

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Diana Margarida Ferraz Bogas

**Resistência da *Candida glabrata* a
diferentes concentrações de antifúngico**



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Diana Margarida Ferraz Bogas

**Resistência da *Candida glabrata* a
diferentes concentrações de antifúngico**

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica
Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho efectuado sob a orientação da
Professora Doutora Mariana Henriques

outubro de 2013

DECLARAÇÃO

Nome: Diana Margarida Ferraz Bogas

Endereço electrónico: dianabogas@gmail.com

Número do Bilhete de Identidade: 13762082

Título dissertação: Resistência da *Candida glabrata* a diferentes concentrações de antifúngico

Orientador(es): Mariana Contente Rangel Henriques

Ano de conclusão: 2013

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

É autorizada a reprodução parcial desta dissertação apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, a que a tal se compromete,

Universidade do Minho, _____ / _____ / _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora Professora Doutora Mariana Henriques por me ter dado a oportunidade de estudar um tema tão interessante. Agradeço o seu apoio, compreensão e paciência.

Não posso deixar de agradecer a todos os que me receberam e ajudaram no laboratório. Obrigada Célia por toda a ajuda, paciência e confiança. Obrigada por me transmitires os teus conhecimentos e pela disponibilidade.

Um especial e grande obrigada à minha mãe, pois sem ela não teria sido possível chegar até aqui. Agradeço, com todo o carinho, aos meus irmãos pela preocupação constante e por, apesar de longe, estarem sempre presentes. Obrigada às minhas pequenas por me darem tantos momentos de diversão.

Às minhas amigas de vários anos, obrigada por me acompanharem nesta jornada, fazendo-a divertida e especial. À Salomé um obrigada especial por mesmo a muitos quilómetros de distância me teres apoiado de uma forma tão presente. Guida, obrigada por me teres acompanhado nos meses mais complicados, pela companhia e pelas parvoíces.

Paulo, obrigada por estares sempre presente, por me apoiares, pela paciência e por todos os momentos. Obrigada especialmente por todas as chamadas de atenção!

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.”*

Ricardo Reis

SUMÁRIO

Candida glabrata é um fungo virulento e patogénico que nos últimos anos se tem tornado um importante organismo patogénico e responsável por uma elevada taxa de mortalidade. Os problemas associados a esta espécie são a sua resistência aos agentes antifúngicos, bem como a sua capacidade de formar biofilmes, que aumentam a virulência e versatilidade na adaptação a diferentes habitats. Assim, torna-se muito importante o estudo dos biofilmes de *C. glabrata*, bem como da sua resistência.

O primeiro objectivo deste trabalho foi estudar a susceptibilidade de biofilmes de *C. glabrata* (2 isolados clínicos – 534784, 562123 - e uma referência – ATCC 2001) a diferentes concentrações de anfotericina B. A avaliação das células viáveis (obtida pela determinação do número de unidades formadoras de colónias) do biofilme mostrou que a estirpe mais resistente ao antifúngico é *C. glabrata* ATCC 2001, seguindo-se *C. glabrata* 534784 e, por último, *C. glabrata* 562123. A quantificação da biomassa total (por coloração com violeta cristal) demonstrou que a estirpe com maior produção de biomassa é *C. glabrata* 562123, mas no entanto os biofilmes desta estirpe são os mais susceptíveis à anfotericina B.

O outro objectivo do trabalho aqui apresentado foi o estudo da expressão de genes de resistência de *C. glabrata* na presença de anfotericina B (como controlo foram realizados ensaios sem agente antifúngico). Para tal foi estudada a expressão dos genes *ERG3*, *ERG6* e *ERG11*, envolvidos na biossíntese de ergosterol, para as 3 estirpes de *C. glabrata* na forma planctónica e de biofilme. Após as análises foi possível verificar que a presença do antifúngico leva a que os três genes, em determinadas concentrações e para determinadas estirpes, sejam sobreexpressos.

Em suma, este trabalho demonstra que os biofilmes de *C. glabrata* são susceptíveis à anfotericina B, dependendo da concentração e da estirpe estudada. Além disso, mostrou que na presença do antifúngico, a expressão dos genes é alterada.

ABSTRACT

Candida glabrata is a virulent and pathogenic fungus that, in the recent years, has been an important pathogenic organism and is responsible for a high mortality rate. The problems associated to these species consist in a high resistance to antifungal agents and its ability to form biofilm, becoming highly virulent and flexible to the adaption to different habitats. So, the study of *C. glabrata* biofilm formation and its antifungal resistance is of major importance.

The study of the susceptibility of *C. glabrata* (2 clinical isolates and 1 reference strains) to different concentrations of amphotericin B was the first goal of this research. The viable cells (determined by enumeration of the colony forming units) of biofilm showed that the more resistant strain to the antifungal is *C. glabrata* ATCC 2001 and the less is *C. glabrata* 562123. The total biomass quantification (by crystal violet staining) demonstrated that the strain with more ability to form biofilm is *C. glabrata* 562123, but it is more susceptible to amphotericin B.

This work also evaluated the gene expression profile of *C. glabrata* in absence and presence of amphotericin B. So the expression of the genes *ERG3*, *ERG6* and *ERG11*, which are involved in the biosynthesis pathway of ergosterol, was studied. After the analyses it was possible to verify that the antifungal agent presence leads to the overexpression of the three genes, but it was concentration and strain dependent.

In summary, *C. glabrata* is susceptible to amphotericin B, depending on the strain and concentration of the antifungal agent. Moreover, genes expression changed in the presence of amphotericin B.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	III
SUMÁRIO	VII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS	XV
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1. Infecções fúngicas	1
1.1.1. Um caso particular: candidíase	1
1.2. Espécies <i>Candida</i>	2
1.2.1. <i>Candida glabrata</i>	3
1.3. Biofilmes	5
1.4. Antifúngicos	7
1.4.1. Fluoropirimidinas	7
1.4.2. Azóis	8
1.4.3. Equinocandinas	9
1.4.4. Polienos	10
1.5. Resistência aos agentes antifúngicos	12
1.5.1. Comportamento molecular de <i>C. glabrata</i> na resistência a polienos.....	13
CAPÍTULO 2 – SUSCEPTIBILIDADE DOS BIOFILMES DE <i>CANDIDA GLABRATA</i> A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANFOTERICINA B	15
2.1. MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1.1. Meios de cultura e reagentes	16
2.1.2. Crescimento dos biofilmes de <i>C. glabrata</i>	17

2.1.3. Análise estatística	19
2.2. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS.....	20
2.3. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	22
CAPÍTULO 3 – COMPORTAMENTO GENÉTICO ESPECÍFICO DE <i>CANDIDA GLABRATA</i> EM PRESENÇA DE ANFOTERICINA	
B	24
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1.1. Meios e reagentes.....	25
3.1.2. Crescimento dos biofilmes de <i>C. glabrata</i>	25
3.1.3. Extração de RNA.....	27
3.1.4. Síntese de cDNA.....	28
3.1.5. <i>Nanodrop</i>	28
3.1.6. <i>RT-qPCR</i>	28
3.2. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS.....	30
3.3. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	33
CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. – Colónias de <i>Candida glabrata</i> vistas (A) macroscopicamente e (B) microscopicamente.....	3
Figura 1.2. – Biofilme de <i>Candida glabrata</i>	5
Figura 1.3. – Etapas da formação de biofilme das espécies de <i>Candida</i> numa superfície. (A) Aderência inicial à superfície; (B) Formação de microcolónias de células <i>Candida</i> ; (C) Biofilme de <i>Candida</i> na fase de maturação, constituído por células e matriz extracelular.....	6
Figura 1.4. – Estrutura química da (A) citosina, da (B) 5-fluorocitosina e da (C) 5-fluoroacil.....	8
Figura 1.5. – Estrutura química do (A) fluconazole, do (B) voriconazole, do (C) itraconazole e do (D) posaconazole.....	8
Figura 1.6. – Estrutura química da (A) micafungina, da (B) caspofungina e da (C) anidulafungina.....	9
Figura 1.7. – Estrutura química da (A) anfotericina B, da (B) nistatina e da (C) natamicina.....	10
Figura 2.1. – Valores do logaritmo do número de células por cm ² do biofilme de diferentes estirpes de <i>C. glabrata</i> em presença de diferentes concentrações de anfotericina B. As barras de erro são relativas ao desvio-padrão. (*) Diferenças significativas (P<0,05) da redução do número de células de biofilme relativamente ao controlo (0 mg/L).....	20
Figura 2.2. – Valores de absorvância por cm ² de diferentes estirpes de <i>C. glabrata</i> em presença de diferentes concentrações de anfotericina B. As barras de erro são relativas ao desvio-padrão. (*) Diferenças significativas (P<0,05) da redução da quantidade de biofilme formado relativamente ao controlo (0 mg/L).....	21
Figura 3.1. – Níveis de expressão dos genes ERG3, ERG6 e ERG11 (da esquerda para a direita) na biossíntese do ergosterol para a estirpe (A) <i>C. glabrata</i> ATCC 2001, (B) <i>C. glabrata</i> 562123 e (C) <i>C. glabrata</i> 534784. Os resultados foram normalizados pelo gene actina, pois é sempre expresso. As barras de erro correspondem aos desvios-padrão.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. – Susceptibilidade <i>in vitro</i> das diferentes espécies de <i>Candida</i> aos vários antifúngicos. Os sinais indicam: (-) não é susceptível; (+/-) relativamente susceptível; (+) susceptível; (++) bastante susceptível. AmB: anfotericina B; Flu: fluconazole; Itr: itraconazole; Vor: voriconazole; Pos: posaconazole.....	12
Tabela 2.1. – Volumes necessários para obter cada concentração na preparação de 15 mL de solução final de anfotericina B.....	17
Tabela 3.1. – Volumes necessários para obter cada concentração na preparação de 50 mL de solução final de anfotericina B.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
SDB	<i>Sabouraud Dextrose Broth</i>
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
PBS	Tampão fosfato salino
CFU	Unidade Formadora de Colónias
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>
AmB	Anfotericina B

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Infecções fúngicas

No início do século XX, as epidemias causadas por bactérias eram as principais responsáveis pela alta mortalidade de pacientes hospitalares. Contrariamente, as infecções fúngicas não eram consideradas nestas taxas de mortalidade. Contudo, no final dos anos 60, as infecções fúngicas emergiram rapidamente, representando uma ameaça para a saúde humana. Este aumento é uma consequência do aumento do número de doenças como a SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida), cancro, diabetes e pelo aumento de procedimentos invasivos como o transplante de órgãos, entre outros [1].

As infecções fúngicas podem ser causadas por dois tipos de microrganismos: os patogénicos primários e os patogénicos oportunistas. Os patogénicos primários são por si só capazes de provocar uma infecção em indivíduos saudáveis. Por sua vez, os patogénicos oportunistas são capazes de desenvolver uma infecção no corpo humano quando este se encontra com o sistema imunitário debilitado [1].

1.1.1. Um caso particular: candidíase

A candidíase é uma infecção fúngica que representa um problema de saúde pública grave [2,3] e é causada por espécies de *Candida*. A candidíase pode ter origem endógena devido à capacidade do microrganismo se deslocar ou exógena devido à contaminação de dispositivos, como os cateteres [4,5]. Tal como as restantes infecções fúngicas, também o aumento dos indivíduos com candidíase está relacionado com a complexidade das intervenções cirúrgicas [6-8]. Na maioria das vezes, a candidíase manifesta-se devido à capacidade das espécies *Candida* formarem biofilmes em diversas superfícies e esse fenótipo está associado às infecções sistémicas e das mucosas [9,10].

Nos últimos anos foram introduzidos novos antifúngicos que têm levado a novas estratégias para terapias empíricas e profiláticas. No entanto, a utilização de certos antifúngicos leva ao aparecimento de resistência em certas espécies e ao aparecimento de espécies intrinsecamente resistentes [4]. Actualmente, o número crescente de candidíase é causado por espécies não-*Candida albicans* [6,11-16].

1.2. Espécies de *Candida*

As espécies do género *Candida* estão incluídas no Reino *Fungi*, na Divisão *Eumycota*, na Subdivisão *Deuteromycotina*, na Classe *Bastomycetes* e na família *Cryptococcaceae*, no que diz respeito à taxonomia [4,17]. Este género é composto por um conjunto bastante heterogéneo de organismos que crescem na forma de leveduras (unicelulares que se reproduzem por gemulação), assim como, crescem de forma filamentosa – hifas e pseudohifas [9,18].

As espécies do género *Candida* fazem parte da flora regular dos tractos gastrointestinal, genital, urinário e oral dos indivíduos saudáveis. No entanto, estas em algumas circunstâncias podem causar doenças devido ao seu carácter oportunista e a habilidade de causar infecções sistémicas e superficiais [2,18,19]. É a resposta imunitária do hospedeiro que determina o tipo de infecção causada pelas espécies de *Candida*, pois este torna-se patogénico quando o sistema imunitário está debilitado sistémica ou localmente [18].

Apenas um pequeno número das espécies de *Candida* são patogénicas para os humanos e começam agora a ser os maiores agentes responsáveis pelas infecções adquiridas nos hospitais [9,20]. Assim, as espécies patogénicas de importância clínica e que causam mais de 90 % das infecções invasivas são a *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida lusitania* [4,19,21]. As espécies referidas anteriormente aparecem como patogénicos devido aos factores de risco associados às intervenções cirúrgicas dos dias de hoje, tais como colocação de cateteres urinários, válvulas cardíacas ou pacemakers [20,22]. Além disso, existem outros factores para a patogenicidade como maior incidência do vírus da imunodeficiência humana (HIV), aumento da população idosa, maior número de pacientes imunossuprimidos, maior uso de fármacos imunossuppressores e antibióticos que diminuem a flora bacteriana normal [2,20].

A patogenicidade das espécies de *Candida* é facilitada por diversos factores de virulência, como a sua versatilidade para se adaptar a diferentes habitats, a capacidade de invadir as defesas do hospedeiro, a secreção de enzimas hidrolíticas (por exemplo, proteases, fosfolipases e hemolisinas) e a habilidade para aderir (primeira fase bastante importante no processo de infecção) e formar biofilmes nos dispositivos médicos e tecidos [18,19,23-27].

Candida albicans é considerada a causa mais comum de infecções superficiais e sistémicas nos hospitais [18,28]. Todavia, existe um número crescente de infecções causadas por espécies não-*Candida albicans*, consideradas agentes patogénicos importantes [2,18,28,29]. O maior desafio destas espécies é a sua resistência aos antifúngicos disponíveis para futuras

estratégias terapêuticas [18]. Nestas espécies está incluída *Candida glabrata* como sendo uma das mais importantes e emergente como patogénica, nos últimos anos.

