

FERNANDO CÉSAR BIZERRA

**EFEITO PARADOXAL DA CASPOFUNGINA EM
Candida spp.: MECANISMOS MOLECULARES E
ASPECTOS MORFOLÓGICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**SÃO PAULO
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FERNANDO CÉSAR BIZERRA

**EFEITO PARADOXAL DA CASPOFUNGINA EM
Candida spp.: MECANISMOS MOLECULARES E
ASPECTOS MORFOLÓGICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo - Escola Paulista de Medicina,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

Co-orientadora: Dra. Analy Salles de A. Melo

**SÃO PAULO
2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Infectologia: Prof. Dr.

Ricardo Sobhie Diaz

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Especial de Micologia, da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (parecer nº 1178/07), contando com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

FERNANDO CÉSAR BIZERRA

Efeito Paradoxal da Caspofungina em *Candida* spp.: Mecanismos Moleculares e Aspectos Morfológicos

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE DA BANCA

Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

MEMBROS TITULARES

Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes

Prof^a. Dr^a. Sueli Fumie Yamada-Ogatta

Prof. Dr. Roberto Carlos Tedesco

Prof. Dr. Marcos Sergio de Toledo

MEMBROS SUPLENTE

Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Moretti

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Sinigaglia Galli Coimbra

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes de minha vida...

À minha mãe, Vera Lúcia Bueno, pelo amor incondicional, pelo carinho, pela confiança e principalmente por ter me ensinado que a educação é o maior patrimônio do ser humano.

E à minha querida esposa Luciana, que em nenhum momento deixou de acreditar em mim. Obrigado por todo seu carinho, todas as palavras de incentivo e pela coragem em alçar vôo comigo e descobrir novos horizontes.

O nosso amor é motivo de uma felicidade indescritível.

E, finalmente, às duas sementes de amor plantadas em minha vida.

Amo muito vocês!

Agradecimentos

À minha família, meu pai Manoel Pedro Bizerra, minha mãe Vera Lúcia Bueno, meus irmãos, Flávio Augusto Bizerra e Cintia Maria Bizerra, meus sobrinhos, Arthur, Júlia e Luana, por todo incentivo e, principalmente, por todo amor que me foi dado, elementos essenciais para o desenvolvimento desse trabalho e conquista deste momento único.

À minha esposa Luciana Garrido. Nos momentos de desalento e cansaço, seu amor, carinho, companhia e suas palavras de incentivo revigoraram minhas energias e nunca me deixaram pensar em desistir frente aos obstáculos que me banharam durante a realização deste trabalho. Nada disso seria possível sem você.

Ao meu ilustre orientador, Prof. Arnaldo Lopes Colombo, pela orientação inquestionável, empenho e pelo exemplo como pesquisador. Sou muito grato pela confiança depositada durante esses anos de convivência.

À minha co-orientadora, Dra. Analy Salles de Azevedo Melo, pela contribuição, confiança e apoio em todas as etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Hélio Takahashi e Prof^ª. Dr^ª. Anita Straus, do Departamento de Bioquímica da Unifesp, por toda colaboração durante as análises bioquímicas desenvolvidas neste estudo.

À Prof^ª. Dr^ª. Edna Freymüller, diretora do Centro de Microscopia Eletrônica da Unifesp, pela contribuição e apoio nos experimentos de microscopia eletrônica, os quais foram essenciais ao bom andamento e ao sucesso deste estudo.

Ao pessoal do Centro de Microscopia Eletrônica da Unifesp, André, Isabel, Márcia e Patrícia pela paciência e ajuda em cada etapa dos experimentos de microscopia.

Aos companheiros e amigos do Laboratório Especial de Micologia (LEMI): Angela, Ana Carolina Remondi, Ana Carolina, Ana Paula, Daniel da Matta, Daniel Wagner, Débora, Edméa, Fernanda, Giannina, Guilherme, Hemílio, Isabel, Jorge, Karina, Maria Daniela, Maria 1, Maria Romilda, Marcos, Mariane, Patrício, Robert, Sarah, Thaís, Thomas, Vinicius e Viviane, pela amizade e companheirismo que, de forma direta ou indireta, muito me ajudaram nesta realização.

Às minhas amigas Laura, Tharcila e Renata por me incentivarem a fazer o doutorado na Unifesp e por me acolherem em São Paulo.

À minha grande amiga Renata Cristina Picão, por todos os momentos de entusiasmo, partilha e alegria. Já havia dito uma vez: nossa amizade é eterna.

A todos os amigos da Unifesp e de São Paulo: Danilo, Thays, Elô, Paulo, Frank, Philip, Ligia, Joice, a todos do laboratório Alerta, pelos momentos alegres, pelas conversas e pela desconcentração que contribuíram muito para a continuidade deste trabalho.

A todos os professores da Disciplina de Infectologia pelo aprendizado e experiências trocadas não somente durante as disciplinas do Doutorado, como também no dia-a-dia nos laboratórios da Unifesp.

À Cássia Aparecida Garcia, secretária do Programa de Pós-Graduação em Infectologia da Unifesp, pelo auxílio durante todos os processos necessários para realização desse trabalho.

A todos, mesmo aqueles, cujo nome não esteja presente aqui, saibam da sua importância em cada fase da minha vida durante essa longa e difícil caminhada...

... o meu sincero MUITO OBRIGADO!

Sumário

Lista de Figuras.....	XI
Lista de Quadros e Tabelas	XII
Abstract	XIII
Resumo	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Infecções de corrente sanguínea por <i>Candida</i> spp.....	2
1.2. Drogas antifúngicas disponíveis para tratamento de candidíase hematogênica	5
1.2.1. Anfotericina B	6
1.2.2. Triazólicos	7
1.2.3. Equinocandinas	10
1.2.3.1. Espectro de ação das equinocandinas	12
1.2.3.2. Mecanismo de ação das equinocandinas e a parede celular de <i>Candida albicans</i>	14
1.2.3.3. Mecanismos de resistência e resposta celular à exposição às equinocandinas	17
1.3. Efeito paradoxal das equinocandinas em leveduras do gênero <i>Candida</i>	22
2. <u>OBJETIVOS</u>	26
3. <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	28
3.1. Triagem do efeito paradoxal da caspofungina em isolados de <i>Candida</i> spp.	30
3.1.1. Microrganismos	30
3.1.2. Teste de susceptibilidade à caspofungina	30
3.1.2.1. Leitura e interpretação dos resultados de microdiluição em caldo	31
3.1.3. Seleção de amostras para análise da atividade fungicida da caspofungina, análise das alterações morfológicas e dos mecanismos moleculares do EP da caspofungina	32
3.2. Análise da atividade fungicida da caspofungina	32

3.2.1. Ensaio de concentração fungicida mínima	32
3.2.2. Ensaio de curva de morte	33
3.2.3. Análise da viabilidade celular de <i>Candida</i> spp. durante a exposição à caspofungina	34
3.2.3.1. Ensaio de redução do XTT	34
3.2.3.2. Microscopia de fluorescência utilizando fluoróforo FUN1	34
3.3. Análise dos componentes da parede celular	35
3.3.1. Análise bioquímica dos componentes da parede celular fúngica	35
3.3.1.1. Cultivo e preparação das células	36
3.3.1.2. Lise mecânica das células e isolamento dos fragmentos da parede celular	36
3.3.1.3. Extração dos componentes da parede celular	36
3.3.1.4. Determinação do conteúdo de hexose método fenol-sulfúrico (dosagem de glucanas)	37
3.3.1.5. Determinação do conteúdo de hexosamina: método de Morgan-Elson (dosagem de quitina)	38
3.3.2. Análise do conteúdo de quitina por microscopia de fluorescência utilizando o fluoróforo CalcoFluor White.....	39
3.3.3. Análise das alterações ultraestruturais em células do EP	40
3.3.3.1. Microscopia eletrônica de varredura	40
3.3.3.2. Microscopia eletrônica de transmissão	41
3.3.4. Análise da expressão de genes relacionados à síntese da parede celular em células de <i>Candida albicans</i> durante o efeito paradoxal da caspofungina	42
4. <u>RESULTADOS</u>	45
4.1. Triagem do efeito paradoxal da caspofungina em isolados de <i>Candida</i> spp.	46
4.1.1. Microrganismos	46
4.1.2. Testes de susceptibilidade à caspofungina	46
4.1.3. Seleção de amostras para análise da atividade fungicida da caspofungina, análise das alterações morfológicas e dos mecanismos moleculares do EP da caspofungina	52

4.2. Análise da atividade fungicida da caspofungina	52
4.2.1. Ensaio de concentração fungicida mínima	52
4.2.2. Ensaio de curva de morte	54
4.2.3. Análise de viabilidade celular durante exposição à caspofungina	59
4.2.3.1. Ensaio de redução do XTT	59
4.2.3.2. Microscopia de fluorescência utilizando fluoróforo FUN1	59
4.3. Análise dos componentes da parede celular.....	63
4.3.1. Análise bioquímica dos componentes da parede celular fúngica	63
4.3.2. Análise do conteúdo de quitina por microscopia de fluorescência utilizando o fluoróforo CalcoFluor White	66
4.4. Análise das alterações ultraestruturais em células do efeito paradoxal da caspofungina	68
4.4.1. Microscopia eletrônica de varredura	69
4.4.2. Microscopia eletrônica de transmissão	71
4.5. Análise da expressão de genes relacionados à síntese da parede celular em células de <i>Candida albicans</i> durante o efeito paradoxal da caspofungina	73
5. DISCUSSÃO	74
6. CONCLUSÃO	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
8. ANEXOS	103
Anexo I - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – UNIFESP	
Anexo II - Artigo publicado como autor principal	
Anexo III - Artigo publicado como co-autor	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química molecular da caspofungina, micafungina e anidulafungina	10
Figura 2: Ultraestrutura de célula leveduriforme de <i>C. albicans</i>	16
Figura 3. Vias de sinalização que regulam o remodelamento da parede celular de <i>C. albicans</i> em resposta à exposição a agentes perturbadores da parede celular, incluindo as equinocandinas	21
Figura 4. Fluxograma de trabalho seguido durante o desenvolvimento deste estudo.....	29
Figura 5: Curva de morte em relação ao tempo.....	55
Figura 6: Ensaio de redução do XTT para análise de viabilidade de células do efeito paradoxal da caspofungina durante os testes de microdiluição em caldo	60
Figura 7. Microscopia de fluorescência utilizando os fluoróforos FUN1 e CalcoFluor White (CFW)	61
Figura 8. Análise bioquímica dos componentes da parede celular de células controle e células do efeito paradoxal da caspofungina	64
Figure 9. Análise do conteúdo de quitina da parede celular através de microscopia de fluorescência utilizando o fluoróforo CalcoFluor White (CFW)	67
Figure 10. Microscopia eletrônica de varredura de isolados de <i>Candida</i> spp., comparando a morfologia de células controle e células do EP com crescimento em 16 µg/mL de CAS	70
Figure 11. Microscopia eletrônica de transmissão de isolados de <i>Candida</i> spp., comparando a ultraestrutura da parede celular de células controle e células do EP da CAS, com crescimento em 16 µg/mL de CAS	72
Figura 12: Análise da expressão gênica em células do EP da Caspofungina em relação às células controle	73

