa infecções com risco de vida e representa um desafio para as opções terapêuticas antifúngicas devido à sua susceptibilidade reduzida aos azóis e à capacidade de desenvolver resistência a ambos azóis e equinocandinas. Resistência às equinocandinas, em *C. glabrata*, é geralmente causada pela aquisição de mutações de ponto em regiões do gene FKS que codifica a enzima 1,3- β -D-glucana sintase (GS), o alvo da classe de equinocandinas. Além disso, acredita-se que a natureza haplóide de *C. glabrata* a torna particularmente apta a adquirir mutações relacionadas à resistência (KATIYAR *et al.*, 2012; CASTANHEIRA *et al.*, 2014).

Pfaller *et al.* mostrou em seu estudo que apenas 3,8% dos isolado de *C. glabrata* obtidos da região asiática apresentavam resistência à anidulafungina, enquanto que, dos isolados obtidos na América Latina, nenhum apresentava resistência a esse antifúngico (PFALLER *et al.*, 2013). Segundo o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008) e, levando em consideração as atualizações do documento M27-S4 (CLSI, 2013), um isolado é considerado sensível à anidulafungina se a sua CIM for $\leq 0,12\mu\text{g/mL}$. Todas as cepas selecionadas foram sensíveis ao antifúngico testado, tanto em sua forma planctônica, quanto na séssil. A forma séssil das cepas foi menos ou igualmente sensível à anidulafungina quando comparada à forma planctônica. Este resultado está de acordo com o publicado por Kucharikova *et al.* sugerindo que biofilmes de *C. glabrata* formados *in vitro* ou em modelos animais demonstram ser resistentes aos azóis, mas sensíveis às equinocandinas e a formulações lipídicas de anfotericina B (KUCHARIKOVA *et al.*, 2011).

O teste de indução de resistência resultou em cepas fortemente resistentes à anidulafungina, tendo CIMs variando entre 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$. Bordallo-Cardona *et al.* também obteve isolados de *C. glabrata* resistentes após a exposição *in vitro* a

concentrações crescentes de micafungina e anidulafungina. Em seu experimento, utilizou placas de ágar Sabouraud contendo as concentrações desejadas do antifúngico, obtendo CIMs que variaram de 0,06 a 4 µg/mL para a micafungina, e de 1 a 4 µg/mL para anidulafungina (BORDALLO-CARDONA *et al.*, 2016).

Como resultado final da indução de resistência, era esperada uma CIM maior para as células sésseis em comparação às planctônicas, mas não foi o observado nos experimentos. Sabe-se que as células de biofilme têm características de resistência aos antimicrobianos, podendo suportar concentrações de fármacos 1000 vezes maiores que a CIM determinada para células planctônicas (SILVA *et al.*, 2012). Verificou-se que tanto as células de biofilme quanto as planctônicas obtiveram a mesma CIM final, não mantendo suas características de susceptibilidade prévias à indução de resistência.

A fim de analisar a estabilidade da resistência desenvolvida, as cepas foram repicadas por 30 dias consecutivos em ágar Sabouraud livre de antifúngico. O resultado obtido foi a manutenção da resistência em todas as cepas testadas. Em estudo publicado por Pippi *et al.*, foi demonstrada a perda de resistência em 60% dos isolados de *C. glabrata* testados, diferentemente do ocorrido em nossos experimentos, porém o antifúngico utilizado foi o fluconazol (PIPPI *et al.*, 2015). Este resultado é clinicamente relevante e preocupante, pois uma vez resistentes, estas células continuarão a expressar genes de resistência por um longo período. O tratamento com o antifúngico torna-se ineficaz e uma segunda escolha terapêutica faz-se necessária. Além disso, existe o risco de transmissão destes isolados já resistentes a outros pacientes, limitando ainda mais as opções terapêuticas.

Mudanças morfológicas (phenotypic switching) foram observadas nas cepas de *C. glabrata* resistentes. Em *C. albicans*, esse efeito foi correlacionado a altos níveis de resistência a antifúngicos, indicando que a mudança morfológica pode ter um efeito na sensibilidade aos fármacos (VARGAS *et al.*, 2000).

De acordo com o CLSI, é considerado resistente ao fluconazol, o isolado de *C. glabrata* que obtiver MIC $\geq 64\mu\text{g/mL}$; sensível dose-dependente quando o MIC estiver entre 16 e 32 µg/mL e sensível quando o MIC for $\leq 8\mu\text{g/mL}$. Observou-se que, anteriormente à indução de resistência, as formas planctônica e séssil das

cepas eram todas sensíveis ou sensíveis dose-dependente ao fluconazol, tendo MICs variando entre 1 e 32 µg/mL. Curiosamente, após a indução de resistência à anidulafungina, esta sensibilidade ao fluconazol não se manteve, tornando as cepas resistentes ao antifúngico.