1.2.1. *Candida glabrata*

Historicamente, *Candida glabrata* estava classificada no género *Torulopsis*, devido à falta de capacidade para formar pseudohifas. Contudo, mais tarde, esta capacidade deixou de ser um factor de distinção para o género *Candida*, sendo assim proposto que *T. glabrata* passasse a integrar o género *Candida* [30].

Candida glabrata é, morfológica e filogeneticamente, mais parecida com a *Saccharomyces cerevisiae*, levedura bem estudada no mundo científico e não patogénica, do que com todas as outras espécies de *Candida* [31-35]. Ao contrário de outras espécies de *Candida*, *C. glabrata* não é dimórfica e cresce apenas como blastósporos. Tal como *S. cerevisiae*, não consegue fazer a transição de blastonídio para hifas ou pseudohifas [30,34-36]. *Candida glabrata* (1-4 μm) é mais pequena do que *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* e, além disso, tem forma elíptica e é unicelular (figura 1.1) [18].

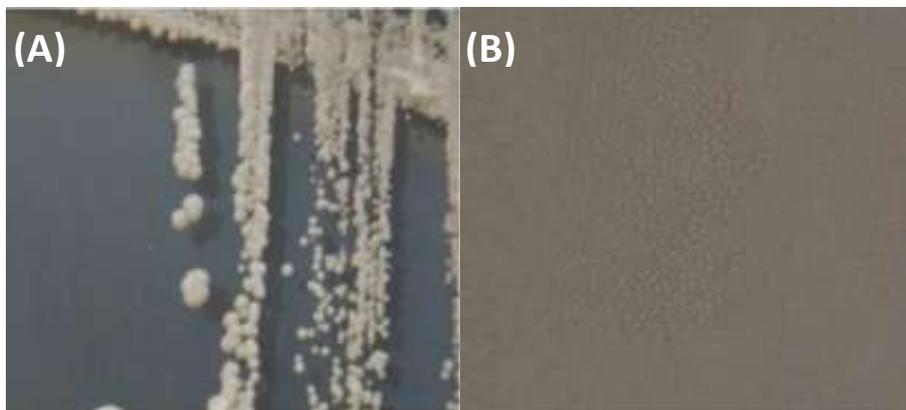


Figura 1.1. – Colónias de *Candida glabrata* vistas (A) macroscopicamente e (B) microscopicamente (adaptado de [99])

Relativamente ao ciclo sexual de *C. glabrata*, esta é um organismo haplóide e um ciclo sexual ou acasalamento nunca foram observados [33]. Uma hipótese estudada é que esta espécie tenha perdido o seu ciclo sexual ou tenha sido suprimido para que a sua proliferação seja maximizada. A temperatura ideal para um crescimento e tempo de regeneração rápidos é de 37 °C [37]. Como visto acima, *C. glabrata* não produz hifas verdadeiras, mas, apesar de ser um fenómeno raro, pode desenvolver pseudohifas durante a colonização, caso esteja sob

condições específicas, ou em resposta à falta de azoto [23,31,37,38]. No que diz respeito à bioquímica, esta espécie também se distingue e tem uma utilização única dos açúcares comparativamente às outras espécies de *Candida*. Por exemplo, enquanto *C. albicans* fermenta e assimila diversos açúcares, *C. glabrata* apenas fermenta e assimila glucose e trealose [30].

Durante muitos anos *C. glabrata* foi considerada um organismo não patogénico que faz parte dos indivíduos saudáveis, pelo que não estava associada a infecções [23,30]. Contudo, nos últimos anos, esta tem-se tornado um importante organismo patogénico, sendo a segunda maior causa de infecções causadas pelas espécies de *Candida* e responsável por uma elevada taxa de mortalidade. Apesar deste facto ainda pouco é conhecido sobre a sua epidemiologia [2,23,30,39]. Esta espécie raramente penetra em tecidos, apesar de ser capaz de os colonizar, pois normalmente prioriza a adesão a superfícies [37]. Os indivíduos imunocomprometidos, como os pacientes transplantados e tratados com antibióticos, e os idosos são mais susceptíveis a *C. glabrata* [34,37,40,41].

Relativamente aos mecanismos de virulência de *C. glabrata*, estes continuam, nos dias de hoje, a ser pouco entendidos [42]. É interessante o facto de esta espécie ser virulenta porque é mais próxima geneticamente de *S. cerevisiae* que não é patogénica do que das espécies de *Candida* que o são significativamente [42,43]. Por exemplo, *C. glabrata* não forma hifas verdadeiras nem secreta hidrolases que são factores importantes de virulência nas outras espécies de *Candida*. Além disso, as células vegetativas desta espécie são altamente tolerantes ao *stress* podendo: sobreviver durante mais de 5 meses nas superfícies onde se desenvolvem [33,37,44]. Existem diversos factores que contribuem para a infecção causada por *C. glabrata* como a secreção de fosfolipases, sobrevivência e replicação em macrófagos e síntese de adesinas [45,46]. A prolongada sobrevivência dentro das células fagocíticas pode ser um dos motivos da rápida disseminação da infecção provocada pelas espécies de *Candida* [37].

Um dos principais motivos para o sucesso de *C. glabrata* nas infecções é a sua alta resistência a certos fármacos, principalmente aos azóis, e que a torna difícil de combater. Esta espécie é intrinsecamente resistente, mas a resistência também pode ser adquirida devido ao elevado uso de azóis nos tratamentos [2,23,30,36,47]. Assim, devido à baixa susceptibilidade a certos antifúngicos e à crescente resistência, o tratamento das infecções causadas por *C. glabrata* tornam-se preocupantes [34,48].

É de referir que *C. glabrata* forma biofilmes (figura 1.2), que são um factor de virulência muito importante, uma vez que a torna versátil na adaptação a diferentes habitats. Além disso,

esta forma de crescimento aumenta a sua resistência aos tratamentos com antifúngicos. Assim, está relacionado com alta taxa de mortalidade em comparação com as espécies que não formam biofilmes [2,23,38].

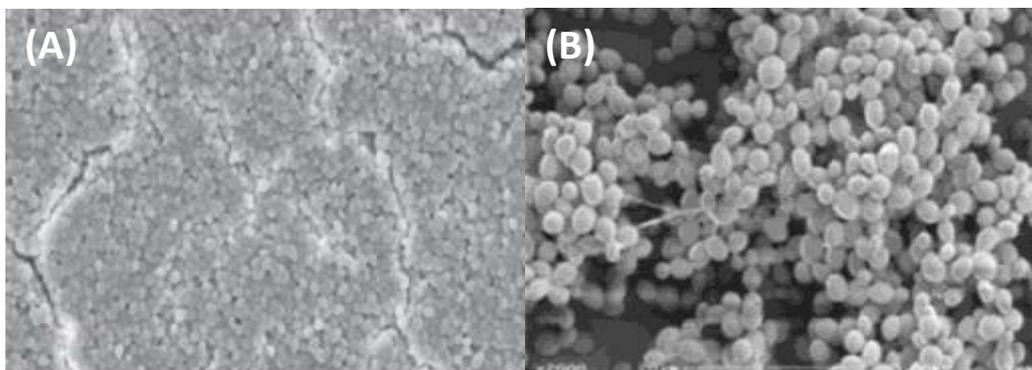


Figura 1.2. – Biofilme de *Candida glabrata* (A) adaptado de [23](B) adaptado de [100]

1.3. Biofilmes

Os biofilmes são comunidades de microrganismos altamente estruturadas, universais, complexas e interdependentes que estão associadas a superfícies. Estas comunidades estão embebidas numa matriz extracelular polimérica, muitas vezes viscosa, produzida pelas células do biofilme [2,9,20,49,50]. Geralmente, a matriz é composta por água, hidratos de carbono, proteínas, fósforo e hexosaminas [2]. O biofilme forma-se quando as células se ligam a superfícies (bióticas ou abióticas) e crescem em microcolónias que se fundem, produzindo a sua estrutura tridimensional [19,24,51]. No caso das espécies de *Candida*, a adesão entre as células e os materiais ou células do hospedeiro é o primeiro passo para o desenvolvimento do biofilme [19,52]. Após esta fase de adesão, segue-se a maturação do biofilme (figura 1.3) [19].

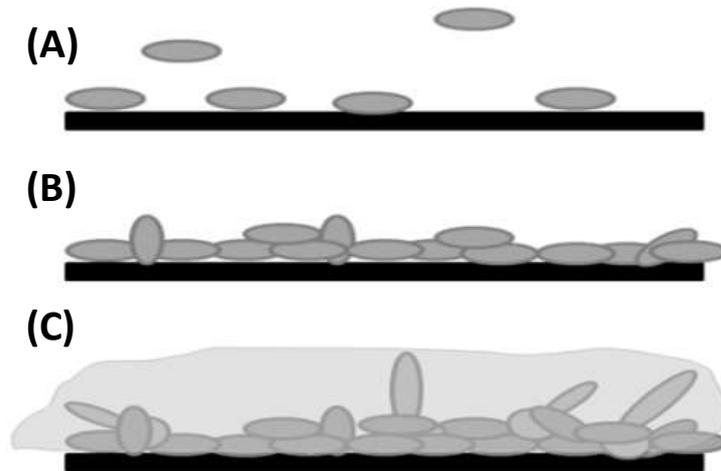


Figura 1.3. – Etapas da formação de biofilme das espécies de *Candida* numa superfície. (A) Adesão inicial à superfície; (B) Formação de microcolónias de células *Candida*; (C) Biofilme de *Candida* na fase de maturação, constituído por células e matriz extracelular [99].

O biofilme é considerado a forma de crescimento mais prevalente dos microrganismos, que podem crescer em forma de leveduras, hifas ou pseudohifas [2,23,51]. Além disso, a população da comunidade pode ser desenvolvida por uma única espécie (situação praticamente exclusiva dos ensaios *in vitro*) ou por um conjunto de espécies, podendo ser fungos e bactérias [9,20,53,54,55]. No que diz respeito às vantagens, existem várias que levam a que o microrganismo cresça na forma de biofilme, como a protecção em relação à resposta imunitária do hospedeiro, capacidade de adquirir nutrientes, resistência física e química ao *stress*, cooperação metabólica e aquisição de novos traços genéticos [9,19,20,23,50,55].

O crescimento de biofilmes leva a consequências com implicações clínicas graves, como protecção contra o sistema imunitário do hospedeiro por novos mecanismos de resistência e resistência ao tratamento com antifúngicos [9,19,56]. Por esse facto, estes são muito relevantes na saúde pública, sendo responsáveis por grande parte das infecções causadas por microrganismos nos humanos [9,20,38,57]. A produção de biofilmes está directamente relacionada com o aumento da resistência a antifúngicos por parte dos microrganismos, como as espécies de *Candida* [19,56]. Nos últimos anos, tem vindo a ser dada mais atenção ao papel dos biofilmes nas infecções comparativamente com as células planctónicas. Estes exibem características fenotípicas únicas marcadamente diferentes das células planctónicas [20,49,50]. Enquanto as células livres necessitam de mudanças genéticas para se tornarem menos susceptíveis ao tratamento com antifúngicos, os biofilmes persistem devido à sua densidade

populacional, mostrando um fenótipo resistente sem recorrer a alterações genéticas [19,50]. Ao longo de vários estudos realizados tem sido demonstrado que as infecções causadas por biofilmes têm uma maior taxa de mortalidade do que as causadas por células planctónicas, pois são menos susceptíveis a antifúngicos do que as células planctónicas, tornando a sua infecção mais difícil de tratar [20,27,38,50,58-60].

1.4. Antifúngicos

Ao longo do tempo, tem sido feita muita pesquisa de forma a que possam ser desenvolvidos novos fármacos e possam ser oferecidas novas opções de tratamento [61-63].

A maioria dos antifúngicos actua inibindo enzimas na biossíntese de ergosterol ou por interacção directa com o ergosterol na membrana plasmática [61,64]. Contudo, cada classe de antifúngicos utiliza um método diferente para matar ou inibir os fungos [19,65,66]. Existe um número limitado de fármacos disponíveis para combater as infecções fúngicas invasivas e usados clinicamente, pelo que há 4 classes que atacam 3 vias metabólicas distintas e que são as mais utilizadas, sendo elas: análogos de fluoropirimidinas, azóis, equinocandinas e polienos [1].

1.4.1. Fluoropirimidinas

As fluoropirimidinas são análogos estruturais sintéticos do nucleótido citosina (figura 1.4 (A)) e apenas as 5-fluorocitosina (5-FC) (figura 1.4 (B)) e 5-fluoroacilo (5-FU) (figura 1.4 (C)) são utilizadas na medicina. A 5-FC tem propriedades farmacocinéticas interessantes, pois devido à alta solubilidade em água e pequeno tamanho difunde-se facilmente pelo corpo quando administrado oralmente [1]. Esta produz efeitos secundários insignificantes, que podem evoluir e causar efeitos graves em casos raros [1,67,68]. Apesar do uso da 5-FC ter vantagens, o seu uso diminuiu por causa do aumento da resistência nos patogénicos [1]. 5-FC por si só não tem actividade antifúngica e a sua actividade fungistática (inibe o crescimento, mas não mata o fungo) depende da conversão em 5-FU [1,69].

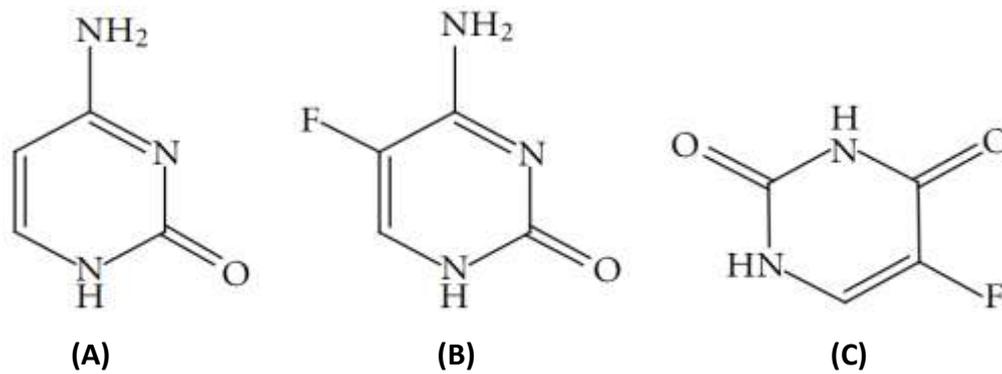


Figura 1.4. – Estrutura química da (A) citosina, da (B) 5-fluorocitosina e da (C) 5-fluoroacil [1].