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Fatores de risco associados ao desenvolvimento de candidemia	3
Quadro 2. Relatos de casos de falha terapêutica durante o uso de equinocandinas	17
Tabela 1. Lista de oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados para análise de expressão através de PCR em tempo real de células do EP de <i>C. albicans</i>	44
Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) da Caspofungina dos 77 isolados estudados, obtida através da técnica de microdiluição em caldo, segundo documento M27-A3 do CLSI (2008)	48
Tabela 3. Características dos isolados selecionados para os demais testes propostos neste estudo	52
Tabela 4. Concentração fungicida mínima (CFM) da caspofungina ..	53

ABSTRACT

The paradoxical growth effect (PG) has been described for echinocandins and is characterized by cellular growth at drug concentrations above the minimal inhibitory concentrations (MIC). Despite resistance to this class of drugs is an unusual phenomenon among *Candida* isolates, occurrence of PG is frequently observed during susceptibility tests for echinocandins. The aim of this study was to analyze the frequency of PG for caspofungin (CAS) among *Candida* strains and also to evaluate the morphological aspect, as well as the molecular mechanisms related to this phenomenon. Seventy-seven strains of *Candida* spp., including 21 isolates of *C. albicans*, 22 isolates of *C. tropicalis*, 23 isolates of *C. parapsilosis* and 11 isolates of *C. orthopsilosis* were studied. All strains were subjected to susceptibility tests of CAS, as described in the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, document M27-A3), to determine the MIC and evaluate the presence of PG. Afterwards, two isolates each of *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis* and *C. parapsilosis*, all of which displayed PG in response to caspofungin, were subjected to MIC, minimal fungicidal concentration (MFC) and time-kill curve assays to evaluate the PG. We also analyzed the ultrastructural and biochemical changes in the cell wall of PG cells and the gene expression related to the synthesis of cell wall during this phenomenon. Of the 77 *Candida* isolates initially screened, 42 isolates (54.5%) displayed the phenomenon of PG in concentrations ranging from 4.0 to 32.0 $\mu\text{g/mL}$ CAS. *C. parapsilosis* demonstrated the higher frequency of PG, followed by *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. orthopsilosis*. Cell viability assays showed that the PG cells were viable, even when exposed to high CAS concentrations (16 $\mu\text{g/mL}$). The time-kill curve assays were more discriminatory than MFC in detecting the PG effect, especially for *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis* isolates. The four different *Candida* species studied demonstrated similar alterations in the cell wall components and ultrastructure associated with PG. In PG cells, β -1,3-glucan content decreased 2.7- to 7.8-fold, whereas chitin content increased 4.0- to 6.6-fold. Electron microscopy study of the PG cells revealed morphological alterations, clumping and enlarged cells, absence of filamentation, abnormal septa and accumulation of chitin in the cell wall. Also, PG cells basically exhibited a single dark high density layer in the cell wall, indicating loss of the β -1,3-glucan layer. Finally, the analysis of gene expression suggests that the increase of chitin synthesis in PG cells of *C. albicans* is regulated by PKC, HOG and Calcineurin-Ca²⁺ pathways. Our results showed details about the morphological and ultrastructural alterations during PG, demonstrating that different *Candida* spp. analyzed presented similar cellular response during PG of CAS. Our findings also suggest that the PG cells have a compensatory mechanism responsible for the increase of chitin content in the cell wall, in response to β -1,3-glucan inhibition. These mechanisms allow the survival of PG cells to high concentrations of CAS, suggesting that stimulation of chitin synthesis may represent a rescue mechanism against caspofungin activity.

RESUMO

O efeito paradoxal (EP) é caracterizado pelo crescimento celular em concentrações de equinocandinas acima da concentração inibitória mínima (CIM). Apesar da resistência a esta classe de drogas ser um fenômeno pouco comum em isolados de *Candida* spp., a ocorrência do EP é freqüentemente observada entre isolados desta levedura durante os testes de susceptibilidade às equinocandinas. O objetivo deste estudo foi analisar a freqüência do EP da caspofungina (CAS) entre isolados de *Candida* spp. e avaliar os aspectos morfológicos e os mecanismos moleculares relacionados a este fenômeno. Para tanto, foram utilizados 77 isolados de *Candida* spp., incluindo 21 isolados de *C. albicans*, 22 de *C. tropicalis*, 23 de *C. parapsilosis* e 11 de *C. orthopsilosis*. Todos isolados foram submetidos ao teste de susceptibilidade da CAS, segundo recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, documento M27-A3), para determinação da CIM e avaliar a presença do EP. Entre os isolados que apresentaram EP da CAS, foram selecionados dois isolados de cada espécie para aplicação dos demais testes propostos neste estudo. Os ensaios de concentração fungicida mínima (CFM), curva de morte e ensaio de viabilidade celular foram utilizados para avaliar o comportamento das células fúngicas durante o EP. Analisamos ainda as alterações ultraestruturais e bioquímicas da parede celular durante o EP e a expressão de genes relacionados à síntese da parede celular durante este fenômeno. Entre os 77 isolados de *Candida* spp. analisados, 42 (54,5%) apresentaram o EP da CAS em concentrações que variaram de 4,0 a 32,0 µg/mL de CAS. Os ensaios de viabilidade celular mostraram que as células do EP apresentaram-se viáveis, mesmo quando expostas a altas concentrações de CAS (16 µg/mL). Os ensaios de curva de morte provaram ser mais discriminatórios que MFC para caracterizar o EP, principalmente para isolados de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*. As quatro espécies de *Candida* analisadas neste estudo apresentaram um padrão semelhante de alterações ultraestruturais e bioquímicas da parede celular durante o EP. De forma geral, durante o EP houve uma diminuição de 2,7 a 7,8 vezes no conteúdo de β -1,3-glucana e um aumento de 4,0 a 6,6 vezes no conteúdo de quitina da parede celular. Sobre a análise ultraestrutural por microscopia eletrônica, as células do EP apresentaram aumento do tamanho celular, formação de aglomerados celulares, ausência de filamentação e anormalidades no septo de brotamento. Além disso, a parede celular das células do EP apresentou um predomínio da camada mais eletrodensa, indicando uma diminuição da camada de β -1,3-glucana. Por fim, os resultados da análise da expressão gênica sugerem que o aumento da síntese de quitina em células do EP de *C. albicans* é regulado pelas vias PKC, HOG e Calcineurina-Ca²⁺. Nossos resultados apresentaram detalhes sobre as alterações morfológicas e ultraestruturais durante o EP, mostrando que as diferentes espécies analisadas apresentaram resposta celular semelhante durante o EP da CAS. Podemos concluir ainda que as células do EP possuem mecanismos adaptativos responsáveis pelo aumento do conteúdo de quitina na parede celular, em resposta à inibição de β -1,3-glucana. Esses mecanismos permitem que as células do EP sobrevivam a altas concentrações de CAS, sugerindo que a estimulação da síntese de quitina pode representar um mecanismo de escape à atividade desta droga.

Bizerra, Fernando César

Efeito paradoxal da caspofungina em *Candida* spp.: mecanismos moleculares e aspectos morfológicos/ Fernando César Bizerra. –São Paulo, 2010.
xiv, 141f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Infectologia.

Título em Inglês: Paradoxical effect of caspofungin in *Candida* spp.: molecular mechanisms and morphological features.

1. Efeito Paradoxal. 2. *Candida*. 3. Caspofungina. 4. Equinocandina. 5. Parede celular.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1. Infecções de corrente sanguínea por *Candida* spp.

O gênero *Candida* responde por um grande espectro de infecções superficiais e invasivas documentadas tanto em pacientes da comunidade quanto em pacientes hospitalizados. Entre as infecções por *Candida* spp. incluem-se a vaginite, infecção do trato urinário, candidíase oral, peritonite, artrite séptica, endocardite, infecção de corrente sanguínea (ICS) e outras complicações (52, 75, 94, 104, 182, 193, 202, 208).

Tem sido documentado um aumento substancial de ICS por *Candida* spp. em hospitais terciários de diversos países (13, 163, 233). O gênero *Candida* responde pela maior parte das infecções fúngicas no ambiente hospitalar e é a quarta causa de ICS adquiridas em hospitais americanos, respondendo por cerca de 10% de todas as infecções deste sítio (163, 227).

Vários estudos têm demonstrado a alta incidência de candidemia em hospitais terciários nos EUA, em países da Europa e também no Brasil. Hajjeh *et al.* (80) conduziram um estudo prospectivo de vigilância de ICS por *Candida* spp. no período de 1998 a 2000 em dois centros médicos das cidades de Baltimore e Connecticut, nos Estados Unidos da América (EUA). Foram detectados 1.143 casos de candidemia, com uma média anual de incidência de 10 casos/100.000 habitantes ou 1,5 casos/10.000 pacientes-dias.

Cisterna *et al.* (39) em estudo conduzido em 40 hospitais terciários na Espanha, durante junho de 2008 a junho de 2009, reportaram a ocorrência de 984 casos de ICS por *Candida*, com incidência de 1,03 por 1.000 admissões.

Em estudo conduzido em 11 centros médicos do Brasil, distribuídos em 9 cidades de grande porte situadas nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, observou-se uma taxa de incidência de candidemia da ordem de 2,49 casos por 1.000 admissões hospitalares, taxa esta 2 a 15 vezes superior àquelas registradas em instituições médicas dos EUA e Europa (47). Este estudo deixa claro que fungemia por *Candida* spp. é problema significativo de saúde pública no nosso meio (47).