A resistência ao fluconazol tem sido associada com a não-susceptibilidade às equinocandinas em muitos estudos. É possível que tratamentos prévios com fluconazol exerçam uma pressão seletiva, resultando em mudanças no genoma do patógeno mesmo na ausência de resistência evidente ao fluconazol. Estes organismos podem persistir como colonizadores em pacientes e, com uma posterior exposição a antifúngicos, emergem como resistentes a equinocandinas (VALLABHANENI *et al.*, 2015). Em nosso estudo, observou-se o contrário: o surgimento de cepas resistentes ao fluconazol após exposição prévia à anidulafungina. Este achado está de acordo com Alexander *et al.*, que sugere que terapia prévia com azóis prediz resistência ao fluconazol e terapia prévia com equinocandinas prediz resistência ao fluconazol e a equinocandinas (ALEXANDER *et al.*, 2013).

CONCLUSÕES GERAIS

- Todas as cepas de *C. glabrata* testadas foram susceptíveis à anidulafungina, tanto em sua forma planctônica quanto na séssil. Porém, a forma séssil teve uma susceptibilidade levemente reduzida, em relação à planctônica, em todas as cepas.
- As cepas submetidas ao teste de indução de resistência tornaram-se fortemente resistentes à anidulafungina.
- Em sua totalidade, as cepas de *C. glabrata* sensíveis à anidulafungina eram sensíveis ou sensíveis dose-dependente ao fluconazol. Após a indução de resistência, tornaram-se resistentes, com CIMs >64 µg/mL, corroborando com os relatos de existência de resistência cruzada entre as classes dos azóis e equinocandinas. Clinicamente, esta resistência cruzada poderia implicar em falha terapêutica ao utilizar o fluconazol em pacientes previamente expostos a concentrações sub-inibitórias de anidulafungina por longos períodos.
- O teste de indução de resistência *in vitro* poderia ser uma ferramenta de estudo das possíveis mutações causadoras de resistência em *Candida glabrata*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BEYDA, N. D. *et al.* FKS Mutant *Candida glabrata*: Risk Factors and Outcomes in Patients with Candidemia. *Clinical Infectious Diseases*, v. 59, p. 819-825, 2014.

BORDALLO-CARDONA, M. A. *et al.* *In vitro* exposure to increasing micafungin concentrations easily promotes echinocandin resistance in *Candida glabrata* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016 doi:10.1128/AAC.01542-16

CASTANHEIRA, M. *et al.* Frequency of fks mutations among *Candida glabrata* isolates from a 10-year global collection of bloodstream infection isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 1, p. 577-580, 2014.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Third Informational. Supplement M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI Document M27-S4. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012.

COLOMBO, A. L. *et al.* Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. *Intensive Care Medicine*, v. 40, p. 1489-1498, 2014.

CORTÉS, J. A. L.; RUSSI, J. A. N. Equinocandinas. *Revista Chilena de Infectología*, v. 26, p. 529-536, 2011.

COSTERTON, J. W.; STEWART P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistente infections. *Science*, v. 248, p. 1318-1322, 1999.

CUÉLLAR-CRUZ, M. *et al.* *Candida* species: new insights into biofilm formation. *Future Microbiology*, v. 7, n. 6, p. 755-771, 2012.

CUÉLLAR-CRUZ, M. *et al.* The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 31, p. 2513-2527, 2012.

D'ENFERT, C.; JANBON, G. Biofilm formation in *Candida glabrata*: what have we learnt from functional genomic approaches? *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research*, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2016.

DOI, A. M. *et al.* Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a brazilian national surveillance program. *PLoS ONE*, v. 11, p. 1-9, 2016.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

EMRI, T. *et al.* Echinocandins: production and applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 97, p. 3267-3284, 2013.

FEKETE-FORGACS, K.; GYURE, L.; LENKEY, B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses*, v. 43, p. 273-279, 2000.

FIDEL, P.R.; VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Review*, v. 12, p. 80-96, 1999.

GARCIA-EFFRON, G. *et al.* Novel FKS Mutation Associated with Echinocandin Resistance in *Candida* Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, p. 2225-2227, 2010.

GARCIA-EFFRON, G.; PARK, S.; PERLIN, D. S. Improved detection of *Candida* sp. Fks hot spot mutants by using the method of the CLSI M27-A3 document with the addition of bovine serum albumin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 2245-2255, 2011.