1.4.2. Azóis

Os azóis são os antifúngicos mais utilizados para combater as infecções fúngicas e são consequentemente os mais estudados no mundo científico. Os estudos realizados têm por objectivo perceber o seu modo de acção, as propriedades farmacológicas e os mecanismos de resistência criados pelos microrganismos [1,70,71]. Os azóis mais usados são o fluconazole (figura 1.5 (A)), itraconazole (figura 1.5 (C)) e, os mais recentes triazóis, voriconazole (figura 1.5 (B)) e posaconazole (figura 1.5 (D)) [70,71]. É de referir que os fungos resistentes aos azóis clássicos são, muitas vezes, resistentes aos novos triazóis [1].

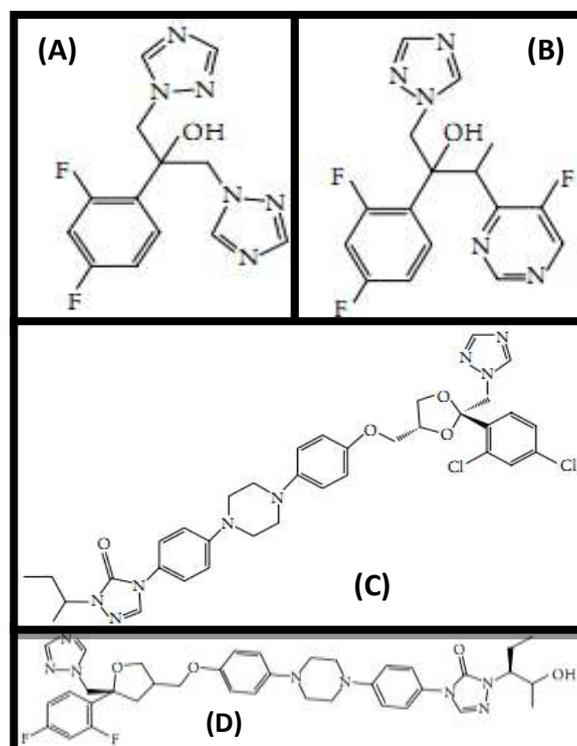


Figura 1.5. – Estrutura química do (A) fluconazole, do (B) voriconazole, do (C) itraconazole e do (D) posaconazole (adaptado de [1]).

Os azóis são fármacos que têm como alvo a biossíntese de ergosterol por inibição de uma enzima muito importante, a lanosterol 14 α -demetilase, que é codificada pelo gene *ERG11* (*ERG* de ergosterol) e responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol. Portanto, a acumulação e metabolismo de esteróis metilados leva à síntese de compostos tóxicos que são incapazes de substituir com sucesso o ergosterol [1,72]. Por fim, é de referir que esta classe de antifúngicos é fungistática contra leveduras e fungicida (elimina) contra fungos [70].

1.4.3. Equinocandinas

As equinocandinas são derivados sintéticos dos lipopéptidos e são a mais recente classe de antifúngicos desenvolvida, sendo elas a caspofungina (figura 1.6 (A)), a micafungina (figura 1.6 (B)) e a anidulafungina (figura 1.6 (C)) [1,70]. Estas são apenas utilizadas intravenosamente, uma vez que são mal absorvidas pelo sistema gastrointestinal devido ao seu elevado peso molecular. Uma vantagem do uso das equinocandinas é o facto de raramente existirem efeitos secundários e serem degradadas devagar, sendo suficiente uma injeção diária [1].

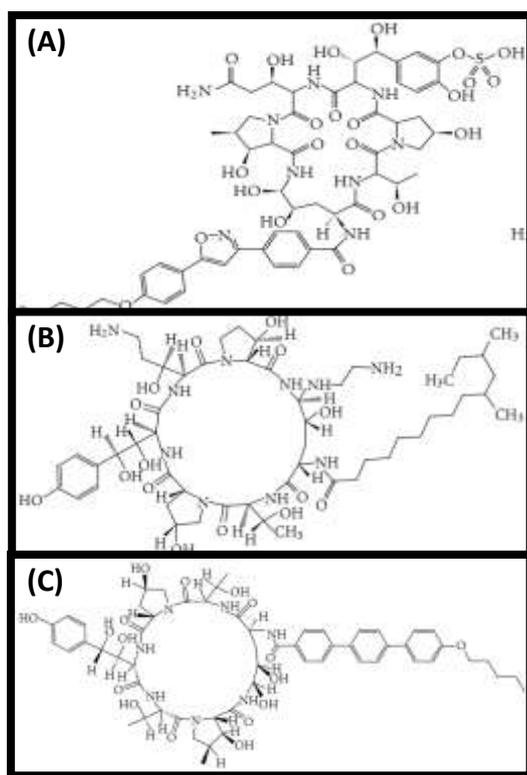


Figura 1.6. – Estrutura química da (A) micafungina, da (B) caspofungina e da (C) anidulafungina (adaptado de [1]).

As equinocandinas são fármacos que actuam inibindo a enzima responsável pela produção de 1,3- β -D-glucano, a sintase 1,3- β -D-glucano. Este componente é essencial na parede celular do fungo, uma vez que a sua inibição leva à desestabilização da célula e à falta de componentes intracelulares, originando lise celular [1,70].

É de salientar que as equinocandinas são fungicidas contra leveduras e fungistáticas contra fungos e são uma boa alternativa no combate às infecções fúngicas [1,70,73].

1.4.4. Polienos

Os polienos são uma classe de antifúngicos que englobam mais de 200 moléculas, no entanto apenas três são permitidas no uso clínico: a anfotericina B (figura 1.7 (A)), a nistatina (figura 1.7 (B)) e a natamicina (figura 1.7 (C)) [1].

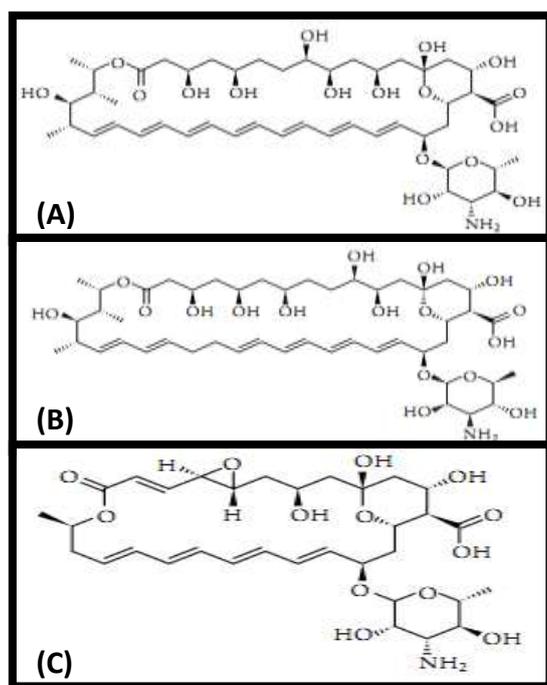


Figura 1.7. – Estrutura química da (A) anfotericina B, da (B) nistatina e da (C) natamicina (adaptado de [1]).

O alvo de acção dos polienos é o maior componente das membranas dos fungos, o ergosterol. A estrutura anfipática dos polienos permite que estes se liguem à camada bilipídica da membrana, o que resulta numa aumento da permeabilidade pela formação de poros levando à morte da célula [70,71,74]. A grande desvantagem do uso dos polienos é o facto de estes possuírem afinidade com o colesterol, o componente correspondente ao ergosterol na

membrana das células dos humanos. Embora a afinidade seja pequena, esta não pode ser ignorada devido aos efeitos secundários graves que provoca, como a nefrotoxicidade. Este é o efeito secundário mais grave dos polienos que pode levar à insuficiência renal bilateral e permanente e à morte do doente. No caso da anfotericina B, a nível hospitalar, o doseamento sérico do fármaco é realizado diariamente para evitar que isto aconteça [1,70]. É necessário dizer que os polienos são fungicidas contra leveduras e fungos [70,71].

A anfotericina B é um antifúngico que pertence à classe dos polienos e é obtida através da bactéria *Streptomyces nodosus*. Esta apresenta uma parte hidrófila, que inclui um hidrocarboneto hidroxilado, e uma sequência de ligações conjugadas (4 a 7) com afinidade para os lípidos [75][76][77].

No que diz respeito ao mecanismo de acção, a anfotericina B é fungistática ou fungicida, dependendo da concentração utilizada e do fungo. Este polieno liga-se ao ergosterol da membrana celular do fungo, o que leva a alterações na permeabilidade pois formam-se poros, permitindo a perda de iões e componentes intracelulares e, conseqüentemente, morte celular. A administração do fármaco altera a resposta imunológica e o *stress* oxidativo, potenciando a resposta imunitária do hospedeiro. Assim, a anfotericina B tem grande espectro de acção e é o medicamento mais prescrito para infecções fúngicas sistémicas [75][76][77].

A anfotericina B é um fármaco activo *in vitro* contra várias espécies de fungos patogénicos, como as espécies de *Candida*, *Blastomyces dermatitidi*, espécies de *Aspergillus*, entre outros. Em relação às espécies de *Candida*, a *C. albicans* é bastante susceptível ao antifúngico enquanto as espécies não-*albicans* são pouco susceptíveis [75][76][77].

O fármaco deve ser administrado de forma parentérica (directamente nos tecidos do corpo ou na circulação sanguínea) no tratamento das infecções fúngicas sistémicas, pois a absorção gastrointestinal é baixa [75][77]. Além disso, apenas deve ser utilizada a anfotericina B em pacientes com hipersensibilidade ao fármaco caso seja uma situação de risco de vida e este tratamento seja o único possível. Em cada caso é necessário avaliar se o benefício compensará em relação aos efeitos secundários [76][77].

Relativamente à resistência à anfotericina B, esta tem sido usada desde há muitos anos e os fenómenos de resistência são muito raros [78][77], contudo pode ocorrer. O antifúngico continua a principal forma de tratamento de infecções fúngicas sistémicas e continua aceite no uso clínico devido aos poucos casos de microrganismos resistentes, apesar de existirem alguns problemas com limitação do uso devido à toxicidade [77]. Geralmente, como os polienos actuam

ligando-se ao ergosterol, os mecanismos de resistência são a diminuição da quantidade de ergosterol nas membranas, o acesso limitado a sítios de ligação no ergosterol e a acumulação de outros esteróis na membrana celular [70][77].

1.5. Resistência aos agentes antifúngicos

O aumento das infecções causadas por espécies não-*albicans* e da resistência aos antifúngicos é uma preocupação [19]. No que diz respeito a *C. albicans*, esta é susceptível aos antifúngicos, mas *C. glabrata* tem intrinsecamente resistência a vários tipos de antifúngicos, limitando a sua eficácia no tratamento [33,79-81].

A tabela 1.1 mostra a actividade dos antifúngicos relativamente as várias espécies de *Candida*.

Tabela 1.1. – Susceptibilidade *in vitro* das diferentes espécies de *Candida* aos vários antifúngicos. Os sinais indicam: (-) não é susceptível; (+/-) relativamente susceptível; (+) susceptível; (++) bastante susceptível. AmB: anfotericina B; Flu: fluconazole; Itr: itraconazole; Vor: voriconazole; Pos: posaconazole. (adaptado de [101])

Especies de <i>Candida</i>	Antifúngicos							
	AmB	Azóis				Equinocandinas		
		Flu	Itr	Vor	Pos	Caspofungina	Micafungina	Anidulafungina
<i>C. albicans</i>	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>C. glabrata</i>	++	+/-	N	+	+	++	++	++
<i>C. tropicalis</i>	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>C. parapsilosis</i>	++	++	++	++	++	+	+	+
<i>C. krusei</i>	+	-	+/-	+	+	++	++	++

A resistência é a habilidade de um microrganismo crescer na presença de elevadas doses de antifúngicos, continuando a infecção a progredir [9,82]. Esta resistência é visível no aumento do valor das concentrações mínimas inibitórias (MIC) [82,83]. A resistência aos antifúngicos tem-se tornado uma preocupação, especialmente pelo aumento de doentes imunossuprimidos. Uma das razões para o aumento da resistência é o uso profilático dos antifúngicos, pois leva à selecção e desenvolvimento de organismos resistentes [84].

No que diz respeito aos biofilmes, estes são um motivo do aumento da resistência aos fármacos [19,85,86]. Um estudo revelou que a resistência aos fármacos se desenvolve ao longo

do tempo, coincidindo com a maturação do biofilme, podendo-se concluir que a resistência aos antifúngicos está directamente relacionada com o desenvolvimento do biofilme [9,24,87]. Apesar de tudo, os mecanismos de resistência que os biofilmes das espécies de *Candida* utilizam ainda não são entendidos claramente. Existem várias hipóteses para os mecanismos, que incluem restrição da penetração dos fármacos através da matriz do biofilme, mudanças fenotípicas que resultam de uma diminuição da taxa de crescimento ou limitação dos nutrientes e, por último, expressão de genes relacionados com a resistência induzida pelo contacto com a superfície [20,49,88,89]. A matriz de material extracelular polimérico pode excluir ou limitar o acesso dos fármacos para os organismos num nível mais profundo do biofilme [20]. No que diz respeito ao crescimento, sabe-se que os biofilmes crescem numa taxa pequena devido à disponibilidade limitada de nutrientes e este facto provoca mudanças na superfície da célula que podem afectar a susceptibilidade dos microrganismos aos antifúngicos [20,49,88,89]. Em relação à expressão genética, quando os microrganismos aderem a uma superfície e formam biofilmes, eles exibem um fenótipo alterado. Vários estudos estão a começar para identificar genes activados ou reprimidos nos biofilmes de *Candida* comparativamente às células planctónicas no que diz respeito à resistência aos fármacos [20]. Os estudos realizados até agora mostram que a resistência aos fármacos pode ser consequência da combinação dos mecanismos descritos anteriormente e não apenas de um [58].

Outros estudos realizados recentemente mostraram que pode existir um pequeno número de células responsáveis pela resistência às quais se dá o nome de células persistentes (“persisters”) [20,82]. Este tipo de células é importante nos mecanismos de resistência em infecções crónicas e têm agora tido atenção em vários estudos com biofilmes fúngicos [50,51,90]. As células persistentes ocupam entre 0,1 a 1% da população do biofilme e continuam células viáveis mesmo na presença de altas concentrações de antifúngicos [58,82].

1.5.1. Comportamento molecular de *C. glabrata* na resistência a polienos

Os mecanismos de resistência aos polienos são pouco entendidos nos isolados clínicos, visto que a resistência é incomum. Uma vez que o ergosterol é o alvo dos polienos, a resistência resulta da diminuição de ergosterol, ocorrendo mutações nos genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de ergosterol [34,77]. A biossíntese de ergosterol é um conjunto de vários genes necessários na conversão de co-enzima A em ergosterol [91].