Atualmente, as infecções fúngicas invasivas (IFI), incluindo a candidemia, tornaram-se problema relevante particularmente em três cenários clínicos: i) pacientes admitidos em unidade de terapia intensiva (UTI) (175, 232); ii) pacientes submetidos a transplantes de órgãos e de células tronco

hematopoiéticas (63, 64, 149); iii) pacientes com doenças neoplásicas (146). De forma geral, *Candida* spp. responde pela grande maioria das IFIs nesses indivíduos, constituindo especial desafio para os clínicos, seja pela dificuldade no diagnóstico precoce, seja pela alta mortalidade desta complicação.

Nestes três cenários os pacientes são mais frequentemente expostos aos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento de candidemia, incluindo procedimentos médicos invasivos (uso de cateter venoso central e sondas), diálise, antibioticoterapia de amplo espectro, quimioterapia, imunossupressão e lesão de mucosa gastrointestinal (113, 143, 146, 175, 216, 232). Os fatores de risco associados à candidemia estão bem estabelecidos e não apresentaram grandes mudanças desde os anos 80 (163). Com base em estudos caso-controle foram determinados fatores de risco independentes para desenvolvimento de ICS por *Candida* spp., incluindo antibioticoterapia de amplo espectro, colonização por *Candida* spp., uso de cateteres vasculares (especialmente cateter venoso em posição central), nutrição parenteral total, neutropenia, cirurgia, insuficiência renal e hemodiálise (163). O quadro 1 apresenta alguns dos principais fatores de risco e seu papel na patogênese da ICS por *Candida* spp.

Quadro 1. Fatores de risco associados ao desenvolvimento de candidemia

Fatores de Risco	Possível Papel na Patogênese da ICS por <i>Candida</i> spp.
Antibioticoterapia	Favorece colonização fúngica
Quimioterapia	Imunossupressão e injúria em mucosas
Colonização prévia	Translocação através de mucosa
Supressão do ácido gástrico	Colonização e translocação através de mucosa
Nutrição parenteral total	Acesso vascular direto e contaminação da solução infundida
Neutropenia	Imunossupressão
Cateter venoso em posição central	Contaminação do dispositivo e acesso vascular direto

Fonte: Pfaller *et al.* (163), com modificações.

ICS: Infecção de corrente sanguínea.

Dentre as mais de 100 espécies de *Candida* conhecidas, somente algumas têm sido isoladas de infecções humanas. Nesse contexto, destacam-se *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Todas essas espécies podem apresentar manifestações clínicas semelhantes, contudo, há peculiaridades nas infecções por diferentes espécies de *Candida* em relação à fonte de infecção, fatores de risco, história natural e susceptibilidade aos antifúngicos (38, 44, 99, 163). Uma crescente preocupação em relação aos casos de candidemia é o aumento da prevalência de ICS por espécies de *Candida* não-*C. albicans*, havendo diferenças regionais no padrão de distribuição deste gênero de leveduras (3, 38, 80, 99).

Em estudo conduzido por Hajjeh *et al.* (80) nos EUA, entre 1.143 casos de candidemia, *Candida albicans* foi isolada em 45% dos casos, seguida por *C. glabrata* (24%), *C. parapsilosis* (13%) e *C. tropicalis* (12%). Horn *et al.* (84) analisaram a distribuição de espécies de *Candida* spp. entre 2.019 casos de candidemia em diferentes centros médicos da América do Norte, constatando que *C. albicans* foi responsável por 45,6% dos casos, seguida por *C. glabrata* (26%), *C. parapsilosis* (15,7%), *C. tropicalis* (8,1%) e *C. krusei* (2,5%). Da mesma forma, em diversos países da Europa, incluindo Noruega (186), Alemanha (23), Dinamarca (7), Escócia (141), Bélgica (203) tem sido documentado um predomínio de *C. glabrata* entre as fungemias por espécies de *Candida* não-*C. albicans*.

Por outro lado, em países da América Latina e Espanha há predomínio de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* entre as espécies de *Candida* não-*C. albicans* relacionadas à candidemia, sendo menos comum a ocorrência de fungemias por *C. glabrata* (2, 3, 39, 47). No Brasil, estudo conduzido por Colombo *et al.* (47) indicou que *C. albicans* foi a espécie mais comum (40,9%), seguida por *C. tropicalis* (20,9%) e *C. parapsilosis* (20,5%). Este achado foi comprovado por diversas outras séries, mostrando que em nosso país *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são as espécies de *Candida* não-*C. albicans* mais prevalentes em candidemia (5, 66, 83). Importante mencionar que, recentemente, *C. parapsilosis* foi reclassificada de acordo com a diversidade genotípica em três diferentes táxons: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (74, 205). Aparentemente, no Brasil e demais países da América Latina, *C. parapsilosis* e

C. orthopsilosis apresentam maior prevalência entre as espécies do complexo *C. parapsilosis* (74, 109).

Sob o ponto de vista epidemiológico, as infecções por espécies de *Candida* não-*C. albicans* representam um desafio para os clínicos, havendo preocupação principalmente em relação à terapêutica, uma vez que tais espécies apresentam menor susceptibilidade aos antifúngicos de uso sistêmico (38, 44, 99, 169). Nesse cenário, destacam-se as espécies *C. glabrata* e *C. krusei*, as quais apresentam susceptibilidade reduzida e resistência intrínseca ao fluconazol, respectivamente. Vários autores têm sugerido que o aumento de infecções fúngicas por espécies de *Candida* não-*C. albicans* seja decorrente da combinação de diferentes variáveis, incluindo pressão seletiva de antifúngicos, aumento de pacientes portadores de diferentes doenças degenerativas e neoplásicas e, finalmente, maior utilização de procedimentos invasivos (38, 44, 99, 169).

A importância das candidemias como uma das principais infecções em ambiente hospitalar não se deve apenas à sua alta incidência, mas também à sua alta taxa de mortalidade. Apesar dos avanços dos métodos diagnósticos e da disponibilidade de novos antifúngicos, a mortalidade por candidemia tem se mantido alta, da ordem de 30-50% (1, 6, 48, 77, 80, 84, 178, 185).

1.2. Drogas antifúngicas disponíveis para tratamento de candidíase hematogênica

Atualmente, três grupos principais de antifúngicos têm sido utilizados na prática clínica em infecções sistêmicas por *Candida* spp.: a) os poliênicos, representados principalmente pela anfotericina B e suas formulações lipídicas; b) os triazólicos, sendo seus principais agentes o fluconazol e o voriconazol; e c) as equinocandinas, representadas pela caspofungina, anidulafungina e micafungina (150).

1.2.1. Anfotericina B

Os poliênicos pertencem a uma classe de antifúngicos naturais produzidos por espécies de *Streptomyces*. Desde a década de 50 até a descoberta dos azólicos, a terapia padrão para IFIs era representada pela anfotericina B. Devido ao seu amplo espectro de ação (leveduras, fungos filamentosos e dimórficos) e à sua atividade fungicida, a anfotericina B ainda é considerada o antifúngico de primeira linha para o tratamento de diversas IFIs em pacientes hospitalizados (148, 220). A anfotericina B se liga de maneira irreversível ao ergosterol da membrana citoplasmática dos fungos, resultando na formação de poros e, posteriormente, na lise da célula fúngica (96, 140).

Entre os isolados de *Candida* spp., a ocorrência de resistência secundária à anfotericina B é rara (51, 163). Ainda assim, alguns casos de resistência à terapia com anfotericina B têm sido documentados (40, 62, 100, 139). A espécie de *Candida* com maior documentação em relação à resistência a este fármaco é *C. lusitaniae*. Apesar dos estudos mostrarem que isolados de *C. lusitaniae* apresentam baixa frequência de resistência *in vitro* (36, 62, 161, 165, 229), essa espécie parece desenvolver resistência secundária durante o tratamento com anfotericina B, havendo diversos relatos de falha terapêutica (9, 79, 120, 123). Por outro lado, ainda há controvérsia sobre a capacidade dos testes de sensibilidade *in vitro* identificarem resistência à anfotericina B, uma vez que não tem sido observada uma boa correlação entre estes testes e os resultados de sucesso e/ou falha terapêutica para esse antifúngico (40, 153, 163).

Embora seja considerada antifúngico de amplo espectro de atividade, a anfotericina B apresenta alta toxicidade para o hospedeiro. A nefrotoxicidade é o principal efeito colateral ocasionado pelo uso deste fármaco, fator que tem limitado sua utilização clínica (124, 150, 156). Estudo de Battes *et al.* (17) reportou que 30% dos pacientes tratados com anfotericina B apresentaram insuficiência renal aguda, o que resultou em aumento da mortalidade e também dos custos hospitalares. Com o objetivo de diminuir a toxicidade da formulação convencional da anfotericina B (desoxicolato), diversas formulações lipídicas deste composto (lipossomal, complexo lipídico, dispersão coloidal, intralipídica e conjugada) encontram-se atualmente disponíveis para o tratamento de IFIs,

apresentando menor toxicidade quando comparadas à anfotericina B desoxicolato (24, 25, 76, 221, 226). Apesar da menor toxicidade das formulações lipídicas, a grande maioria dos hospitais públicos brasileiros tem à sua disposição apenas a anfotericina B desoxicolato para tratamento das infecções fúngicas invasivas.

Os mecanismos genéticos responsáveis pela resistência adquirida à anfotericina B ainda são pouco compreendidos. Alguns estudos têm mostrado que mutações em genes da via biossintética do ergosterol (*ERG*), entre eles os genes *ERG2*, *ERG3*, *ERG5*, *ERG6* e *ERG11*, podem acarretar na diminuição do conteúdo de ergosterol e na presença de esteróis intermediários na membrana citoplasmática fúngica (114, 190, 210, 211, 228). Estas alterações, tanto quantitativa como qualitativa, nos esteróis da membrana plasmática resultam na diminuição da afinidade entre a anfotericina B e seu sítio alvo, representando assim os principais mecanismos de resistência a esta droga em isolados de *Candida*. Outros mecanismos de resistência sugeridos são: i) o aumento da produção de catalase por isolados de *Candida* spp., levando à diminuição do dano oxidativo causado por essa classe de drogas (197, 198); ii) diminuição do conteúdo de β -1,3-glucana, dificultando o acesso das moléculas de anfotericina B à membrana citoplasmática fúngica (96, 210, 211).