KAM, A. P.; XU J. Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.43, p. 19-28, 2002.

KATIYAR, S. K. *et al.* Fks1 and Fks2 are functionally redundant but differentially regulated in *Candida glabrata*: implications for echinocandin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, p. 6304-6309, 2012.

KUCHARIKOVA, S. *et al.* Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. *Journal of Medical Microbiology*, v. 60, p. 1261-1269, 2011.

LOCKHART, S. R. *et al.* Species Identification and Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Bloodstream Isolates from Population-Based Surveillance Studies in Two U.S. Cities from 2008 to 2011. *Journal of Clinical Microbiology*, v.50, p. 3435-3442, 2012.

MATSUMOTO, E. *et al.* Candidemia surveillance in Iowa: emergence of echinocandin resistance. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* v. 79, p. 205-208, 2014.

MAYR, A.; AIGNER, M.; LASS-FLÖRL, C. Anidulafungin for the treatment of invasive candidiasis. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 17, s. 1, p. 1-12, 2011.

MCCORNACK, P. L.; PERRY, C. M. Caspofungin: a review of its use in the treatment of fungal infections. *Drugs*, v. 65, p. 2049-2068, 2005.

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P.G. Invasive candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 30, p. 103-124, 2016.

MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resistance Updates*, v. 7, p. 301-309, 2004.

NUCCI, M. *et al.* Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 51, p. 561-570, 2010.

PERLIN, D. Echinocandin resistance in *Candida*. *Clinical Infectious Diseases*, v. 61, n. S6, p. S612-617, 2015.

PFALLER, M. A. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion test. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 6, p. 1735-1745, 2007.

PHAM, C. D. *et al.* Role of FKS Mutations in *Candida glabrata*: MIC Values, Echinocandin Resistance, and Multidrug Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, p. 4690-4696, 2014.

PIPPI, B. *et al.* *In vitro* evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* sp. *Journal of Applied Microbiology*, v. 118, p. 839-850, 2015.

RAMAGE, G. *et al.* Commercial mouthwashes are more effective than azole antifungals against *Candida albicans* biofilms in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 111, p. 456-460, 2011.

RIERA, M. *et al.* New regulators of biofilm development in *Candida glabrata*. *Research in Microbiology*, v. 163, p. 297-307, 2012.

RODLOFF, A. C.; KOCH, D.; SCHAUMANN, R. Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. *European Journal of Medical Research*, v. 16, p. 187-195, 2011.

RODRIGUES, C. F.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 33, p. 673-688, 2014.

ROETZER, A.; GABALDÓN, T.; SCHÜLLER, C. From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: importante adaptations for an opportunistic pathogen. *Federation of European Microbiological Societies*, v. 314, p. 1-9, 2011.

SALOMÃO, R. *et al.* Diretrizes para tratamento da sepse grave/choque séptico: abordagem do agente infeccioso – controle do foco infeccioso e tratamento antimicrobiano. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 23, p. 145-157, 2011.

SGANGA, G. *et al.* Anidulafungin – a new therapeutic option for *Candida* infections in liver transplantation. *Transplantation Proceedings*, v. 44, p. 1982-1985, 2012.

SILVA, S. *et al.* *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, p. 288-305, 2012.

SPREGHINI, E. *et al.* Comparative Effects of Micafungin, Caspofungin, and Anidulafungin against a Difficult-To-Treat Fungal Opportunistic Pathogen, *Candida glabrata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, p. 1215-1222, 2012.

STEPANOVIC, S. *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, v. 115, p. 891-899, 2007.

THOMPSON, G. R. *et al.* Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for invasive candidiasis secondary to *Candida glabrata* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, p. 3783-3785, 2008.

VALLABHANENI, S. *et al.* Epidemiology and risk factors on echinocandin nonsusceptible *Candida glabrata* bloodstream infections: data from a large

multisite population-based candidemia surveillance program, 2008-2014. *Open Forum Infectious Diseases*, 2015 doi: 10.1093/ofid/ofv163

VARGAS, K. *et al.* Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 3595-3607, 2000.

VITALI, A. *et al.* Cell wall composition and biofilm formation of azoles-susceptible and resistant *Candida glabrata* strains. *Journal of Chemotherapy*. 2016 doi: 10.1080/1120009X.2016.1199507

WALKER, L. A.; GOW, N. A. R.; MUNRO, C. A. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genetics and Biology*, v. 47, p. 117-126, 2010.

WIEDERHOLD, N. P. Echinocandin resistance in *Candida* species: a review of recent developments. *Current Infectious Disease Reports*, v. 18, n. 42, p. 1-8, 2016.