Um estudo realizado com um isolado clínico de *C. glabrata* susceptível a polienos concluiu que uma mutação no gene *ERG6*, que codifica uma enzima envolvida nos últimos passos da biossíntese de ergosterol, diminui a resistência. O estudo mostrou também que esta mutação resultou na sobreexpressão de vários genes envolvidos na biossíntese de ergosterol, como o *ERG1*, *ERG2*, *ERG3* e *ERG5*, quando comparadas com a estirpe de referência, aparecendo a hipótese da via metabólica ficar bloqueada. Além disso, o isolado clínico de *C. glabrata* continha um baixo teor de ergosterol em comparação com a estirpe de referência, estando também relacionado com a mutação do gene *ERG 6* [92]. Outro estudo foi realizado num isolado clínico de *C. glabrata* com baixa susceptibilidade a polienos. Neste caso, foi detectada uma mutação no gene *ERG6*, que levou à interrupção da biossíntese do ergosterol e, por consequência, à resistência aos polienos. Além disso, os resultados demonstraram que existiam alterações na composição de esteróis na membrana plasmática e crescimento de pseudohifas induzidas pela mutação do gene *ERG6*, conduzindo à susceptibilidade a polienos [34].

CAPÍTULO 2 – SUSCEPTIBILIDADE DOS BIOFILMES DE *Candida glabrata* A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANFOTERICINA B

Ao contrário de outras espécies de *Candida*, *C. glabrata* não é dimórfica e cresce apenas como blastósporos e, além disso, tem forma elíptica e é unicelular [18]. Durante muito tempo *C. glabrata* foi considerada um organismo não patogénico que faz parte dos indivíduos saudáveis, não estando por isso associada a infecções [23,30]. Contudo, nos últimos anos, esta situação reverteu-se e esta espécie tem-se tornado um importante organismo patogénico, responsável por uma elevada taxa de mortalidade.

Candida glabrata forma biofilmes, que são um factor de virulência muito importante, uma vez que a torna versátil na adaptação a diferentes habitats. Esta forma de crescimento aumenta a sua resistência aos tratamentos com antifúngicos [2,23,38]. Os biofilmes são comunidades de microrganismos altamente estruturadas, universais, complexas e interdependentes que estão associadas a superfícies. Estas comunidades estão embebidas numa matriz extracelular de polímeros produzida pelas células do biofilme [2,9,20,49,50]. *Candida glabrata* tem intrinsecamente resistência a vários tipos de antifúngicos, limitando a sua eficácia no tratamento [33,79-81], especialmente devido aos biofilmes, pois são um motivo do aumento da resistência aos fármacos [19,85,86].

O objectivo deste trabalho é estudar a susceptibilidade dos biofilmes de *C. glabrata* quando em presença de diferentes concentrações de anfotericina B, através do estudo da viabilidade celular e da quantificação da biomassa formada.

2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste subcapítulo encontram-se descritos os materiais e métodos utilizados no decorrer do trabalho experimental.

As estirpes usadas durante o trabalho experimental foram a *C. glabrata* ATCC (American Type Culture Collection) 2001 (estirpe de referência), *C. glabrata* 562123 (estirpe urinária) e a *C. glabrata* 534784 (estirpe vaginal). As últimas foram fornecidas pelo Hospital de Braga. Em todos os procedimentos descritos a seguir foram utilizadas as três estirpes referidas anteriormente.

Resistência da *Candida glabrata* a diferentes concentrações de antifúngico
Susceptibilidade dos biofilmes de *Candida glabrata* a diferentes concentrações de anfotericina B

O antifúngico testado foi a anfotericina B comprada na empresa Sigma-Aldrich.

2.1.1. Meios de cultura e reagentes

2.1.1.1. Preparação da *Candida glabrata*

As estirpes estavam guardadas numa arca a -80°C (em 20% de glicerol). Para fazer a sementeira removeram-se 10 μL com uma ansa e passou-se em SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) para obter colónias isoladas, deixando a incubar durante 24 horas a 37°C .

2.1.1.2. *Sabouraud Dextrose Broth*

Adicionaram-se 30 g de *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) a 1000 mL de água destilada. Agitou-se até dissolver. De seguida, esterilizou-se em autoclave durante 20 minutos à temperatura de 121°C . Por fim, conservou-se à temperatura ambiente ou a 4°C , quando utilizado por períodos mais longos.

2.1.1.3. *Sabouraud Dextrose Agar*

Adicionaram-se 30 g de *Sabouraud Dextrose Broth* e 20 g de Agar (2%) a 1000 mL de água destilada (SDA). Agitou-se até dissolver. De seguida, esterilizou-se em autoclave durante 20 minutos à temperatura de 121°C . Conservou-se na estufa a 60°C e depois plaqueou-se antes do meio solidificar.

2.1.1.4. Meio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640)

Pesaram-se 10,4 g de RPMI, 2 g de NaHCO_3 , 34,53 g de MOPS (*3-(N-morpholino)propanesulfonic acid*) e, de seguida, adicionam-se 1000 mL de água ultrapura, homogeneizando-se até dissolver todos os componentes. Ajustou-se o pH a 7,0 com NaOH. Esterilizou-se por um processo de filtração com membranas de 0,22 μm . Por fim, distribuiu-se de forma asséptica para recipientes estéreis e conservou-se a 4°C .

2.1.1.5. Tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,5 – Solução *Stock* 10x concentrado

Pesaram-se 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 2 g de K_2HPO_4 , 28,5 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e, de seguida, adicionaram-se 1000 mL de água ultrapura, homogeneizando-se a solução. Ajustou-se

o pH a 7,5 com HCl 37%. Depois, esterilizou-se em autoclave durante 20 minutos à temperatura de 121 °C. Armazenou-se à temperatura ambiente. Por fim, diluiu-se 1/10 em água ultrapura estéril para poder utilizar-se.

2.1.1.6. Violeta Cristal 1% (v/v)

Adicionaram-se 5 mL de violeta cristal a 495 mL de água ultrapura. Armazenou-se à temperatura ambiente.

2.1.1.7. Ácido acético 33% (v/v)

Adicionaram-se 165 mL de ácido acético 100% a 335 mL de água ultrapura. Armazenou-se à temperatura ambiente.

2.1.1.8. Soluções de Anfotericina B

As soluções de anfotericina B foram preparadas a partir de alíquotas de 1 mg/mL preparadas em SDB.

As soluções são preparadas com as alíquotas e RPMI.

Tabela 2.1. – Volumes necessários para obter cada concentração na preparação de 15 mL de solução final de anfotericina B.

Concentrações (mg/L)	V _{aliquota de anfotericina B} (mL)	V _{RPMI} (mL)
20	0,3	14,7
40	0,6	14,4
80	1,2	13,8
160	2,4	12,6
320	4,8	10,2

2.1.2. Crescimento dos biofilmes de *C. glabrata*

Inicialmente repicaram-se as três estirpes em estudo em placas de cultura em SDA e incubaram-se durante 24 horas à temperatura de 37 °C. De seguida, foi inoculada uma colónia em 30 mL de SDB num matraz de 100 mL e incubou-se durante 18 horas à temperatura de 37

⁰C. Passado o tempo referido, a suspensão obtida foi centrifugada a 3000 g, 10 minutos a 4 ⁰C. O sobrenadante foi rejeitado e lavou-se com 15 mL de PBS 1X, centrifugando novamente sob as mesmas condições. Repetiu-se este procedimento. Por fim, ressuspendeu-se em 5 mL de RPMI e vortexou-se.

Posteriormente contou-se o número de células na câmara de Neubauer (ver procedimento 2.2.1.) e acertou-se para que a concentração final fosse de 1×10^5 cel/mL em RPMI. Depois de obter a solução padronizada, transferiu-se 100 μ L desta para cada poço da placa de 96 poços, à excepção de duas linhas (uma em que foram transferidos 200 μ L de RPMI, sendo esse o negativo da placa e outra para 200 μ L de solução padronizada para ponto de referência de crescimento). Além disso, foi feito o controlo, transferindo 200 μ L de solução padronizada de cada estirpe para uma placa de 96 poços. Incubou-se durante 24 horas à temperatura de 37 ⁰C e agitação de 120 rpm. Passadas as 24 horas, o meio foi renovado: removeram-se os 100 μ L da suspensão celular e adicionaram-se 100 μ L de RPMI. Em relação à placa controlo, removeram-se 200 μ L da suspensão celular e adicionaram-se 200 μ L de RPMI. Voltou a incubar-se durante 24 horas à temperatura de 37 ⁰C e 120 rpm. Após as 24 horas, foram adicionados 100 μ L de anfotericina B em diferentes concentrações. Foram testadas as seguintes concentrações 20, 40, 80, 160 e 320 mg/L. No que diz respeito à placa controlo, o antifúngico não é adicionado e cresce apenas durante as 48 horas. Pela última vez, incubou-se durante 24 horas à temperatura de 37 ⁰C e 120 rpm.

Por fim, os resultados foram analisados por contagem de células pelo método de Unidades Formadoras de Colónias (CFUs) e por cristal violeta (ver procedimentos 2.2.2. e 2.2.3., respectivamente). É de referir que os ensaios foram feitos em triplicado para cada estirpe estudada.

2.1.2.1. Contagem da *C. glabrata* em câmara de Neubauer

Num *ependorf*, fez-se uma diluição da suspensão celular de 1/100 em RPMI. Seguidamente, pipetaram-se 10 μ L para a câmara de Neubauer para se proceder à contagem no microscópio. No quadrado central da câmara contaram-se cinco quadrados pequenos (quatro quadrados dos cantos mais o central).

2.1.2.2. Contagem de células pelo método de Unidades Formadoras de Colónias (CFU)

Os poços utilizados para fazer CFUs foram lavados uma vez com 200 µL de PBS 1X e, de seguida, adicionaram-se 200 µL de PBS 1X e raspar muito bem o fundo dos poços. Posto isto, fizeram-se diluições sucessivas até 10^7 em PBS 1X e colocaram-se gotas de 10 µL em placas com SDA. Incubaram-se as placas durante 24 horas à temperatura de 37 °C. Passado o tempo referido, contaram-se o número de colónias formadas.

É necessário acrescentar que este procedimento foi feito em triplicado para cada estirpe estudada e que foi feito às 48 horas de crescimento e 24 h horas após a adição de anfotericina B.

2.1.2.3. Método de quantificação de Biomassa – Violeta Cristal

No início foi removido todo o conteúdo dos poços, seguindo-se a fixação do biofilme em 200 µL de metanol 100%, durante 15 minutos (na *hotte*). Passados os 15 minutos, foi retirado o metanol, deixou-se secar e depois procedeu-se à coloração dos biofilmes pela adição de 200 µL de Violeta Cristal durante 5 minutos. De seguida, retirou-se o Violeta Cristal e lavaram-se os biofilmes 2 vezes com água desionizada. Removeu-se a água desionizada, deixou-se secar bem e adicionaram-se 200 µL de ácido acético 33 %, para que o corante ligado à matriz se dissolvesse. Procedeu-se à leitura da absorvância a 570 nm.

2.1.3. Análise estatística

Os resultados foram comparados através da ANOVA (análise da variância) por aplicação do teste de múltiplas comparações *Dunnnett*, usando o *software GraphPad Prism* (versão 6.01 para *Windows, GraphPad Software, Inc.*). Todos os testes foram realizados com um intervalo de confiança de 95 %.

2.2. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

A figura 2.1 apresenta os resultados para os valores do número de células viáveis presentes nos biofilmes das estirpes de *C. glabrata* estudadas em presença de diferentes concentrações de anfotericina B.

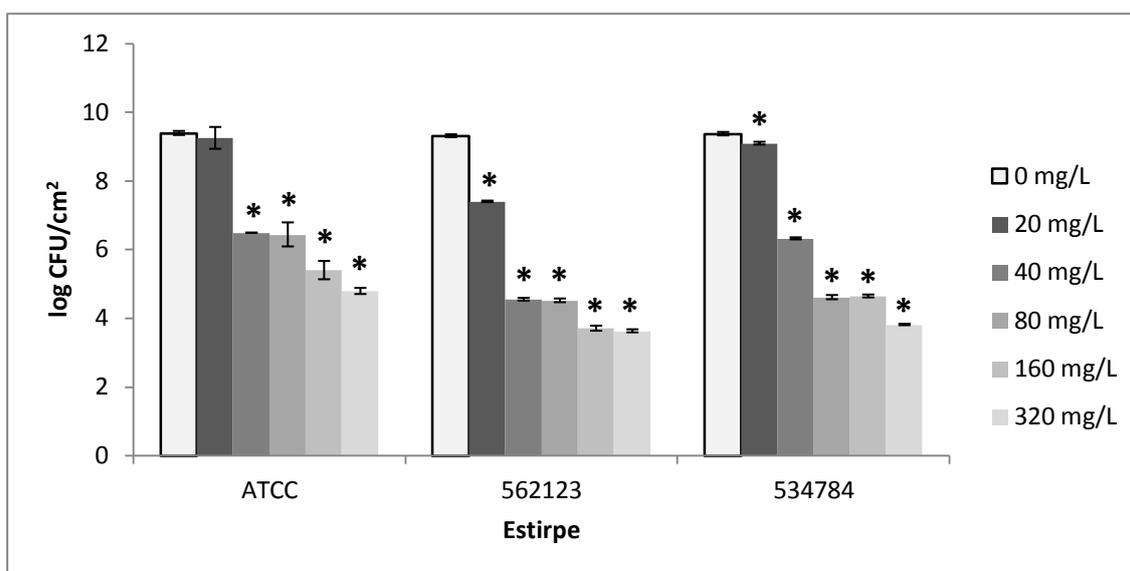


Figura 2.1. – Valores do logaritmo do número de células por cm^2 do biofilme de diferentes estirpes de *C. glabrata* em presença de diferentes concentrações de anfotericina B. As barras de erro são relativas ao desvio-padrão. (*) Diferenças significativas ($P < 0,05$) da redução do número de células de biofilme relativamente ao controlo (0 mg/L).

Como se pode observar na figura 2.1, a estirpe de referência, *C. glabrata* ATCC 2001, apresenta diferenças significativas ($P < 0,05$) na redução do número de células relativamente ao controlo ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2 = 9,389 \pm 0,059$) a partir da concentração de 40 mg/L de anfotericina B ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2 = 6,484 \pm 0,002$). Quer a *C. glabrata* 562123 quer a *C. glabrata* 534784 apresentam diferenças significativas a partir da concentração 20 mg/L de anfotericina B ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2 = 7,397 \pm 0,022$ e $\log \text{CFU}/\text{cm}^2 = 9,092 \pm 0,041$, respectivamente). Assim, a estirpe que apresenta células em biofilmes mais susceptíveis ao antifúngico é a *C. glabrata* 562123 e a menos é a *C. glabrata* ATCC 2001. Por fim, como se pode observar na figura 2.1, as três estirpes têm um crescimento em biofilme muito semelhante quando em ausência de antifúngico (controlo).