1.2.2. Triazólicos

Os triazólicos são antifúngicos totalmente sintéticos, constituindo a maior classe de agentes antifúngicos. O mecanismo de ação dos triazólicos se dá pela inibição da atividade da enzima 14- α -lanosterol-demetilase (*Erg11*), responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol, componente fundamental à integridade da membrana celular de células fúngicas (140). Com a inibição da enzima *Erg11*, além da diminuição do conteúdo de ergosterol na membrana citoplasmática, há um acúmulo de esteróis metilados na célula fúngica, os quais são altamente tóxicos. Além disso, esses esteróis metilados impedem a interação entre os fosfolipídios e a formação da membrana, o que resulta em inibição do crescimento da célula fúngica (96, 140, 191). Ao

contrário da anfotericina B, a atividade dos triazólicos contra *Candida* spp. é fungistática.

Entre os triazólicos, fluconazol e voriconazol são os únicos compostos empregados na terapia das ICS por *Candida* spp. (150). O fluconazol é um triazólico de primeira geração, disponível desde o início da década de 1990 para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e outras espécies de leveduras. Em ensaios clínicos bem controlados, fluconazol mostrou uma eficácia comparável à da anfotericina B desoxicolato para o tratamento de candidemia (111, 173, 180), apresentando como vantagem, menores índices de toxicidade quando comparado à anfotericina B. Fluconazol é antifúngico de primeira linha para tratamento dos casos de candidemia, sendo também considerada a terapia padrão para o tratamento de candidíase orofaríngea, esofágica e vaginal (150).

De forma geral, a resistência de *Candida* spp. ao fluconazol é relativamente baixa entre os isolados de corrente sanguínea, porém sua ocorrência tem aumentado nas últimas décadas (163, 164, 169). Em uma revisão de Pfaller *et al.* (169) foram analisados os resultados de testes de sensibilidade ao fluconazol de 13.338 amostras de *Candida* spp. isoladas de corrente sanguínea entre os anos de 1992 e 2004, constatando que a porcentagem de resistência foi relativamente baixa, $\leq 3\%$ para todas as espécies. A resistência ao fluconazol entre esses isolados foi representada principalmente por *C. glabrata* e *C. krusei*, as quais apresentaram resistência em 9% e 40% dos isolados, respectivamente. Vale ainda mencionar que entre os anos de 2001 e 2004 houve um aumento significativo no número de isolados de *C. glabrata* resistentes, passando de 7% em 2001 para 12% em 2004.

Uma nova geração de triazólicos, entre eles o voriconazol e posaconazol, foi desenvolvida a partir de modificações químicas introduzidas nas moléculas do fluconazol e itraconazol, respectivamente. O voriconazol e o posaconazol são os principais representantes desta segunda geração dos azólicos, apresentando atividade antifúngica contra as diferentes espécies de *Candida*, incluindo isolados resistentes ao fluconazol, como *C. glabrata* e *C. krusei* (78, 86, 165, 166, 184). O espectro de ação do voriconazol e posaconazol inclui ainda diversos outros fungos de interesse médico, como

Trichosporon spp. e fungos filamentosos, entre os quais destacamos *Aspergillus* spp. e alguns isolados de *Fusarium* spp., *Scedosporium apiospermum* e *Alternaria* spp. (78, 172, 184). Assim como o fluconazol, o voriconazol e o posaconazol apresentam baixa toxicidade para o hospedeiro, surgindo como alternativa terapêutica em IFIs (133, 150, 222).

Segundo as diretrizes da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas, o voriconazol é apresentado como terapia alternativa para tratamento de candidemia e antifúngico de primeira linha para tratamento de aspergilose pulmonar invasiva (150, 220). Apesar do maior espectro de ação do voriconazol, a formulação intravenosa deste composto inclui ciclodextrina, sendo contra-indicado o seu uso em pacientes com insuficiência renal (150, 217). Vale ainda mencionar que o voriconazol possui um maior número de interações medicamentosas quando comparado ao fluconazol (86, 150).

Sobre o posaconazol, há dados sobre sua eficácia e segurança apenas em estudos de profilaxia ou tratamento de candidíase oral e/ou esofágica (49, 195, 214, 215). Não há dados clínicos sobre a sua utilização em candidemia (133), sendo necessários estudos clínicos para avaliar se há benefícios de sua introdução como estratégia terapêutica de candidemia. Com base nos dados disponíveis e diante da falta de uma formulação intravenosa, é difícil imaginar um papel significativo para o posaconazol no tratamento da candidemia (150). Por outro lado, em aspergilose pulmonar invasiva este fármaco é classificado como terapia alternativa, sendo utilizada também em esquema de profilaxia dessa mesma doença (220).

O desenvolvimento de uma segunda geração de triazólicos proporcionou um avanço importante na implementação de novas alternativas para tratamento de IFIs. Contudo, como o sítio de ação do voriconazol e do posaconazol é o mesmo do fluconazol, tem sido relatada a ocorrência de resistência cruzada entre esses dois antifúngicos em diversos isolados de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol (110, 114, 147, 165, 166, 171).

Diferentes mecanismos moleculares de resistência aos triazólicos têm sido descritos (61, 140, 187, 191, 223, 224). Em *Candida* spp., a resistência pode ser resultado do aumento da expressão de bombas de efluxo, as quais

regulam a concentração intracelular destes fármacos. O aumento da expressão em *C. albicans* dos genes *CDR1* e *CDR2* (*Candida drug resistance*), codificadores dos transportadores ABC (*ATP binding cassette*), e do gene *MDR1* (*multiple drug resistance*) determina a diminuição da concentração intracelular dos triazólicos, resultando em resistência a esta classe de antifúngicos (16, 35, 73, 188, 209, 223). Outro mecanismo diretamente relacionado à resistência aos triazólicos é a alteração da molécula alvo, a enzima 14- α -lanosterol demetilase (*Erg11*). Mutações no gene *ERG11* levam a mudanças conformacionais da enzima, prejudicando a afinidade dos azólicos ao seu sítio alvo (73, 114, 126, 189, 209, 223). Além disso, o aumento da expressão do gene *ERG11* também contribui para resistência de *Candida* spp. a esta classe de antifúngicos (73, 209). Por fim, a alteração da via biossintética do ergosterol, como mutações no gene *ERG3*, *ERG5* e *ERG16*, também pode influenciar na resistência aos triazólicos (114, 115, 190, 223).

1.2.3. Equinocandinas

As equinocandinas representam a mais nova classe de antifúngicos, classe esta composta por três agentes: micafungina, anidulafungina e caspofungina. As equinocandinas são lipopeptídeos semi-sintéticos produzidos a partir de modificações químicas em produtos naturais extraídos de fungos: caspofungina é produzida a partir da pneumocandina B extraída de *Glarea lozoyentis*; micafungina é produzida a partir do hexapeptídeo FR901370, extraído de *Coleophoma empedra*; e, anidulafungina é produzida a partir de equinocandin B, extraído de *Aspergillus nidulans* (34, 54, 60). A estrutura molecular de cada equinocandina encontra-se ilustrada na Figura 1.

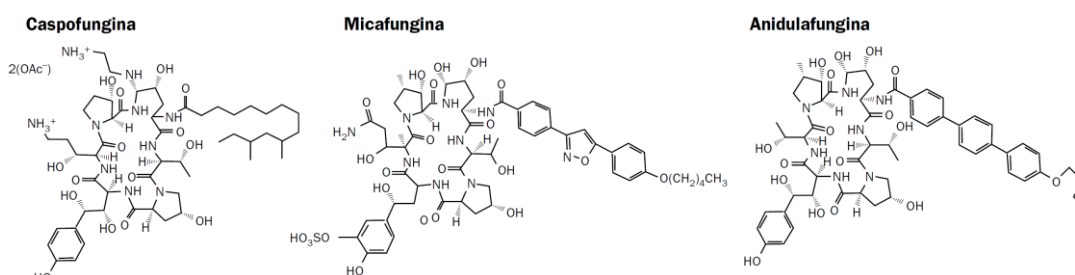


Figura 1. Estrutura química molecular da caspofungina, micafungina e anidulafungina.

A caspofungina foi a primeira equinocandina aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA em 2001, seguida por micafungina e anidulafungina, aprovadas em 2005 e 2006, respectivamente (34, 54, 60, 128), todas disponíveis apenas em preparações parenterais. Apesar da semelhança estrutural e de compartilharem o mesmo mecanismo de ação, as equinocandinas apresentam diferenças significativas na farmacocinética, o que acarreta em esquemas terapêuticos específicos para cada droga. Dessa forma, o tratamento de candidemia com caspofungina inclui uma dose inicial de 70 mg, seguida por 50 mg/dia. Para anidulafungina é feita administração de uma dose inicial de 200 mg, seguida por 100 mg/dia. A micafungina é administrada em dose constante de 100 mg/dia. Essas diferenças são necessárias para que o nível plasmático das equinocandinas atinja valores acima de 1 mg/L já na primeira dose da droga (54, 60, 150).

Diversos estudos clínicos mostraram a excelente eficácia das equinocandinas durante o tratamento de pacientes com candidíase invasiva (20, 21, 125, 152, 179). Em um estudo clínico duplo-cego comparando a atividade de caspofungina e anfotericina B desoxicolato no tratamento de candidíase invasiva, ficou constatado que a caspofungina é tão eficaz quanto à anfotericina B desoxicolato, com percentuais de sucesso terapêutico de 73,4% e 61,7%, respectivamente. Além da alta eficácia, o grupo tratado com caspofungina apresentou menor número de efeitos adversos relacionados ao tratamento (125). Em estudo conduzido por Reboli *et al.* (179), comparando a atividade da anidulafungina e do fluconazol no tratamento de candidíase invasiva, ficou constatado que o perfil de segurança de ambos os fármacos é muito satisfatório. Por outro lado, os pacientes tratados com anidulafungina apresentaram uma maior taxa de sucesso terapêutico (75,6%) quando comparado aos pacientes tratados com fluconazol (60,1%), diferença estatisticamente significativa ($p < 0,02$). Por fim, Kuse *et al.* (101) conduziram um ensaio clínico duplo-cego comparando a atividade de micafungina e anfotericina B lipossomal durante o tratamento de candidíase invasiva, no qual mostraram que a porcentagem de sucesso terapêutico foi muito semelhante entre o grupo tratado com micafungina e o tratado com anfotericina B lipossomal, 89,6% e 89,5%, respectivamente. Porém, o grupo tratado com

micafungina apresentou menor número de efeitos adversos quando comparado ao grupo tratado com anfotericina B lipossomal.

Além de sua alta eficácia e baixa toxicidade, tem sido mostrado que as equinocandinas apresentam um menor número de interações medicamentosas quando comparadas aos azólicos e à anfotericina B (34, 54, 117, 213). Dessa forma, as equinocandinas apresentam vantagens significativas em relação aos demais antifúngicos. Atualmente, segundo as diretrizes para tratamento de candidíase da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas, as equinocandinas são indicadas como antifúngicos de primeira escolha frente aos casos de candidemia, candidíase invasiva e candidíase esofágica (150).