A figura 2.2 mostra os resultados da biomassa formada pelos biofilmes das estirpes de *C. glabrata* em presença de diferentes concentrações de anfotericina B.

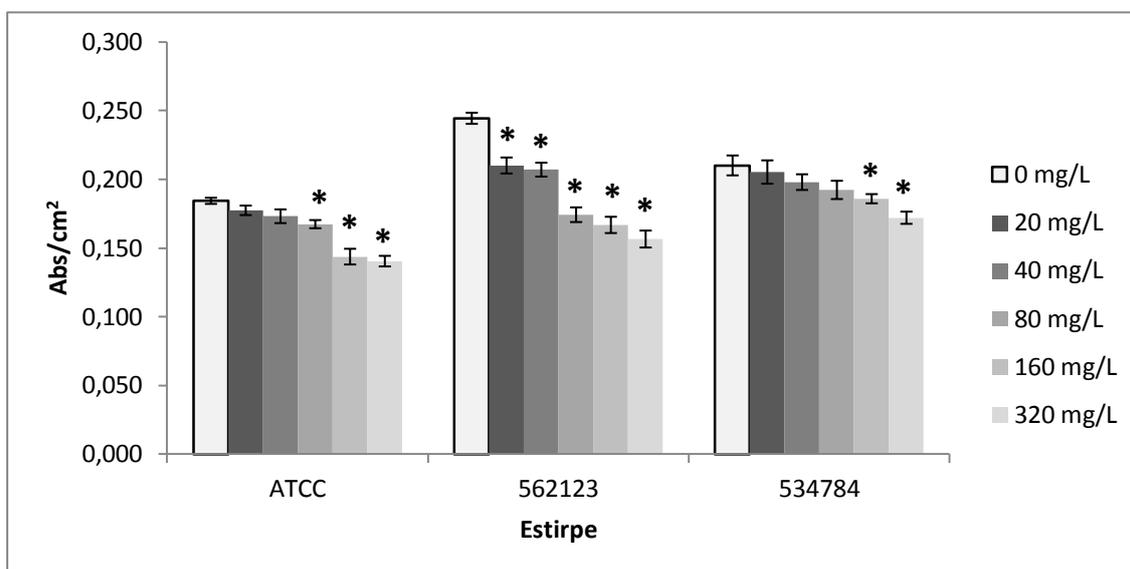


Figura 2.2. – Valores de absorvância (determinada pelo método de violeta cristal) por cm^2 , de diferentes estirpes de *C. glabrata*, em presença de diferentes concentrações de anfotericina B. As barras de erro são relativas ao desvio-padrão. (*) Diferenças significativas ($P < 0,05$) da redução da quantidade de biofilme formado relativamente ao controlo (0 mg/L).

Atendendo aos resultados apresentados na figura 2.2, pode verificar-se que em termos de biomassa a estirpe *C. glabrata* 562123 é a que apresenta biofilmes mais susceptíveis ao antifúngico, em oposição aos biofilmes de *C. glabrata* 534784. As estirpes estudadas *C. glabrata* ATCC 2001, *C. glabrata* 562123 e *C. glabrata* 534784 mostram diferenças significativas ($P < 0,05$) na redução da quantidade de biofilme formado em relação ao controlo ($\text{Abs}/\text{cm}^2 = 0,184 \pm 0,002$, $\text{Abs}/\text{cm}^2 = 0,244 \pm 0,004$ e $\text{Abs}/\text{cm}^2 = 0,210 \pm 0,007$, respectivamente) a partir das concentrações de anfotericina B de 80 mg/L ($\text{Abs}/\text{cm}^2 = 0,167 \pm 0,003$), 20 mg/L ($\text{Abs}/\text{cm}^2 = 0,210 \pm 0,006$) e 160 mg/L ($\text{Abs}/\text{cm}^2 = 0,186 \pm 0,003$), respectivamente. Além disso, tal como podemos observar na figura 2.2, *C. glabrata* 562123 é a estirpe que produz mais biomassa na ausência do fármaco.

2.3. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste estudo foi avaliada a susceptibilidade do biofilme de três estirpes de *C. glabrata* à anfotericina B.

As espécies de *Candida* são naturalmente susceptíveis à anfotericina B, apesar do seu uso relativamente frequente ao longo dos anos. No entanto, um estudo mostrou que existem isolados de *C. glabrata* mais resistentes ao tratamento com o polieno, enquanto outras espécies são totalmente susceptíveis [78], sendo que *C. glabrata* é susceptível de acordo com a estirpe e a dose administrada [77]. O estudo aqui apresentado apoia este facto, uma vez que para duas estirpes uma concentração de 20 mg/L de anfotericina B foi capaz de reduzir significativamente o número de células viáveis do biofilme em relação ao controlo e para outra foi necessária a concentração de 40 mg/L do mesmo antifúngico. Além disso, mostrou que a estirpe *C. glabrata* 562123 (estirpe urinária) é a menos resistente à anfotericina B, visto que em presença da concentração de 20 mg/L (concentração utilizada mais baixa) foi a que teve uma maior redução significativa de células viáveis do biofilme em relação ao controlo. *Candida glabrata* 534784 (estirpe vaginal) também teve uma redução significativa de células na concentração de 20 mg/L de antifúngico, no entanto esta foi uma redução menor. Sendo a anfotericina B eficaz contra *C. glabrata*, seria de esperar que quanto maior a concentração (a partir da qual esta é significativamente eficaz), menor a quantidade de células viáveis no biofilme. Contudo, na figura 2.1 mostra que em todas as estirpes existem casos em que não ocorre redução de células e outros em que aumenta em certas concentrações. Nomeadamente, na estirpe *C. glabrata* ATCC 2001, a diferença entre o número de células viáveis das concentrações de 40 mg/L e 80 mg/L de anfotericina B é muito pequena. Na estirpe *C. glabrata* 562123, o fenómeno ocorre em duas situações: nas concentrações de 40 mg/L e 80 mg/L e nas concentrações de 160 mg/L e 320 mg/L de anfotericina B. Por fim, ao contrário do que seria de esperar, *C. glabrata* 534784 sofre um aumento do número de células entre as concentrações de 80 mg/L e 160 mg/L de anfotericina B. A existência de células persistentes pode explicar os acontecimentos descritos anteriormente. Estas células são variantes das células normais altamente tolerantes a antifúngicos, continuando viáveis em presença de altas concentrações destes [50,58]. As células de biofilme que não foram eliminadas pela anfotericina B produziram uma nova subpopulação de células persistentes, aumentando a população mesmo em presença do antifúngico [50].

O violeta cristal é um método indirecto que quantifica a biomassa dos biofilmes formados pelas espécies de *Candida* numa superfície abiótica [93]. Utilizando-se este método e observando a figura 2.2, verifica-se que *C. glabrata* 534784 é a estirpe que apresenta maior biomassa na presença de anfotericina B, seguindo-se *C. glabrata* ATCC 2001 e, por fim, *C. glabrata* 562123. Este resultado não está concordante com o resultado da contagem de CFUs que mostrou que a estirpe com maior número de células de biofilme é *C. glabrata* ATCC 2001 e não *C. glabrata* 534784. No entanto, no caso da contagem de CFUs, quantifica-se o número de células viáveis no biofilme, enquanto no ensaio com coloração do violeta cristal, o corante liga-se indiferentemente a moléculas negativamente carregadas, sendo por isso todo o biofilme (células viáveis e não viáveis e matriz) marcado [94], daí a diferença nos resultados. Foi observado nos resultados que quanto maior a concentração de anfotericina B, menor a quantidade de biofilme formado, o que acontece para todas as estirpes. *Candida glabrata* 562123, apesar de ser a estirpe com o biofilme menos resistente, é a estirpe com mais capacidade na formação de biofilme. Este resultado corrobora os de outro estudo onde foi demonstrado que diferentes estirpes da *C. glabrata* têm diferente habilidade para formar biofilme [95].

CAPÍTULO 3 – EXPRESSÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA DE *Candida glabrata* NA PRESENÇA DE ANFOTERICINA B

A anfotericina B é um antifúngico que pertence à classe dos polienos que se liga ao ergosterol da membrana celular do fungo, resultando em alterações na permeabilidade, pela formação de poros, permitindo a perda de iões e componentes intracelulares e, conseqüentemente, morte celular [75-77]. A anfotericina B tem sido usada desde há muitos anos e os fenómenos de resistência são muito raros [77,78], contudo pode ocorrer. Devido ao facto da resistência ser incomum, os mecanismos de resistência aos polienos são pouco entendidos nos isolados clínicos. Como o ergosterol é o alvo destes fármacos, a resistência resulta da diminuição de ergosterol, ocorrendo mutações nos genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de ergosterol [34,77]. A biossíntese de ergosterol ocorre pela activação de um conjunto de vários genes necessários na conversão de co-enzima A em ergosterol [91].

Os genes *ERG3*, *ERG6* e *ERG11* são três dos genes que codificam enzimas durante a síntese do ergosterol e serão os estudados durante este trabalho. Estes foram os escolhidos por serem os mais importantes e é possível que estejam relacionados com a resistência aos polienos, sendo por isso importante perceber como se expressam na sua presença. Assim, o objectivo desta parte é avaliar o comportamento de *C. glabrata* relativamente à expressão dos três genes referidos na presença de anfotericina B.

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste subcapítulo encontram-se descritos os materiais e métodos utilizados no decorrer do trabalho experimental.

As estirpes usadas durante o trabalho experimental foram a *C. glabrata* ATCC (American Type Culture Collection) 2001 (estirpe de referência), *C. glabrata* 562123 (estirpe urinária) e a *C. glabrata* 534784 (estirpe vaginal). As últimas foram fornecidas pelo Hospital de Braga. Em todos os procedimentos descritos a seguir foram utilizadas as três estirpes referidas anteriormente.

O antifúngico testado foi a anfotericina B comprada na empresa Sigma-Aldrich.

3.1.1. Meios e reagentes

3.1.1.1. Preparação da *Candida glabrata*

Verificar procedimento no capítulo 2, subcapítulo 2.1. e secção 2.1.1.1..

3.1.1.2. *Sabouraud Dextrose Broth*

Verificar procedimento no capítulo 2, subcapítulo 2.1. e secção 2.1.1.2..

3.1.1.3. *Sabouraud Dextrose Agar*

Verificar procedimento no capítulo 2, subcapítulo 2.1. e secção 2.1.1.3..

3.1.1.4. Tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,5 – Solução *Stock* 10x concentrado

Verificar procedimento no capítulo 2, subcapítulo 2.1. e secção 2.1.1.5..

3.1.1.5. Soluções de Anfotericina B

As soluções de anfotericina B foram preparadas a partir de alíquotas de 1 mg/mL preparadas em SDB.

As soluções são preparadas com as alíquotas e SDB.

Tabela 3.1. – Volumes necessários para obter cada concentração na preparação de 50 mL de solução final de anfotericina B.

Concentrações (mg/L)	V _{aliquota de anfotericina B} (mL)	V _{SDB} (mL)
1	0,05	49,95
2	0,1	49,90

3.1.2. Crescimento dos biofilmes de *C. glabrata*

Inicialmente repicaram-se as três estirpes em estudo em placas de cultura em SDA sólido e incubaram-se durante 24 horas à temperatura de 37 °C. De seguida, foi inoculada uma colónia em 30 mL de SDB num matraz de 100 mL e incubou-se durante 18 horas à temperatura de 37 °C. Passado o tempo referido, a suspensão obtida foi centrifugada a 3000 g, 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi rejeitado e lavou-se com 15 mL de PBS 1X, centrifugando novamente

sob as mesmas condições. Repetiu-se este procedimento. Por fim, ressuspendeu-se em 5 mL de SDB e vortexou-se.

Posteriormente contou-se o número de células na câmara de Neubauer (ver procedimento 1.1.) e acertou-se para que as concentrações finais fossem de 1×10^7 cel/mL e de 2×10^7 cel/mL para a ausência e presença de anfotericina B, respectivamente.

No caso das células planctónicas de *C. glabrata* sem anfotericina B, depois de obter a solução padronizada, transferiram-se 20 mL desta para um matraz de 100 mL. Incubou-se durante 24 horas à temperatura de 37 °C e 120 rpm. Passadas as 24 horas, metade do meio foi renovado, isto é, removeram-se os 10 mL da suspensão celular e adicionaram-se 10 mL de SDB. Voltou a incubar-se durante 24 horas à temperatura de 37 °C e 120 rpm. Relativamente às células planctónicas da *C. glabrata* em presença de anfotericina B, depois de obter a solução padronizada, transferiram-se 5 mL desta e 5 mL de anfotericina B para um matraz de 100 mL. Foram testadas as seguintes concentrações 1 e 2 mg/L. Incubou-se durante 24 horas à temperatura de 37 °C e 120 rpm. Passadas as 24 horas, metade do meio foi renovado, isto é, removeram-se 5 mL da suspensão celular e adicionaram-se 5 mL de antifúngico.

No caso da formação do biofilme de *C. glabrata* em ausência de anfotericina B, depois de obter a solução padronizada, transferiram-se 500 µL desta para cada poço da placa de 24 poços, à excepção de 1 coluna (500 µL de SDB que serviu de controlo para detectar eventuais contaminações). Incubou-se durante 24 horas à temperatura de 37 °C e 120 rpm. Passadas as 24 horas, metade do meio foi renovado, isto é, removeram-se os 250 µL da suspensão celular e adicionaram-se 250 µL de SDB. Voltou a incubar-se durante 24 horas à temperatura de 37 °C e 120 rpm. Relativamente à formação do biofilme de *C. glabrata* em presença de anfotericina B, depois de obter a solução padronizada, transferiu-se 250 µL desta e 250 µL de anfotericina B para cada poço da placa de 24 poços, à excepção de 1 coluna (500 µL de SDB que serviu de controlo para detectar eventuais contaminações). Foram testadas as seguintes concentrações 1 e 2 mg/L. Incubou-se durante 24 horas à temperatura de 37 °C e 120 rpm. Passadas as 24 horas, metade do meio foi renovado, isto é, removeram-se os 250 µL da suspensão celular e adicionaram-se 250 µL de antifúngico.

Neste procedimento, os ensaios foram feitos em duplicado para cada estirpe estudada e utilizados na extracção de RNA. Foram estudados 3 genes durante este procedimento: *ERG3*, *ERG6* e *ERG11*. Além disso, foi estudado o comportamento do gene actina para normalização.