1.2.3.1. Espectro de ação das equinocandinas

As equinocandinas possuem atividade predominantemente fungicida contra as principais espécies de *Candida* e atividade fungistática contra *Aspergillus* spp. (15, 26, 59, 89). Por outro lado, não possuem atividade clinicamente significativa contra Zygomycetos, *Cryptococcus neoformans* e *Fusarium* spp. (50, 54, 89, 117).

Pfaller *et al.* (160) analisaram a atividade de anidulafungina, caspofungina e micafungina contra 5.346 isolados de *Candida* spp. provenientes de infecções invasivas, coletados durante um estudo de vigilância envolvendo 90 centros médicos de diferentes regiões do mundo entre janeiro de 2001 e dezembro de 2006. Os autores mostraram que todas as três equinocandinas apresentaram excelente atividade contra *Candida* spp.: anidulafungina apresentou CIM₅₀(concentração de antifúngico capaz de inibir 50% dos isolados testados)= 0,06 µg/mL e CIM₉₀(concentração de antifúngico capaz de inibir 90% dos isolados testados)= 2,0 µg/mL; caspofungina apresentou CIM₅₀ = 0,03 µg/mL e CIM₉₀ = 0,25 µg/mL; micafungina apresentou CIM₅₀= 0,015 µg/mL e CIM₉₀= 1,0 µg/mL. De forma geral, os autores relataram que mais de 99% dos isolados testados apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) ≤ 2,0 µg/mL, sendo classificados como sensíveis a todas as equinocandinas, segundo os critérios do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), documento M27-A3 (2008). Além disso, não foram constatadas

alterações no perfil de susceptibilidade durante os seis anos em que o estudo foi realizado, mostrando que não houve uma tendência de seleção de isolados e/ou espécies resistentes. Da mesma forma, não houve diferenças significativas no perfil de susceptibilidade em relação às diferentes áreas geográficas estudadas.

Embora as equinocandinas possuam excelente atividade antifúngica *in vitro* contra *Candida* spp., há variações no perfil de susceptibilidade das diferentes espécies de *Candida*. *C. albicans* apresenta-se como a espécie mais sensível às equinocandinas, seguida por *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, enquanto *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* são menos susceptíveis a estes antifúngicos, com valores de CIM superiores às demais espécies (15, 28, 135, 160). Apesar disso, estudo de Colombo *et al.* (46) mostrou que o uso de caspofungina no tratamento de candidíase invasiva apresentou taxas de sucesso terapêutico semelhantes entre as diferentes espécies de *Candida* não-*C. albicans*, incluindo os casos de infecção por *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*.

Uma vez que as equinocandinas possuem mecanismo e sítio de ação completamente diferentes dos triazólicos, tem sido mostrado que as mesmas apresentam excelente atividade antifúngica contra isolados de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol (10, 170, 177). Messer *et al.* (121) estudaram a atividade de micafungina e caspofungina contra 315 isolados de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, constatando que todos os isolados testados foram sensíveis às duas equinocandinas, com valores de CIM $\leq 2,0$ $\mu\text{g/mL}$. Em outro estudo, Bachmann *et al.* (10) estudaram 32 isolados de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, apresentando como mecanismo de resistência tanto mutações em *ERG11* quanto aumento da expressão dos genes *CDR* e *MDR*. Todos os 32 isolados analisados foram classificados como sensíveis à caspofungina, independente do tipo de mecanismo de resistência encontrado. Posteraro *et al.* (177) analisaram a atividade da caspofungina contra 50 isolados de *C. glabrata* resistentes aos azólicos, incluindo fluconazol, itraconazol e voriconazol. Os autores mostraram que, apesar do aumento da expressão de bombas de efluxo (*CgCDR1* e *CgCDR2*), todos os isolados apresentaram-se sensíveis à caspofungina. Por outro lado, outros autores relataram que o aumento da

expressão de *CDR1*, *CDR2* e *MDR1* em alguns isolados de *C. albicans* pode acarretar em susceptibilidade reduzida às equinocandinas (137, 192).

Apesar da controvérsia em relação à real participação das bombas de efluxo na resistência às equinocandinas, não há dúvidas sobre a atividade antifúngica desses fármacos contra isolados de *Candida* spp. resistentes aos azólicos.

1.2.3.2. Mecanismos de ação das equinocandinas e a parede celular de *C. albicans*

A atividade antifúngica das equinocandinas está relacionada à inibição da síntese da parede celular fúngica. O mecanismo de ação destes compostos se dá pela ligação à enzima β -1,3-glucana sintase (Fks1), responsável pela síntese de β -1,3-glucana, o principal componente da parede celular de *Candida* spp. A ausência de parede celular e de moléculas de β -1,3-glucana em células de mamíferos faz com que as equinocandinas apresentem baixos índices de toxicidade, uma vantagem importante em relação aos demais antifúngicos (34, 53, 54, 117, 150, 213).

Já está bem estabelecido que isolados sensíveis às equinocandinas apresentam uma diminuição acentuada do conteúdo de β -1,3-glucana na parede celular, o que acarreta alterações morfológicas, bem como alterações ultraestruturais da parede celular (53, 55, 60, 128). Alguns estudos utilizaram técnicas de microscopia eletrônica para mostrar essas alterações após a exposição de células de *C. albicans* às equinocandinas. Além da lise celular, as principais alterações celulares descritas foram: i) aumento do tamanho celular; ii) presença de células com formato esférico; iii) presença de aglomerados celulares; iv) diminuição da camada interna da parede celular (camada menos eletrodensa) (29, 57, 95, 138). Assim, o conhecimento da composição e síntese da parede celular de *Candida* spp. é fundamental para compreensão do mecanismo de ação das equinocandinas.

Além de β -1,3-glucana, a parede celular de *C. albicans* é composta por β -1,6-glucana, quitina e mananas. Juntos, esses carboidratos representam cerca de 80 a 90% da parede celular de *C. albicans*. Além dos carboidratos, a

parede celular apresenta em sua composição quantidade considerável de proteínas (6 a 20%) e pequena quantidade de lipídeos (1 a 7%). Os polímeros β -1,3-glucana e quitina representam os componentes estruturais da parede. Juntos eles formam um esqueleto rígido responsável pela resistência física da célula fúngica (31, 32).

S. cerevisiae e *C. albicans* compartilham diversas características relacionadas à parede celular, incluindo a ultraestrutura e a síntese de seus componentes (55, 90, 97, 108, 183). Nessas duas espécies de leveduras, as cadeias de β -1,3-glucana representam cerca de 40% do peso seco da parede celular. Este componente é um polímero de glicose contendo ligações do tipo β -1,3 composto por aproximadamente 1.500 unidades de glicose (31, 32, 97, 183). Basicamente, a síntese de β -1,3-glucana é realizada pela glucana sintase, constituída por uma subunidade catalítica, Fks1/2, ligadas à membrana plasmática, e uma subunidade regulatória (Rho1p), solúvel no citoplasma (27, 105, 183). Os estudos sobre a subunidade catalítica mostraram que Fks1 é a principal subunidade catalítica da glucana sintase, responsável pela síntese de β -1,3-glucana em meio com glicose, enquanto Fks2 é responsável pela síntese de β -1,3-glucana principalmente em condições de estresse (105, 116, 230). Sobre a subunidade regulatória, evidências genéticas e bioquímicas identificaram Rho1 GTPase como um regulador da β -1,3-glucana sintase (56, 98). Uma vez ativado, Rho1 liga-se à Fks1 ou à Fks2, induzindo à síntese de β -1,3-glucana. Rho1 participa ainda da sinalização da via de integridade celular e do transporte da quitina sintase III (Chs3) até a membrana plasmática (105, 107, 183).

Quitina é um polímero linear composto por unidades de *N*-acetil-*D*-glicosamina (GlcNAc) com ligações do tipo β -1,4. As cadeias de quitina representam apenas uma pequena porcentagem da parede lateral de leveduras (1 a 2%), porém desempenham papel fundamental nas formações do septo de brotamento e do anel que circunda a região de constricção entre as células mãe e filha (31, 32, 97, 183). Os fungos possuem múltiplos genes que codificam a família das quitina sintases (Chs). Especificamente, *C. albicans* possui quatro enzimas quitina sintase: Chs2p e Chs8p (Classe I); Chs1p (Classe II); e Chs3p (Classe IV) (130, 132). Chs1p é responsável pela síntese

de quitina do septo primário de brotamento, contribuindo ainda com a produção de quitina da parede lateral. Chs2p e Chs8p respondem por quase toda atividade de quitina sintase mensurável *in vitro*. Por fim, Chs3p sintetiza a maior parte da quitina presente na parede lateral, contribuindo ainda com a formação do anel de quitina que circunda a região entre as células mãe e filha (Figura 2A) (130-132, 183).

A composição da parede celular e sua síntese, pelo menos em relação aos carboidratos, parecem estar bem definidas. Por outro lado, há muitas dúvidas sobre a organização e localização de cada componente, não havendo um consenso sobre o número de camadas da parede celular. Apesar da controvérsia, duas camadas bastante distintas podem ser diferenciadas pelas técnicas convencionais de microscopia eletrônica de transmissão: as camadas externa e interna (Figura 2B) (32, 105, 145, 183).

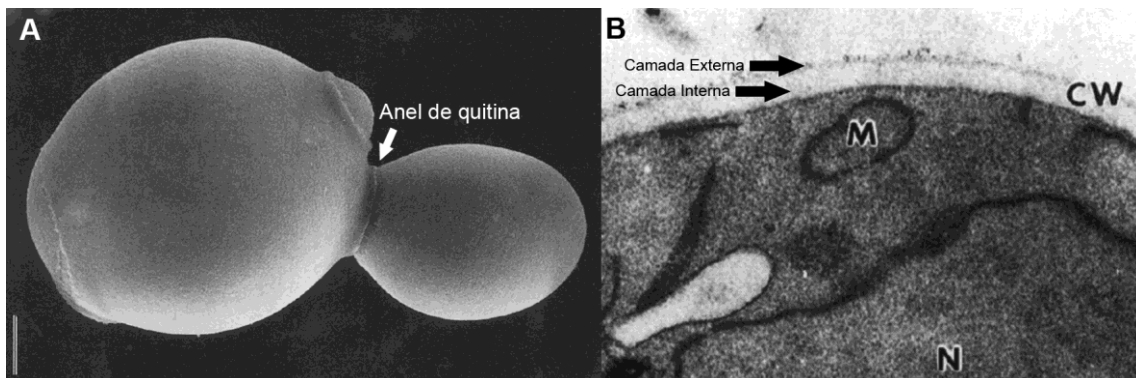


Figura 2: Ultraestrutura de célula leveduriforme de *C. albicans*. Na microscopia eletrônica de varredura (A) podemos verificar uma célula leveduriforme em brotamento e o anel de quitina que circunda a região de constricção entre a célula mãe e filha (seta). Na microscopia eletrônica de transmissão (B) podemos observar a ultraestrutura da parede celular fúngica, onde há predomínio de duas camadas: camada interna, menos eletrodensa, e a camada externa, mais eletrodensa. N: núcleo; M: mitocôndria; CW: parede celular. [Imagens obtidas de Osumi *et al.* (144)].