3.1.3. Extração de RNA

a) Células planctónicas

Após o crescimento, transferiram-se 10 mL para um tubo de Falcon e a suspensão celular foi centrifugada (8000 g, 5 minutos a 4 °C). O sobrenadante foi rejeitado e lavou-se com PBS 1X. Repetiu-se este procedimento. Depois, as células foram recolhidas em 500 µL de *Lysis buffer* com 2-mercaptoetanol 1% e passou-se para um *ependorf RNA-free* com *glass beads*. Romperam-se as células no rotor-stator à velocidade máxima (6,5) por 30 segundos 2 vezes com intervalos de um minuto em gelo. Centrifugaram-se as células durante 5 minutos a 4 °C e 14000 rpm, transferindo-se o sobrenadante para um *ependorf RNA-free*.

b) Biofilme

Depois do crescimento, retiraram-se os 500 µL de suspensão celular e lavou-se com 500 µL de PBS 1X e rejeitou-se. Repetir este procedimento. De seguida, raspam-se bem os poços, transferiu-se o seu conteúdo para um tubo de Falcon e a suspensão foi centrifugada (8000 g, 5 minutos a 4 °C). Ressuspendeu-se o pellet em 500 µL de *Lysis buffer* com 2-mercaptoetanol 1% e passou-se para um *ependorf RNA-free* com *glass beads*. Romperam-se as células no rotor-stator à velocidade máxima (6,5) por 30 segundos 2 vezes com intervalos de um minuto em gelo. Centrifugaram-se as células durante 5 minutos a 4 °C e 14000 rpm, transferindo-se o sobrenadante para um *ependorf RNA-free*.

c) Procedimento comum de células planctónicas e de biofilmes (a e b)

Adicionou-se um volume de etanol 70⁰ RNAse-free por cada volume de amostra e vortexou-se bem, para que qualquer precipitado visível que se tenha formado após a adição de etanol se dispersasse. Purificou-se o RNA com *Pure Link RNA Mini Kit*, transferindo-se cerca de 500 µL do preparado para a "*Spin Cartridge*", a coluna com os tubos *Pure Link RNA Mini Kit*. De seguida, centrifugou-se (15 s., temperatura ambiente e 12000 g), descartou-se o que ficou no tubo e recolocou-se a coluna no mesmo tubo. Voltou a purificar-se o RNA com *Pure Link RNA Mini Kit*, transferindo-se cerca de 500 µL do preparado para a "*Spin Cartridge*", centrifugou-se (15 s., temperatura ambiente e 12000 g) e rejeitou-se o sobrenadante. Depois, adicionaram-se 700 µL de *wash buffer I* directamente na coluna, centrifugou-se (15 s., temperatura ambiente e

12000 g) e descartou-se o tubo com o precipitado. Colocou-se a coluna num novo tubo. Adicionaram-se 500 µL de *wash buffer II* com etanol directamente na coluna, centrifugou-se (15 s., temperatura ambiente e 12000 g), descartou-se o que ficou no tubo e colocou-se a coluna no mesmo tubo. Repetiu-se o passo anterior. Seguidamente, centrifugou-se (1 min, temperatura ambiente e 12000 g) para que a membrana ficasse seca, descartou-se o tubo e colocou-se a coluna no “*Recovery Tube*”. Adicionaram-se cerca de 50 µL de *RNAse-free water* no centro da coluna, incubando-se à temperatura ambiente durante 2 min e, de seguida, centrifugou-se (1 min, temperatura ambiente e 12000 g). Após todo o processo descrito de purificação do RNA, tratou-se com *DNase I treatment (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade)*, adicionando-se por cada 50 µL de amostra de 5x *DNase buffer* com MgCl₂, 1 µL de *DNase I Amplification Grade* directamente na amostra e incubou-se 15 min à temperatura ambiente. Por fim, para inactivar a DNase, adicionou-se 1 µL de EDTA 25 mM (1 µL/10 µL de amostra) e incubou-se 10 min à temperatura de 65 °C.

3.1.4. Síntese de cDNA

No caso da síntese de cDNA foi necessária a preparação de uma *Master Mix*. Para a preparação desta, mediram-se para cada amostra: 8 µL de 5x *iscript reaction mix*, 2 µL de *iscript Reverse Transcriptase*, 20 µL de *Nuclease free-water* e 10 µL de *RNA Template*, perfazendo um volume de 40 µL de *Master Mix* para cada amostra. Incubaram-se as amostras 5 min à temperatura de 25 °C, 30 min à temperatura de 42 °C e 5 min à temperatura de 85 °C. Congelaram-se as amostras até à sua utilização para o *RT-qPCR*.

3.1.5. Nanodrop

Inicialmente limpou-se o *Nanodrop* adicionando 2 µL de *RNAse free-water*. A seguir, adicionaram-se 2 µL de amostra de RNA e mediu-se a absorvância a 230, 260 e 280 nm, de forma que fossem obtidas as razões A260/A280 e A260/A230.

3.1.6. RT-qPCR

No início foi necessária a preparação de uma *Master Mix*. Para a preparação desta, mediram-se para cada amostra: 5,6 µL de *RNAse free water*, 10 µL de *Master Mix*, 0,2 µL de

Primer Forward do gene correspondente e 0,2 µL de *Primer Reverse* do gene correspondente. Conservou-se no frio até à sua utilização. Depois procedeu-se à diluição das amostras de cDNA (1/5) e às diluições do DNA genómico (1/32, 1/64, 1/128, 1/256 e 1/512).

Após a preparação de todos os pontos necessários, procedeu-se à montagem da placa de leitura para o *RT-qPCR*. 1 negativo composto por 16 µL de *Master Mix* e 4 µL de *RNAse-free water*, para todas as amostras testadas 16 µL de *Master Mix* e 4 µL de amostra, nRT e as diluições de DNA genómico. Por último, pôs-se o *RT-qPCR* a correr num procedimento já otimizado pelo *Candida* group.

3.2. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os níveis de expressão dos genes envolvidos na biossíntese de ergosterol foram determinados por *RT-qPCR*. O estudo foi feito com *C. glabrata* ATCC 2001, *C. glabrata* 562123 e *C. glabrata* 534784 na forma planctónica e na forma de biofilme e com duas concentrações diferentes de anfotericina B (1 mg/L e 2 mg/L).

Quando se avaliam os resultados da expressão genética verifica-se a subexpressão e sobreexpressão de genes, quando comparados com o controlo.

A figura 3.1 (A) mostra os resultados para a estirpe *C. glabrata* ATCC 2001 em relação ao gene *ERG3*, *ERG6* e *ERG11*. No caso das células planctónicas em relação ao gene *ERG3*, tal como é possível observar, houve uma sobreexpressão do gene na presença de anfotericina B quando comparado com a ausência desta (controlo). Quando em biofilme, isto não se verificou. No que diz respeito ao gene *ERG6*, é possível observar que para a concentração de 1 mg/L de anfotericina B existe uma notória sobreexpressão do gene nas células planctónicas (*fold change* = $3,491 \pm 0,192$) quando comparado com o controlo (*fold change* = $1,000 \pm 0,000$), sendo o único caso em que tal facto acontece. Em relação ao gene *ERG11*, observando a figura 3.1. (A), este foi notoriamente sobreexpresso nas células planctónicas quando em presença de 1 mg/L de concentração de anfotericina B (*fold change* = $5,464 \pm 0,781$) quando comparado com a referência.

Resistência da *Candida glabrata* a diferentes concentrações de antifúngico

Expressão de genes de resistência de *Candida glabrata* na presença de anfotericina B

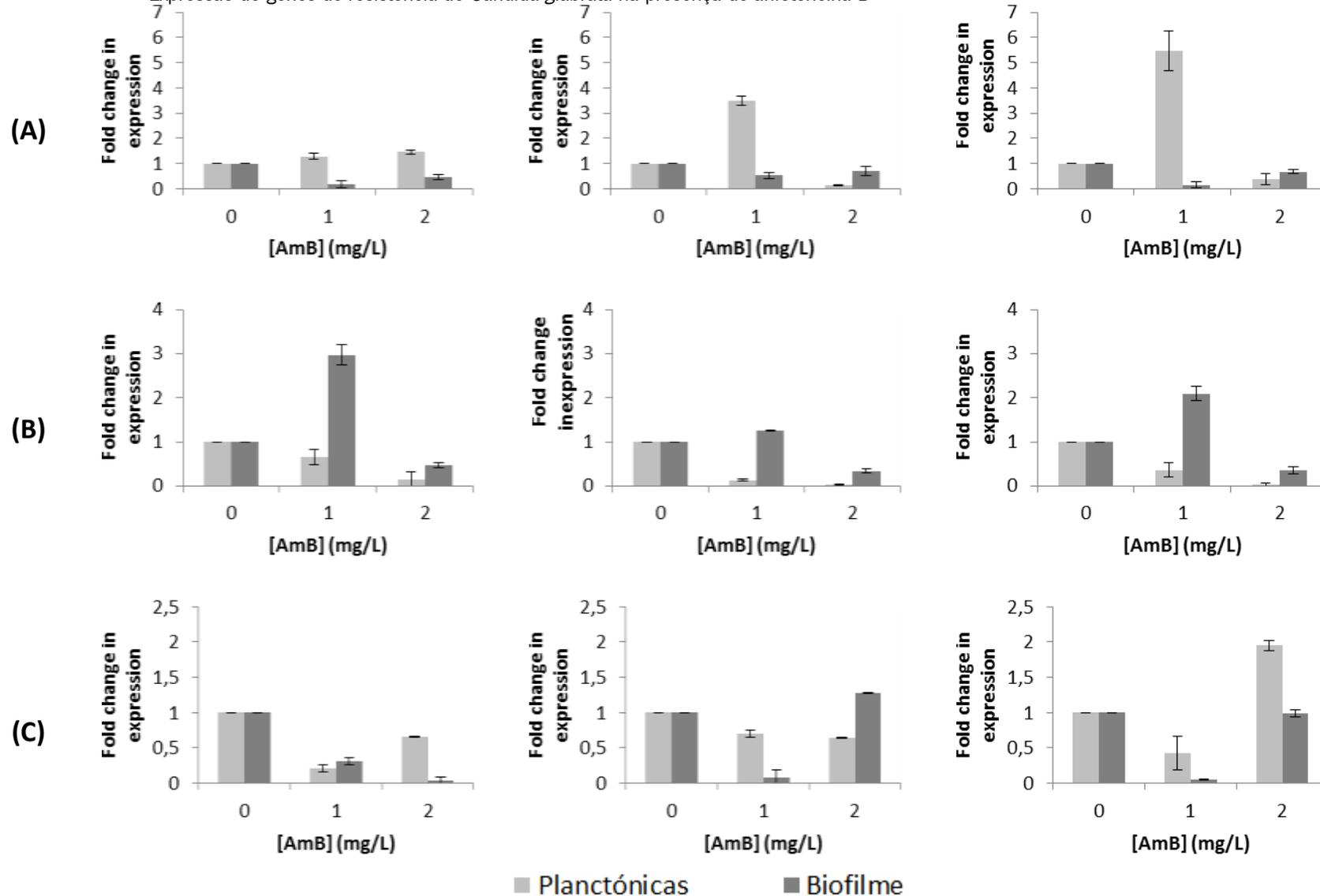


Figura 3.1. – Níveis de expressão dos genes *ERG3*, *ERG6* e *ERG11* (da esquerda para a direita) na biossíntese do ergosterol para a estirpe (A) *C. glabrata* ATCC 2001, (B) *C. glabrata* 562123 e (C) *C. glabrata* 534784. Os resultados foram normalizados pelo gene actina, pois é sempre expresso. As barras de erro correspondem aos desvios-padrão.

Relativamente à figura 3.1 (B), esta mostra os resultados para a estirpe *C. glabrata* 562123 para os genes *ERG3*, *ERG6* e *ERG11*. No caso das células planctónicas para o gene *ERG3*, tal como é possível observar, não houve uma sobreexpressão do gene na presença de anfotericina B quando comparado com a sua ausência. Em relação ao biofilme, ocorreu uma sobreexpressão do gene na concentração de 1 mg/L de anfotericina B ($fold\ change = 2,974 \pm 0,232$), contudo não ocorreu o mesmo para a concentração de 2 mg/L. No que diz respeito ao gene *ERG6*, apenas existiu uma sobreexpressão do gene no biofilme para a concentração de 1 mg/L ($fold\ change = 1,250 \pm 0,008$) de antifúngico. Nos restantes casos, houve uma regulação expectável dos genes, isto é, foram subexpressos relativamente ao controlo. Relativamente à expressão do gene *ERG11*, unicamente houve um aumento da expressão no biofilme e na concentração de 1 mg/L de anfotericina B ($fold\ change = 2,089 \pm 0,160$).

Na figura 3.1 (C) estão os resultados para a estirpe *C. glabrata* 534784 em relação aos genes *ERG3*, *ERG6* e *ERG11*. No caso do gene *ERG3*, quer para as células planctónicas quer para o biofilme, não ocorreu sobreexpressão do gene. Em relação ao gene *ERG6*, houve uma sobreexpressão do gene para o biofilme e para uma concentração de fármaco de 2 mg/L ($fold\ change = 1,273 \pm 0,005$). Por fim, relativamente ao gene *ERG11*, existiu apenas sobreexpressão do gene nas células planctónicas e na presença de 2 mg/L de anfotericina B ($fold\ change = 1,946 \pm 0,078$).

3.3. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Ao contrário dos azóis, a resistência à anfotericina B é um fenómeno raro em isolados clínicos em fungos patogénicos, no entanto alguns casos começaram a ocorrer nos últimos anos [34]. Apesar deste facto, os mecanismos moleculares continuam a não ser conhecidos [92]. Vários estudos foram realizados sobre a expressão de vários genes *ERG* em *C. glabrata* quando em presença de azóis, em especial o fluconazole. Os genes *ERG3* e *ERG11* estão relacionados entre si e associados à resistência aos azóis. Por um lado, se o gene *ERG11* não for expresso, o gene *ERG3* é sobreexpresso. Por outro lado, se o gene *ERG3* não for expresso, o gene *ERG11* é sobreexpresso [97]. É de salientar que na via metabólica o gene *ERG11* é expresso mais cedo do que o gene *ERG3* (no final da síntese) [98]. Em relação à influência da anfotericina B, foram feitos estudos sobre mutações no gene *ERG* potencialmente causadoras da resistência ao polieno. Contudo, sobre o perfil da expressão dos genes *ERG* não se encontram estudos, portanto o presente trabalho torna-se importante por abordar o tema. A anfotericina B liga-se ao ergosterol, que é o principal esteróide da membrana celular dos fungos [34]. Os azóis têm como alvo a biossíntese do ergosterol por inibição da enzima codificada pelo gene *ERG11* [96]. Assim sendo, as duas classes de agentes antifúngicos não têm o mesmo alvo sendo de esperar que a expressão dos genes *ERG* de *C. glabrata* em presença de anfotericina B e de fluconazole seja divergente nos resultados.