A camada externa é composta por uma rede densa de microfibrilas distribuídas radialmente constituída principalmente por proteínas e manoproteínas. Na microscopia eletrônica de transmissão, esta camada é caracterizada como a região mais eletrodensa da parede celular. A principal

função da camada externa está relacionada à interação do fungo com o hospedeiro, incluindo a adesão do fungo às células epiteliais e a modulação do sistema imune do hospedeiro (32, 105, 145, 183).

A camada interna é composta principalmente por β -1,3-glucana, β -1,6-glucanas e quitina. Quando visualizada por microscopia eletrônica de transmissão, a camada interna apresenta-se como uma estrutura homogênea e pouco eletrodensa, adjacente à membrana citoplasmática. As cadeias de β -1,3-glucana e quitina, presentes nesta camada, representam os componentes estruturais da parede celular, formando um esqueleto rígido responsável pela resistência física da célula. Além disso, a camada de β -1,3-glucana atua como uma barreira impermeável, responsável pelo controle osmótico da célula em relação ao ambiente externo, possuindo ainda a função de manutenção da morfologia celular (32, 105, 145, 183).

Assim, com o conhecimento da ultraestrutura da parede celular e de suas funções, as alterações das células de *C. albicans* expostas às equinocandinas sugerem fortemente que há inibição de β -1,3-glucana por estes antifúngicos. Em primeiro lugar, a diminuição ou ausência apenas da camada interna, a qual é rica em β -1,3-glucana (32), é um forte indício da inibição deste componente (29, 57, 138). Segundo, as células apresentam tamanho aumentado e formato esférico, alterações que podem ser explicadas pela perda do controle osmótico, uma das funções da camada de β -1,3-glucana (138). Por fim, a presença de aglomerados celulares ainda não está totalmente esclarecida, mas já foi mostrado que as células tratadas com equinocandinas apresentam alterações na formação do septo de brotamento, o que pode prejudicar a liberação das células filhas (29, 57, 95, 135, 138).

1.2.3.3. Mecanismos de resistência de *Candida* spp. e resposta celular à exposição às equinocandinas

Embora a resistência *in vitro* seja raramente detectada (168), alguns casos de resistência ao tratamento com equinocandinas têm sido relatados (Quadro 2). Sendo assim, há uma preocupação crescente com a possibilidade de seleção de isolados e/ou espécies resistentes às equinocandinas.

Quadro 2. Relatos de casos de falha terapêutica durante o uso de equinocandinas.

Manifestação Clínica	Patógeno	CIM (µg/mL)	Mutação em FKS1	Referência
Esofagite (AIDS)	<i>C. albicans</i>	>64	ND	Hernandez <i>et al.</i> (82)
Endocardite	<i>C. parapsilosis</i>	>16	ND	Moudgal <i>et al.</i> (129)
Candidíase disseminada	<i>C. krusei</i>	2	ND	Pelletier <i>et al.</i> (157)
Candidíase disseminada	<i>C. albicans</i>	4	S645F*	Park <i>et al.</i> (154)
Candidemia	<i>C. krusei</i>	32	R1361G*	Park <i>et al.</i> (154)
Esofagite sem resposta a azólicos (SIDA)	<i>C. albicans</i>	2	S645F* e R1361H*	Laverdiere <i>et al.</i> (103)
Esofagite recorrente	<i>C. albicans</i>	8	S645P*	Miller <i>et al.</i> (122)
Candidemia	<i>C. krusei</i>	8	F655C*	Hakki <i>et al.</i> (81) e Kahn <i>et al.</i> (88)
Candidemia	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	ND	Cheung <i>et al.</i> (37)
Não determinado	<i>C. glabrata</i>	4	F659V* (Fks2)	Katiyar <i>et al.</i> (92)
Candidemia	<i>C. glabrata</i>	>8	ND	Krogh-Madsen <i>et al.</i> (100)
Esofagite (AIDS)	<i>C. albicans</i>	2	F641S*	Baixench <i>et al.</i> (11)
Esofagite	<i>C. tropicalis</i>	4	ND	Pasquale <i>et al.</i> (155)
Candidemia	<i>C. glabrata</i>	>4	D632E	Cleary <i>et al.</i> (41)
Candidemia	<i>C. glabrata</i>	8	F659V* (Fks2)	Thompson III <i>et al.</i> (206)
Candidemia	<i>C. parapsilosis</i>	1	ND	Kabbara <i>et al.</i> (87)
Candidemia	<i>C. parapsilosis</i>	1	ND	Kabbara <i>et al.</i> (87)
Candidemia	<i>C. guilliermondii</i>	0,5	ND	Kabbara <i>et al.</i> (87)
Candidemia	<i>C. tropicalis</i>	4	S645P*	Garcia-Effron <i>et al.</i> (69)
Candidemia	<i>C. tropicalis</i>	4	S645P*	Garcia-Effron <i>et al.</i> (69)
Candidemia	<i>C. tropicalis</i>	1	F641L*	Garcia-Effron <i>et al.</i> (69)
Candidíase disseminada	<i>C. albicans</i>	1 (Etest >32)	S645P*	Arendrup <i>et al.</i> (8)

ND: não determinado.

Fks1 e Fks2: subunidade catalítica da glucana sintase 1 e 2, respectivamente.

SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

* a primeira letra indica o aminoácido natural e a última letra o aminoácido após a mutação; o número indica a posição do aminoácido substituída na enzima Fks.

O principal mecanismo de resistência descrito para equinocandinas está relacionado à ocorrência de mutações no gene *FKS1*, sítio alvo dessa classe de antifúngicos. Essas mutações podem resultar na alteração conformacional da enzima e na diminuição da afinidade entre as equinocandinas e Fks1, o que, conseqüentemente, acarreta em resistência a esses compostos (12, 67, 158, 218). Os isolados resistentes apresentam mutações em duas regiões específicas do gene *FKS1*, conhecidas como *hot spot1* (HS1) e *hot spot2* (HS2).

A região HS1 está localizada na posição 640 e 650 da sequência de aminoácidos da proteína Fks1, enquanto a região HS2 encontra-se na posição

1345 e 1365. Mutações que acarretam em substituição de aminoácidos nestas regiões têm maior possibilidade de resultar em resistência às equinocandinas (158, 218). Diversos estudos têm mostrado que a substituição do aminoácido serina da posição 645 por uma prolina, fenilalanina ou tirosina é uma das mais frequentes mutações apresentadas por isolados resistentes às equinocandinas (12, 30, 67, 154, 158).

Vale ainda mencionar que o aumento da CIM entre os isolados de *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* está relacionado à presença de mutações naturais em *FKS1* (68, 158, 218). Já foi constatado que todos os membros do complexo *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*) contêm uma mutação na posição 660 da sequência de aminoácidos de Fks1, resultando na substituição de uma prolina por uma alanina (68), enquanto os isolados de *C. guilliermondii* possuem uma substituição na posição 642 da sequência de aminoácidos de Fks1 (158). Além das mutações no gene *FKS1*, em isolados de *Candida guilliermondii* e *Candida glabrata* mutações em *FKS2* também estão associadas à resistência às equinocandinas (70, 92, 206).

Outros mecanismos de resistência às equinocandinas estão sendo estudados. Walker *et al.* (219) mostraram que a exposição das células de *Candida albicans* às equinocandinas induz um aumento da expressão dos genes quitina sintase, levando ao aumento do conteúdo de quitina na parede celular. Os autores sugerem que este estímulo da síntese de quitina pode representar um mecanismo de “escape” à atividade das equinocandinas, uma tentativa de suprir a carência de β -1,3-glucana e manter a integridade celular (218, 219). Corroborando essa hipótese, Plaine *et al.* (174) mostraram que mutantes de *C. albicans* com maior conteúdo de quitina na parede celular são resistentes à caspofungina, enquanto mutantes com diminuição do conteúdo de quitina são hipersensíveis ao mesmo fármaco.

Vale ainda mencionar que outros possíveis mecanismos de resistência às equinocandinas estão sendo estudados, entre os quais destacamos a expressão da chaperona Hsp90 (194) e o aumento da expressão de Sbe2p, uma proteína do complexo de Golgi que está envolvida com a síntese da parede celular (142).

Diversas vias de sinalização parecem estar relacionadas à manutenção da integridade da parede celular em resposta ao tratamento com equinocandinas. A principal delas é conhecida como a via de integridade da parede celular, dependente da proteína quinase C (via PKC), a qual está diretamente relacionada à ativação da via das proteínas quinase ativadas por mitose (MAPK). Uma segunda via é a resposta à alta osmolaridade do glicerol (HOG), que também atua através da ativação da via MAPK. Por fim, a via da calcineurina- Ca^{2+} também desempenha papel essencial na coordenação da resposta celular ao tratamento com estes antifúngicos (Figura 3) (106, 107, 131, 176, 219).

A PKC é a principal via de sinalização que regula a síntese da parede celular em condições de estresse. Quando ocorrem danos à parede celular, a célula recebe sinais através de um módulo sensor composto por Wsc1, Mid2 e Mtl1, levando à ativação de Rho1, que por sua vez regula positivamente a síntese de β -1,3-glucana, ativando ainda a proteína quinase C (Pkc1) (107, 131, 134, 176, 218). Pkc1 transmite a sinalização de Rho1 à cascata da MAPK, resultando na ativação (fosforilação) de Mkc1 e, posteriormente, na dos fatores transcricionais Stl2 e Rlm1, os quais são responsáveis pela amplificação dos sinais e coordenação da resposta celular, incluindo a regulação da síntese de β -1,3-glucana e quitina, do ciclo celular, polarização celular e transporte de vesículas secretoras (Figura 3) (107, 131, 134, 176). Importante destacar que Pkc1p, em conjunto com Rho1p, é essencial à ativação e à mobilização de Chs3p até a membrana citoplasmática. Tanto em *S. cerevisiae* como em *C. albicans*, a ativação da via PKC em resposta à exposição a agentes perturbadores da parede celular, resulta em aumento dos níveis de quitina, principalmente pela mobilização de Chs3p (22, 102, 207, 219).

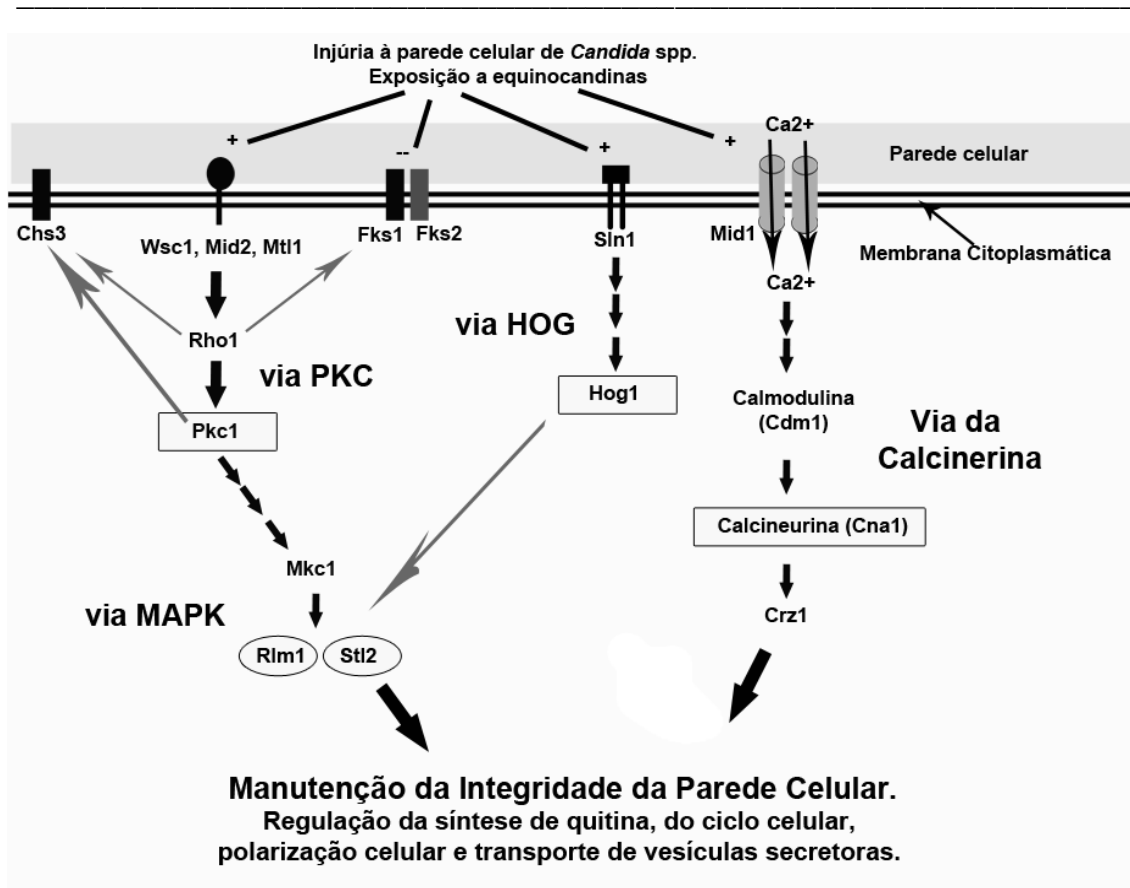


Figura 3. Vias de sinalização que regulam o remodelamento da parede celular de *C. albicans* em resposta à exposição a agentes perturbadores da parede celular, incluindo as equinocandinas. A exposição às equinocandinas resulta em danos à parede celular, principalmente pela inibição (--) de Fks1 (β -1,3-glucana sintase). Dessa forma, há ativação (+) das três vias PKC, HOG e Calcineurina, as quais são responsáveis pela regulação da expressão de genes relacionados à síntese de quitina, ao ciclo celular, à polarização celular e ao transporte de vesículas secretoras, na tentativa de manter a integridade da parede celular [Adaptado de Walker *et al.* (218)].

A via HOG é uma segunda cascata MAPK. O gene *HOG1* codifica uma proteína quinase (Hog1) da via HOG, a qual desempenha um papel importante na regulação da atividade de quitina sintase em condições de estresse osmótico, tanto em *S. cerevisiae* (71, 91) como em *C. albicans* (4, 58). Após a exposição ao estresse osmótico, a Sln1, uma molécula sensora presente na superfície celular, dispara uma série de eventos que levam à fosforilação de Hog1p, o qual ativa a via MAPK, regulando assim a expressão de inúmeros genes, incluindo aqueles envolvidos com a síntese da parede celular. Assim, em conjunto com a cascata PKC-MAPK, a via HOG auxilia na manutenção da parede celular em condições em que haja dano à mesma e estresse osmótico (58, 93, 107, 131, 219).

Por fim, a terceira via relacionada à manutenção da parede celular em condições de estresse é a via da calcineurina- Ca^{2+} . Quando a parede celular fúngica é exposta às equinocandinas, ocorre a entrada de Ca^{2+} através do canal Mid1. O íon cálcio ligam-se à calmodulina (Cdm1), que por sua vez ativa a subunidade catalítica da calcineurina (Cna1). A calcineurina defosforila o fator transcricional Crz1, o qual promove uma série de eventos relacionados à manutenção da integridade celular, incluindo a ativação de genes *Chs* (107, 218). Estudo de Munro *et al.* (131) mostrou que o tratamento de *C. albicans* com substâncias inibidoras da via da calcineurina e as mutações no gene *CNA1*, codificador da subunidade catalítica da calcineurina, resultam em diminuição da transcrição dos genes *CHS* e em hipersensibilidade à caspofungina.

De forma geral, podemos concluir que a ativação de vias relacionadas à síntese de componentes da parede celular e o aumento da síntese de quitina podem surgir com um potencial mecanismo de resistência às equinocandinas (218, 219).

Além da preocupação com a seleção de isolados resistentes e com o aparecimento de novos mecanismos de resistência às equinocandinas, outro fenômeno que tem despertado a atenção de diversos grupos de pesquisa é o Efeito Paradoxal das Equinocandinas.

1.3. Efeito paradoxal das equinocandinas em leveduras do gênero *Candida*

O efeito paradoxal (EP) em *Candida* spp. é um fenômeno *in vitro*, descrito como o crescimento celular em concentrações de equinocandinas acima da CIM durante o teste de susceptibilidade em microdiluição em caldo, segundo o CLSI, documento M27-A3 (18, 33, 119, 199). Os isolados que apresentam esse fenômeno tem seu crescimento inibido a baixas concentrações de CAS (geralmente $< 1 \mu\text{g/mL}$), no entanto, em concentrações superiores a CIM (geralmente $\geq 8 \mu\text{g/mL}$) retomam a capacidade de crescimento (119, 199, 201). Assim, há uma crescente preocupação em

relação à possibilidade de falha terapêutica em esquemas utilizando doses elevadas de equinocandinas.

O EP é um fenômeno diferente do *trailing*, também observado em testes *in vitro*. Enquanto o *trailing* é um fenômeno majoritariamente espécie-específico, observado apenas em isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* durante os testes de susceptibilidade a azólicos, o EP pode ser detectado em diversas espécies de *Candida*, entre elas *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*. Além disso, o *trailing* refere-se ao crescimento reduzido, mas persistente, em todas as concentrações acima da CIM, enquanto no EP há inibição do crescimento em baixas concentrações e o ressurgimento do crescimento em concentrações acima da CIM, geralmente com um intervalo de duas diluições entre a inibição e o EP (119, 218).

Diversos estudos têm relatado a ocorrência de EP durante os testes de susceptibilidade às equinocandinas. Chamilos *et al.* (33) reportaram uma frequência de EP da caspofungina em 60%, 90% e 40% dos isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, respectivamente, relatando ainda ausência de EP em isolados de *C. glabrata*. Em outro estudo sobre a atividade da caspofungina em isolados de *Candida* não-*C. albicans*, a frequência do EP foi de 31,97%, sendo os maiores índices encontrados entre os isolados de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, 58,82% e 52,38%, respectivamente (181). Importante ressaltar que a não constatação do EP por outros estudos deve-se ao fato de que, geralmente, o teste de susceptibilidade a CAS é realizado em concentrações $\leq 8 \mu\text{g/ml}$, não sendo possível a detecção precisa desse fenômeno nessas condições (181).

Interessantemente, diversos estudos têm mostrado que a frequência do EP apresenta diferenças relacionadas à espécie de *Candida* bem como ao tipo de equinocandina (33, 65, 119, 181). Embora os diversos estudos apresentem grandes variações, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* figuram entre as espécies que apresentam as maiores taxas de EP da caspofungina, enquanto *C. glabrata* apresenta baixa frequência (33, 119, 181). Em relação às diferenças observadas entre as equinocandinas, parece razoável supor que durante os testes com caspofungina a frequência do EP é maior quando

comparada à anidulafungina e à micafungina (33, 65). Os mecanismos relacionados a essas variações ainda não foram elucidados.

Estudos para compreensão da natureza do EP têm mostrado que o mesmo não ocorre devido à seleção de uma subpopulação resistente a altas concentrações do antifúngico. As células isoladas dos poços com EP, quando submetidas a um novo teste de susceptibilidade não se apresentam resistentes, mostram apenas o mesmo perfil anteriormente observado (201). Além disso, diferentemente do fenômeno de resistência das equinocandinas, no qual os isolados resistentes apresentam mutações no gene *FKS1*, a ocorrência de EP não está relacionada a estas mutações (158, 200).