Neste trabalho foram estudados os genes *ERG3* (passagem de episterol a ergoste-5,7,24(28)-trienol), *ERG6* (passagem de 4,4-dimetilzimosterol a fecosterol) e *ERG11* (passagem de lanosterol a 4,4-dimetilcoleste-8,14,24-trienol), envolvidos na biossíntese de ergosterol, em presença de anfotericina B. As concentrações de 1 mg/L e 2 mg/L do polieno foram adicionadas depois de formado o biofilme, às 24 horas de crescimento. As concentrações referidas foram retiradas de um estudo anterior desenvolvido no grupo, onde foram determinadas as concentrações mínimas inibitórias de suspensões destas estirpes. Em relação à estirpe *C. glabrata* ATCC 2001, observou-se que houve uma sobreexpressão dos três genes nas células planctónicas quando em presença de 1 mg/L de anfotericina B. Contudo, para uma concentração maior (2 mg/L), o gene *ERG3* foi o único sobreexpresso. O gene *ERG6* foi o mais expresso nas células planctónicas. Relativamente à estirpe *C. glabrata* ATCC 2001 na forma de biofilme, nenhum dos genes teve maior expressão na presença do antifúngico do que em ausência deste. Todavia, a expressão dos três genes na presença de 1 mg/L de anfotericina B é

menor do que na concentração de 2 mg/L. No que diz respeito à expressão dos genes nas células planctónicas na estirpe *C. glabrata* 562123, em nenhum caso houve sobreexpressão quando comparada com a referência. No entanto, a expressão dos genes foi maior na concentração de 1 mg/L de anfotericina B do que na concentração de 2 mg/L. No caso dos biofilmes em presença de 1 mg/L do fármaco, houve maior expressão de todos os genes do que na referência. O gene *ERG3* foi o gene com maior expressão. A expressão dos três genes nas duas estirpes referidas parece dar a indicação de um padrão, visto que em *C. glabrata* ATCC 2001, à medida que a concentração de anfotericina B aumenta, a expressão dos três genes no biofilme também aumenta, o que faz sentido, visto que se há perda de ergosterol na forma pura na membrana celular é natural que a célula responda a esta agressão com o objectivo de aumentar a sua produção e fazer a devida restituição. Em *C. glabrata* 562123, a expressão dos três genes nas células planctónicas diminui quando a concentração de anfotericina B aumenta, indicando a fragilidade desta estirpe ao fármaco. Quanto à *C. glabrata* 534784 houve apenas dois casos de sobreexpressão: *ERG6* nas células de biofilme e *ERG11* nas células planctónicas na concentração de 2 mg/L de anfotericina B. É de referir que todos os genes são expressos, mesmo o *ERG3* numa fase mais tardia, portanto a biossíntese do ergosterol não ficou bloqueada com a presença de anfotericina B. Este facto é esperado, visto que o polieno se liga directamente à molécula de ergosterol de forma definitiva e não interferindo na sua síntese [34]. Assim, a sobreexpressão dos genes é no sentido de repor o ergosterol nos poros, de forma a colmatarem esses interstícios produzidos à superfície da membrana celular. Além disso, conclui-se que a presença de anfotericina B provoca alterações na expressão dos genes estudados em determinadas situações.

A diferença de subexpressão em todas as estirpes, no que diz respeito à concentração de 2 mg/L, prender-se-á possivelmente com o facto de esta, como já foi analisado, ser uma concentração mais letal que a de 1 mg/L, não dando a possibilidade de ajuste genético das células à agressão do meio por parte do antifúngico.

CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As infecções causadas por *C. glabrata* têm vindo a aumentar nos últimos anos, sendo esta a segunda maior causa de problemas provocados pelas espécies de *Candida* e responsável por uma elevada taxa de mortalidade. *Candida glabrata* é naturalmente resistente a determinados antifúngicos e a sua capacidade de formar biofilme torna-a ainda mais resistente.

Assim, este trabalho estudou a susceptibilidade de três estirpes de *C. glabrata* à anfotericina B. Quanto às células viáveis presentes em biofilmes, todas tiveram um crescimento semelhante na ausência de anfotericina B. Porém, quando sujeitas a diversas concentrações do antifúngico, estas tiveram diferentes comportamentos. *Candida glabrata* ATCC 2001 necessitou de uma maior concentração de anfotericina B para reduzir significativamente as suas células do que *C. glabrata* 562123 e *C. glabrata* 534784. As duas últimas precisaram da mesma quantidade para reduzir significativamente o número de células, no entanto *C. glabrata* 562123 ficou com um número menor de células. Portanto, a estirpe que apresentou células mais resistentes à anfotericina B, quando em biofilme, foi *C. glabrata* ATCC 2001, em oposição a *C. glabrata* 562123. No que diz respeito à quantificação de biofilme formado, o trabalho demonstrou que todas formam biofilmes, porém *C. glabrata* 562123 produz mais biomassa para o mesmo tempo de crescimento ao contrário de *Candida glabrata* ATCC 2001. Este método mostrou que *C. glabrata* 562123 necessita de menor quantidade de anfotericina B para reduzir significativamente a quantidade de biofilme formado do que *C. glabrata* ATCC 2001 e *C. glabrata* 534784. Pode-se então concluir, pelos dois métodos, que a estirpe mais susceptível é *C. glabrata* 562123. Além disso, conclui-se que a anfotericina B é eficaz em biofilmes, embora dependente da concentração e da estirpe.

O trabalho aqui descrito abordou também a expressão genética de *C. glabrata* em presença de anfotericina B. Estudaram-se os genes *ERG3*, *ERG6* e *ERG11* nas três estirpes na forma planctónica e de biofilme, sob as mesmas condições. Conclui-se que o gene *ERG3* é sobreexpresso nas estirpes *C. glabrata* ATCC 2001 e *C. glabrata* 562123. Os genes *ERG6* e *ERG11* são sobreexpressos em todas as estirpes. Contudo, esta sobreexpressão não se verifica em todas as concentrações de antifúngico nem em todas as formas. Portanto, conclui-se que a presença de anfotericina B influencia a expressão dos três genes, embora dependente da forma de crescimento, da estirpe e da concentração de agente.

Em trabalhos futuros seria bastante importante estudar a composição da matriz do biofilme, uma vez que é consensual que esta pode actuar como uma barreira na difusão de agentes antifúngicos, limitando o acesso destes às células do biofilme. Outra razão para o estudo da matriz é o facto de proteger o biofilme contra o sistema imunitário do hospedeiro, dificultando o combate à infecção. Em *C. glabrata* a matriz tem maior quantidade de proteínas e hidratos de carbono do que em outras espécies de *Candida*, podendo estar relacionado com o facto de esta ser mais virulenta do que estas últimas.

Devido ao facto dos mecanismos moleculares serem tão pouco conhecidos, seria interessante estudar de que forma a sobreexpressão dos genes aqui estudados pode ter influência na resistência de *C. glabrata* à anfotericina B, estudando possíveis mutações nos genes *ERG3*, *ERG6* e *ERG11*. Além disso, pode estudar-se a influência que a expressão de cada gene pode ter na expressão de outro gene quando a anfotericina B está presente, uma vez que toda a biossíntese pode ser afectada pela ausência do ergosterol que o polieno tem como alvo. Assim, os níveis de ergosterol presentes na membrana e possivelmente também na matriz também são importantes para estudar, pois a sua falta pode levar à resistência aos polienos, assim como níveis de outros esteróides formados ao longo da biossíntese. Esta quantificação poderia ser efetuada através de HPLC (*High-pressure liquid chromatography*). Seria também interessante estudar outras classes de genes, nomeadamente os transportadores ABC, envolvidos no transporte de compostos estranhos à célula. O gene *CDR1*, que codifica um destes transportadores, quando é sobreexpresso pode estar relacionado com um aumento da susceptibilidade a polienos. Além disso, os transportadores podem contribuir para o ganho de virulência em *C. glabrata*. Através de um RT-qPCR podem ser encontrados os perfis dos genes que codificam os transportadores ABC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] P. Vandeputte, S. Ferrari, and A. T. Coste, “Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections.,” *International journal of microbiology*, vol. 2012, p. 713687, Jan. 2012.
- [2] S. Silva, M. Henriques, A. Martins, R. Oliveira, D. Williams, and J. Azeredo, “Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition.,” *Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, vol. 47, no. 7, pp. 681–9, Nov. 2009.
- [3] S. K. Fridkin and W. R. Jarvis, “Epidemiology of nosocomial fungal infections.,” *Clinical microbiology reviews*, vol. 9, no. 4, pp. 499–511, Oct. 1996.
- [4] V. Magalhães, “Utilização de equinocandinas na terapia antifúngica em neonatos,” Recife, 2012.
- [5] J. C. França, C. E. Ribeiro, and F. Queiroz-Telles, “Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos,” *Revista da Sociedade Brasileira de medicina Tropical*, vol. 41, no. 1, pp. 23–28, 2008.
- [6] D. L. Horn, D. Neofytos, E. J. Anaissie, J. a Fishman, W. J. Steinbach, A. J. Olyaei, K. a Marr, M. a Pfaller, C.-H. Chang, and K. M. Webster, “Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry.,” *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 48, no. 12, pp. 1695–703, Jun. 2009.
- [7] R. K. Pelz, C. W. Hendrix, S. M. Swoboda, M. Diener-West, W. G. Merz, J. Hammond, and P. a Lipsett, “Double-blind placebo-controlled trial of fluconazole to prevent candidal infections in critically ill surgical patients.,” *Annals of surgery*, vol. 233, no. 4, pp. 542–8, Apr. 2001.
- [8] D. Peres-Bota, H. Rodriguez-Villalobos, G. Dimopoulos, C. Melot, and J.-L. Vincent, “Potential risk factors for infection with *Candida spp.* in critically ill patients.,” *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 10, no. 6, pp. 550–5, Jun. 2004.
- [9] M. A. Jabra-Rizk, W. a Falkler, and T. F. Meiller, “Fungal biofilms and drug resistance.,” *Emerging infectious diseases*, vol. 10, no. 1, pp. 14–9, Jan. 2004.
- [10] G. Ramage, K. Vande Walle, B. L. Wickes, and L. Lo, “Biofilm Formation by *Candida dubliniensis*,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 39, no. 9, pp. 3234–3240, 2001.

- [11] M. Nucci and K. a Marr, "Emerging fungal diseases.," *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 41, no. 4, pp. 521–6, Aug. 2005.
- [12] W. E. Trick, S. K. Fridkin, J. R. Edwards, R. a Hajjeh, and R. P. Gaynes, "Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999.," *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 35, no. 5, pp. 627–30, Sep. 2002.
- [13] S. K. Fridkin, "The changing face of fungal infections in health care settings.," *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 41, no. 10, pp. 1455–60, Nov. 2005.
- [14] P. G. Pappas, J. H. Rex, J. Lee, R. J. Hamill, R. A. Larsen, W. Powderly, C. A. Kauffman, N. Hyslop, J. E. Mangino, S. Chapman, H. W. Horowitz, J. E. Edwards, W. E. Dismukes, N. Mycoses, and S. Group, "A Prospective Observational Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients," vol. 37, pp. 634–643, 2003.
- [15] H. M. Blumberg, W. R. Jarvis, J. M. Soucie, J. E. Edwards, J. E. Patterson, M. A. Pfaller, M. S. Rangel-frausto, M. G. Rinaldi, L. Saiman, R. T. Wiblin, R. P. Wenzel, and S. Group, "Risk Factors for Candidal Bloodstream Infections in Surgical Intensive Care Unit Patients : The NEMIS Prospective Multicenter Study," vol. 33, pp. 177–186, 2001.
- [16] P. G. Pappas, J. H. Rex, J. D. Sobel, S. G. Filler, W. E. Dismukes, T. J. Walsh, and J. E. Edwards, "Guidelines for treatment of candidiasis.," *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 38, no. 2, pp. 161–89, Jan. 2004.
- [17] M. P. Giolo, T. Inez, and E. Svidzinski, "Fisiopatogenia , epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia," vol. 46, no. 3, pp. 225–234, 2010.
- [18] M. H. Miceli, J. a Díaz, and S. a Lee, "Emerging opportunistic yeast infections.," *The Lancet infectious diseases*, vol. 11, no. 2, pp. 142–51, Feb. 2011.
- [19] J. C. O. Sardi, L. Scorzoni, T. Bernardi, a M. Fusco-Almeida, and M. J. S. Mendes Giannini, "*Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options.," *Journal of medical microbiology*, vol. 62, no. Pt 1, pp. 10–24, Jan. 2013.
- [20] L. J. Douglas, "*Candida* biofilms and their role in infection.," *Trends in microbiology*, vol. 11, no. 1, pp. 30–6, Jan. 2003.
- [21] M. a Pfaller, D. J. Diekema, G. W. Procop, and M. G. Rinaldi, "Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida spp.*," *Journal of clinical microbiology*, vol. 45, no. 11, pp. 3522–8, Nov. 2007.

- [22] D. G. Maki and P. a Tambyah, "Engineering out the risk for infection with urinary catheters.," *Emerging infectious diseases*, vol. 7, no. 2, pp. 342–7, 2001.
- [23] S. Silva, M. Negri, M. Henriques, R. Oliveira, D. W. Williams, and J. Azeredo, "Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species.," *Trends in microbiology*, vol. 19, no. 5, pp. 241–7, May 2011.
- [24] J. Chandra, D. M. Kuhn, P. K. Mukherjee, L. L. Hoyer, T. M. C. Cormick, and M. A. Ghannoum, "Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development , Architecture , and Drug Resistance," vol. 183, no. 18, pp. 5385–5394, 2001.
- [25] M. Henriques, K. Gasparetto, and J. Azeredo, "Experimental methodology to quantify *Candida albicans* cell surface hydrophobicity," *Biotechnology Letters*, pp. 1111–1115, 2002.
- [26] W. L. Chaffin, "*Candida albicans* cell wall proteins.," *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, vol. 72, no. 3, pp. 495–544, Sep. 2008.
- [27] G. Ramage, S. P. Saville, D. P. Thomas, L. Lo, and C. A. Biofilms, "*Candida* Biofilms: an Update," vol. 4, no. 4, pp. 633–638, 2005.
- [28] S. Silva, M. Henriques, R. Oliveira, D. Williams, and J. Azeredo, "In vitro biofilm activity of non-*Candida albicans* *Candida* species.," *Current microbiology*, vol. 61, no. 6, pp. 534–40, Dec. 2010.
- [29] M. Bassetti, E. Righi, A. Costa, R. Fasce, M. P. Molinari, R. Rosso, F. B. Pallavicini, and C. Viscoli, "Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care.," *BMC infectious diseases*, vol. 6, p. 21, Jan. 2006.
- [30] P. L. Fidel, J. a Vazquez, and J. D. Sobel, "*Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*," *Clinical microbiology reviews*, vol. 12, no. 1, pp. 80–96, Jan. 1999.
- [31] P. W. J. de Groot, E. a Kraneveld, Q. Y. Yin, H. L. Dekker, U. Gross, W. Crielaard, C. G. de Koster, O. Bader, F. M. Klis, and M. Weig, "The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins.," *Eukaryotic cell*, vol. 7, no. 11, pp. 1951–64, Nov. 2008.
- [32] R. Kaur, R. Domergue, M. L. Zupancic, and B. P. Cormack, "A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host.," *Current opinion in microbiology*, vol. 8, no. 4, pp. 378–84, Aug. 2005.
- [33] M. Tscherner, T. Schwarzmüller, and K. Kuchler, "Pathogenesis and Antifungal Drug Resistance of the Human Fungal Pathogen *Candida glabrata*," *Pharmaceuticals*, vol. 4, no. 12, pp. 169–186, Jan. 2011.
- [34] P. Vandeputte, G. Tronchin, T. Bergès, C. Hennequin, D. Chabasse, and J.-P. Bouchara, "Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the ERG6

- gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth.," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 51, no. 3, pp. 982–90, Mar. 2007.
- [35] F. C. Odds, M. G. Rinaldi, C. R. Cooper, a Fothergill, L. Pasarell, and M. R. McGinnis, "*Candida* and *Torulopsis*: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts.," *Journal of clinical microbiology*, vol. 35, no. 1, pp. 313–6, Jan. 1997.
- [36] C. a Hitchcock, G. W. Pye, P. F. Troke, E. M. Johnson, and D. W. Warnock, "Fluconazole resistance in *Candida glabrata*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 37, no. 9, pp. 1962–1965, Sep. 1993.
- [37] A. Roetzer, T. Gabaldón, and C. Schüller, "From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: important adaptations for an opportunistic pathogen.," *FEMS microbiology letters*, vol. 314, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2011.
- [38] S. Fanning and A. P. Mitchell, "Fungal biofilms.," *PLoS pathogens*, vol. 8, no. 4, p. e1002585, Jan. 2012.
- [39] R. A. Hajjeh, A. N. Sofair, L. H. Harrison, M. Lyon, B. A. Arthington-skaggs, S. A. Mirza, M. Phelan, J. Morgan, W. Lee-yang, A. Ciblak, L. E. Benjamin, L. T. Sanza, S. Huie, S. F. Yeo, M. E. Brandt, W. David, G. M. Lyon, M. A. Ciblak, and D. W. Warnock, "Incidence of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species and In Vitro Susceptibilities of Isolates Collected from 1998 to 2000 in a Population-Based Active Surveillance Program Incidence of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species and In Vitro Susc.," 2004.
- [40] V. Nissapatorn, C. Lee, Q. K. Fatt, and K. A. Abdullah, "AIDS-related opportunistic infections in Hospital Kuala Lumpur.," *Japanese journal of infectious diseases*, vol. 56, no. 5–6, pp. 187–92, 2003.
- [41] a Singh, I. Bairy, and P. G. Shivananda, "Spectrum of opportunistic infections in AIDS cases.," *Indian journal of medical sciences*, vol. 57, no. 1, pp. 16–21, Jan. 2003.
- [42] R. Piarroux, L. Millon, and K. Bardonnet, "Are live *saccharomyces* yeasts harmful to patients?," *The Lancet*, vol. 353, pp. 1851–1852, 1999.
- [43] E. K. Bethea, B. J. Carver, A. E. Montedonico, and T. B. Reynolds, "The inositol regulon controls viability in *Candida glabrata*," *Microbiology (Reading, England)*, vol. 156, no. Pt 2, pp. 452–62, Feb. 2010.
- [44] A. Kramer, I. Schwebke, and G. Kampf, "How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review.," *BMC infectious diseases*, vol. 6, p. 130, Jan. 2006.
- [45] R. Kaur, B. Ma, and B. P. Cormack, "A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 18, pp. 7628–33, May 2007.

- [46] M. Weig, L. Jansch, U. Gross, C. G. De Koster, F. M. Klis, and P. W. J. De Groot, "Systematic identification in silico of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein-polysaccharide linkages of the human pathogen *Candida glabrata*," *Microbiology (Reading, England)*, vol. 150, no. Pt 10, pp. 3129–44, Oct. 2004.
- [47] J. R. Wingard, W. G. Merz, M. G. Rinaldi, C. B. Miller, J. E. Karp, and R. Saral, "Association of *Torulopsis glabrata* infections with fluconazole prophylaxis in neutropenic bone marrow transplant patients.," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 37, no. 9, pp. 1847–9, Sep. 1993.
- [48] S. Perea and T. F. Patterson, "Antifungal resistance in pathogenic fungi.," *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 35, no. 9, pp. 1073–80, Nov. 2002.
- [49] T. F. Mah and G. a O'Toole, "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents.," *Trends in microbiology*, vol. 9, no. 1, pp. 34–9, Jan. 2001.
- [50] G. Ramage, R. Rajendran, L. Sherry, and C. Williams, "Fungal biofilm resistance.," *International journal of microbiology*, vol. 2012, p. 528521, Jan. 2012.
- [51] M. D. LaFleur, C. a Kumamoto, and K. Lewis, "*Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells.," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 50, no. 11, pp. 3839–46, Nov. 2006.
- [52] W. L. Chaffin, J. L. López-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo, and J. P. Martínez, "Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression.," *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, vol. 62, no. 1, pp. 130–80, Mar. 1998.
- [53] A. J. W. Costerton, P. S. Stewart, and E. P. Greenberg, "Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections," vol. 284, pp. 1318–1322, 1999.
- [54] B. Adam, G. S. Baillie, and L. J. Douglas, "Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*," *Journal of medical microbiology*, vol. 51, no. 4, pp. 344–9, Apr. 2002.
- [55] M. E. Davey and G. a O'toole, "Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics.," *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, vol. 64, no. 4, pp. 847–67, Dec. 2000.
- [56] S. Ozkan, F. Kaynak, A. Kalkanci, U. Abbasoglu, and S. Kustimur, "Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents.," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 100, no. 3, pp. 319–23, May 2005.
- [57] L. J. Douglas, "Medical importance of biofilms in *Candida* infections.," *Revista iberoamericana de micología*, vol. 19, no. 3, pp. 139–43, Sep. 2002.

- [58] R. S. Al-Dhaheri and L. J. Douglas, "Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species.," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 52, no. 5, pp. 1884–7, May 2008.
- [59] C. a Kumamoto, "*Candida* biofilms.," *Current opinion in microbiology*, vol. 5, no. 6, pp. 608–11, Dec. 2002.
- [60] P. Uppuluri, A. K. Chaturvedi, A. Srinivasan, M. Banerjee, A. K. Ramasubramaniam, J. R. Köhler, D. Kadosh, and J. L. Lopez-Ribot, "Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle.," *PLoS pathogens*, vol. 6, no. 3, p. e1000828, Mar. 2010.
- [61] C. Müller, V. Staudacher, J. Krauss, M. Giera, and F. Bracher, "A convenient cellular assay for the identification of the molecular target of ergosterol biosynthesis inhibitors and quantification of their effects on total ergosterol biosynthesis.," *Steroids*, vol. 78, no. 5, pp. 483–93, May 2013.
- [62] C. a Sable, K. M. Strohmaier, and J. a Chodakewitz, "Advances in antifungal therapy.," *Annual review of medicine*, vol. 59, pp. 361–79, Jan. 2008.
- [63] A. Burger-Kentischer, D. Finkelmeier, P. Keller, J. Bauer, H. Eickhoff, G. Kleymann, W. Abu Rayyan, A. Singh, K. Schröppel, K. Lemuth, K.-H. Wiesmüller, and S. Rupp, "A screening assay based on host-pathogen interaction models identifies a set of novel antifungal benzimidazole derivatives.," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 55, no. 10, pp. 4789–801, Oct. 2011.
- [64] M. a Ghannoum and L. B. Rice, "Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance.," *Clinical microbiology reviews*, vol. 12, no. 4, pp. 501–17, Oct. 1999.
- [65] M. a Pfaller, "Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment.," *The American journal of medicine*, vol. 125, no. 1 Suppl, pp. S3–13, Jan. 2012.
- [66] Z. a Kanafani and J. R. Perfect, "Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact.," *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 46, no. 1, pp. 120–8, Jan. 2008.
- [67] a Vermes, H. J. Guchelaar, and J. Dankert, "Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions.," *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 46, no. 2, pp. 171–9, Aug. 2000.
- [68] C. a Kauffman and P. T. Frame, "Bone marrow toxicity associated with 5-fluorocytosine therapy.," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 11, no. 2, pp. 244–7, Feb. 1977.
- [69] D. R. Hospenhal and J. E. Bennett, "Flucytosine monotherapy for *cryptococcosis*.," *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 27, no. 2, pp. 260–4, Aug. 1998.

- [70] M. Klepser, "The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections.," *Journal of critical care*, vol. 26, no. 2, pp. 225.e1–10, Apr. 2011.
- [71] V. T. Andriole, "Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 44, pp. 151–162, 1999.
- [72] G. Giusiano, P. A. Ezkurra, and G. Quindós, "Antifungal agents: Mode of action in yeast cells," *Rev Esp Quimioterap*, vol. 19, no. June, pp. 130–139, 2006.
- [73] D. W. Denning, "Echinocandins: a new class of antifungal," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 49, no. 6, pp. 889–891, Jun. 2002.
- [74] E. S. D. Ashley, R. Lewis, J. S. Lewis, C. Martin, and D. Andes, "Pharmacology of Systemic Antifungal Agents," vol. 27710, no. Suppl 1, 2006.
- [75] "No Title." [Online]. Available: <http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0809/anfotericina/propriedades.html>. [Accessed: 10-Aug-2013].
- [76] "No Title." [Online]. Available: <http://www.drugs.com/pro/amphotericin-b.html> . [Accessed: 10-Aug-2013].
- [77] D. Ellis, "Amphotericin B: spectrum and resistance.," *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 49 Suppl 1, pp. 7–10, Feb. 2002.
- [78] M. Krogh-Madsen, M. C. Arendrup, L. Heslet, and J. D. Knudsen, "Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient.," *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 42, no. 7, pp. 938–44, Apr. 2006.
- [79] R. D. Cannon, E. Lamping, A. R. Holmes, K. Niimi, K. Tanabe, M. Niimi, and B. C. Monk, "*Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress.," *Microbiology (Reading, England)*, vol. 153, no. Pt 10, pp. 3211–7, Oct. 2007.
- [80] L. E. Cowen and W. J. Steinbach, "Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance.," *Eukaryotic cell*, vol. 7, no. 5, pp. 747–64, May 2008.
- [81] F. C. Odds, A. J. P. Brown, and N. a. R. Gow, "Antifungal agents: mechanisms of action," *Trends in Microbiology*, vol. 11, no. 6, pp. 272–279, Jun. 2003.
- [82] K. I. M. Lewis, "Riddle of Biofilm Resistance," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 45, no. 4, pp. 999–1007, 2001.
- [83] D. Sanglard and F. C. Odds, "Resistance of *Candida species* to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences," *The Lancet infectious diseases*, vol. 2, pp. 73–85, 2002.

- [84] F. S. Nolte, T. Parkinson, D. J. Falconer, S. Dix, J. Williams, C. Gilmore, R. Geller, and J. R. Wingard, "Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia.," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 41, no. 1, pp. 196–9, Jan. 1997.
- [85] E. M. Kojic, R. O. Darouiche, and C. Biofilms, "*Candida* Infections of Medical Devices," *Clinical microbiology reviews*, vol. 17, no. 2, pp. 255–267, 2004.
- [86] J. E. Nett, H. Sanchez, M. T. Cain, K. M. Ross, and D. R. Andes, "Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation.," *Eukaryotic cell*, vol. 10, no. 12, pp. 1660–9, Dec. 2011.
- [87] G. S. Baillie and L. J. Douglas, "Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents.," *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 46, no. 3, pp. 397–403, Sep. 2000.
- [88] R. M. Donlan, "Biofilms and device-associated infections.," *Emerging infectious diseases*, vol. 7, no. 2, pp. 277–81, 2001.
- [89] R. M. Donlan and J. W. Costerton, "Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms," *Clinical microbiology reviews*, vol. 15, no. 2, pp. 167–193, 2002.
- [90] A. Bink, D. Vandenbosch, T. Coenye, H. Nelis, B. P. a Cammue, and K. Thevissen, "Superoxide dismutases are involved in *Candida albicans* biofilm persistence against miconazole.," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 55, no. 9, pp. 4033–7, Sep. 2011.
- [91] L. Y. Young, C. M. Hull, and J. Heitman, "Disruption of Ergosterol Biosynthesis Confers Resistance to Amphotericin B in *Candida lusitanae*," vol. 47, no. 9, pp. 2717–2724, 2003.
- [92] P. Vandeputte, G. Tronchin, G. Larcher, E. Ernoult, T. Bergès, D. Chabasse, and J.-P. Bouchara, "A nonsense mutation in the ERG6 gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 52, no. 10, pp. 3701–9, Oct. 2008.
- [93] M. Negri, V. Gonçalves, S. Silva, M. Henriques, J. Azeredo, and R. Oliveira, "Crystal violet staining to quantify *Candida* adhesion to epithelial cells," *British Journal of Biomedical Science*, vol. 67, pp. 120–125, 2010.
- [94] A. Ig, F. Pantanella, P. Valenti, T. Natalizi, and D. Passeri, "Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use," pp. 31–42, 2013.
- [95] A. Pathak, S. Sharma, and P. Shrivastva, "Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species on acrylic substrate," *J. Appl. Oral. Sci.*, pp. 70–75, 2010.

- [96] J. Vermitsky and T. D. Edlind, "Azole Resistance in *Candida glabrata*: Coordinate Upregulation of Multidrug Transporters and Evidence for a Pdr1-Like Transcription Factor," vol. 48, no. 10, pp. 3773–3781, 2004.
- [97] K. W. Henry, J. T. Nickels, and T. D. Edlind, "Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors.," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 44, no. 10, pp. 2693–700, Oct. 2000.
- [98] C. Onyewu, J. R. Blankenship, M. Del Poeta, and J. Heitman, "Ergosterol Biosynthesis Inhibitors Become Fungicidal when Combined with Calcineurin Inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*," vol. 47, no. 3, pp. 956–964, 2003.
- [99] S. Silva, "Virulence factors of non-*Candida albicans* *Candida* species," Braga, 2010.
- [100] S. C. Halliwell, "Cell Individuality in Adhesin Expression of *Candida glabrata*," 2012.
- [101] D. W. Denning and W. W. Hope, "Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities.," *Trends in microbiology*, vol. 18, no. 5, pp. 195–204, May 2010.