O EP é um fenômeno complexo que envolve a regulação das vias responsáveis pela síntese da parede celular, em resposta à exposição a concentrações elevadas de equinocandinas. Já foi constatado que durante o EP há um aumento do conteúdo de quitina e uma diminuição de β -1,3-glucana, cuja síntese é inibida pela atividade das equinocandinas (200). Os mecanismos moleculares envolvidos com o aumento de quitina durante o EP ainda não estão completamente elucidados, porém tem sido sugerido que as vias PKC, HOG e calcineurina- Ca^{2+} estejam envolvidas. Em um estudo do grupo de Wiederhold *et al.* (225) foi mostrado que mutações no gene *MKC1*, que codifica uma proteína da via MAPK, resultaram em diminuição do EP. Além disso, a combinação de equinocandinas e inibidores da via da calcineurina resultaram na eliminação do EP (225), indicando a possível participação desta via no fenômeno do EP. Há necessidade de estudos mais detalhados para verificar a participação de cada via na regulação do EP e no aumento da expressão dos genes *CHS*.

Embora tenha sido mostrado que o EP apresenta alta frequência em testes *in vitro*, este fenômeno ainda não foi comprovado em modelos animais ou ensaios clínicos com equinocandinas. Apesar disso, alguns indícios importantes têm sido observados em alguns estudos. Clemons *et al.* (2006) (42) utilizaram um modelo murino de infecção sistêmica para determinar a possível significância *in vivo* do EP, utilizando quatro isolados de *C. albicans* que apresentaram EP *in vitro*. A administração de CAS em doses acima de 0,5 mg/kg foi eficaz em todos os casos. No entanto, para um desses isolados, o

grupo de animais que recebeu a dose de 20 mg/kg de CAS mostrou uma taxa maior de recuperação de UFC quando comparado ao grupo que recebeu apenas 5 mg/kg, o que indicaria um possível EP *in vivo*. No entanto, os resultados obtidos não mostraram reprodutibilidade e foram considerados inconclusivos.

Pappas *et al.* (152) realizaram um ensaio clínico comparando a eficácia de duas doses de Micafungina, 100 mg/dia e 150 mg/dia, com a dose convencional de Caspofungina (70 mg/dia) durante o tratamento de pacientes com candidemia ou com outras formas de candidíase invasiva. Os autores relataram não ter havido diferença no sucesso terapêutico e na toxicidade entre os diferentes regimes terapêuticos utilizados. Vale ainda mencionar que o tratamento com a maior dosagem de micafungina (150 mg/dia) não ofereceu nenhuma vantagem quando comparado com a dosagem de 100 mg/dia de micafungina ou com 70 mg/dia de caspofungina. Ao contrário disso, entre os pacientes com candidíase invasiva (não-candidemia), aqueles que receberam a dose de 150 mg/dia de micafungina apresentaram uma porcentagem maior de falha terapêutica (47%, 14/30) quando comparado aos pacientes que receberam a dosagem de 100 mg/dia (22%, 6/28). Embora não tenham sido constatadas diferenças estatisticamente significativas, há uma preocupação de que o tratamento com maiores concentrações de micafungina possa levar a uma maior porcentagem de casos de falha terapêutica. Os próprios autores sugerem que o EP das equinocandinas poderia explicar a ausência de vantagens do tratamento com maiores concentrações de micafungina e a maior porcentagem de falha terapêutica entre os pacientes tratados com 150mg/dia de micafungina.

Neste cenário, há interesse na realização de novos estudos experimentais e clínicos, no sentido de caracterizar os mecanismos moleculares que levam ao EP e os possíveis riscos da estratégia de utilização de equinocandinas em altas doses durante a terapia antifúngica. Por outro lado, a maioria dos estudos sobre EP tem sido conduzido com isolados de *C. albicans*, havendo necessidade de verificar se o padrão de alterações celulares observadas durante o EP é o mesmo em isolados de *Candida* não-*C. albicans*.

2.0 OBJETIVOS

A presente investigação teve por objetivos:

- I. Avaliar a frequência do efeito paradoxal (EP) da caspofungina durante os testes de susceptibilidade *in vitro*, utilizando diferentes espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis*.
- II. Analisar o comportamento celular ao longo do EP através dos ensaios de Concentração Fungicida Mínima e Curva de Morte nos isolados que apresentarem o EP da caspofungina;
- III. Avaliar as alterações morfológicas e ultraestruturais em células do EP da caspofungina através de microscopia eletrônica.
- IV. Verificar possíveis diferenças entre as alterações morfológicas e ultraestruturais apresentadas por isolados de *C. albicans* e por isolados de *Candida* não-*C. albicans*.
- V. Analisar as alterações dos componentes da parede celular em células do EP da caspofungina em diferentes espécies de *Candida*.
- VI. Avaliar os mecanismos moleculares envolvidos com o fenômeno do EP da caspofungina através da análise de expressão de genes relacionados à síntese da parede celular fúngica.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

Para facilitar a compreensão de cada etapa deste estudo, apresentamos na Figura 4 o fluxograma seguido durante o desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente realizamos uma triagem para determinar a CIM da Caspofungina (CAS) e a presença do EP durante os testes de susceptibilidade com todos os isolados de *Candida* spp. (Figura 4, quadro azul). Em seguida, foram selecionados dois isolados de cada espécie que apresentaram EP para a análise da atividade fungicida da CAS (Figura 4, quadro verde) e análise das alterações morfológicas e dos mecanismos moleculares durante o EP (Figura 4, quadro vermelho).

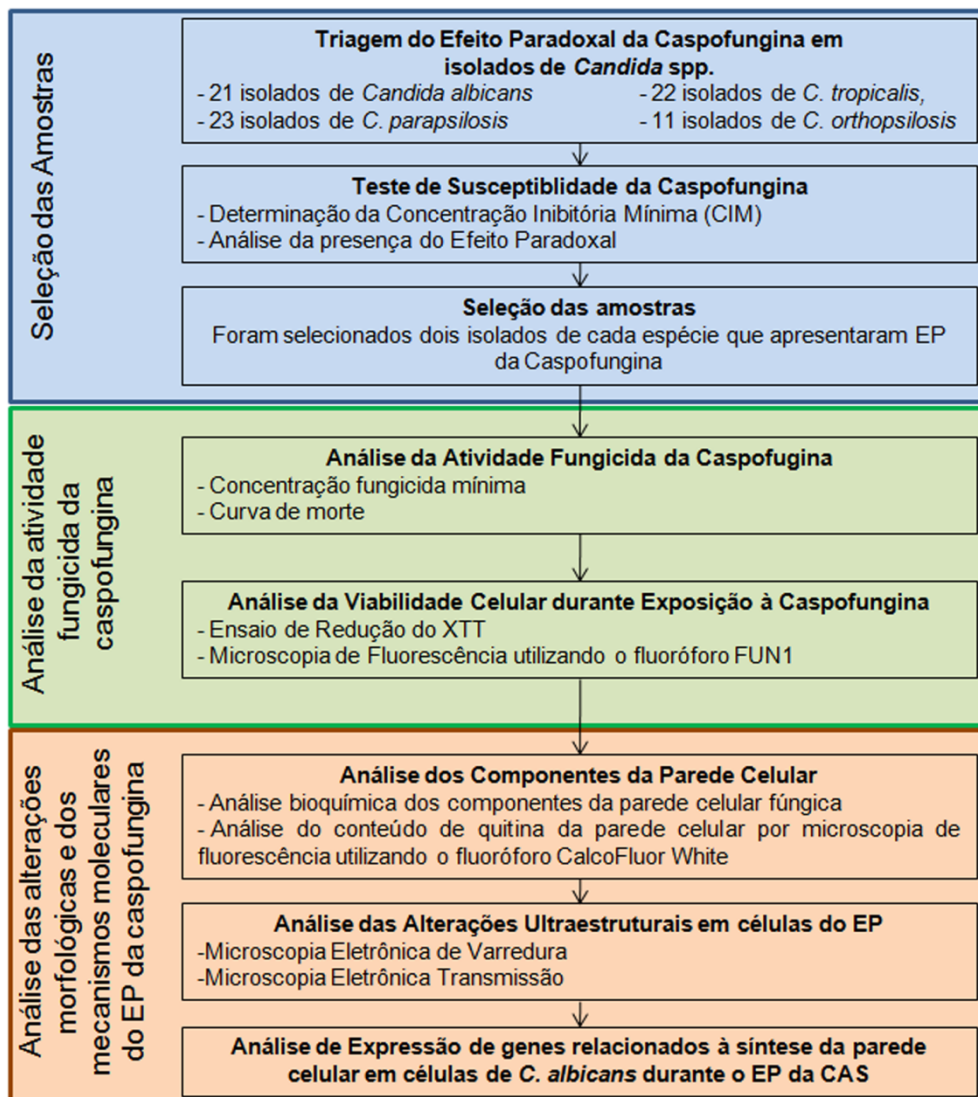


Figura 4. Fluxograma de trabalho seguido durante o desenvolvimento deste estudo. Inicialmente os isolados foram submetidos a uma triagem para determinação da CIM da Caspofungina e verificar a presença do EP (quadro azul). Após a seleção de dois isolados de cada espécie, realizamos a análise da atividade fungicida da CAS (quadro verde) e a análise das alterações morfológicas e dos mecanismos moleculares durante o EP (quadro vermelho).

3.1. Triagem do efeito paradoxal da CAS em isolados de *Candida* spp.

3.1.1. Microrganismos

Nesse estudo foram utilizadas 21 cepas de *Candida albicans*, 22 de *C. tropicalis*, 23 de *C. parapsilosis* e 11 de *C. orthopsilosis*, totalizando 77 amostras, todas isoladas de infecção de corrente sanguínea, provenientes do banco de microrganismos do Laboratório Especial de Micologia – LEMI. Inicialmente, esses isolados foram submetidos ao teste de susceptibilidade à CAS, conforme metodologias descritas abaixo.

3.1.2. Teste de susceptibilidade à caspofungina

A avaliação da sensibilidade à caspofungina foi realizada pelo método de microdiluição em caldo preconizado pelo CLSI, documento M27-A3 (43).

Foi utilizado o meio de cultivo sintético Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) com L-glutamina, preparado da seguinte forma: 10,4 g/L de RPMI-1640 (Cultilab) e 34,3 g/L de ácido morfolinopropanolsulfônico (MOPS). O pH foi ajustado para 7,0. O meio de cultivo foi esterilizado por filtração a vácuo, utilizando-se filtro biológico 0,22 µm (Corning Incorporated Costar, Corning, NY, EUA). Frascos contendo o meio foram conservados em refrigerador a 4 °C.

Soluções-estoque de Caspofungina foram preparadas a partir do pó puro deste antifúngico (Merck Sharp & Dohme) e mantidas a -20 °C até sua utilização, por período máximo de até seis meses. Previamente à realização dos ensaios, a solução-estoque de CAS foi diluída em dez diferentes concentrações seriadas (fator 2), de modo que o teste final fosse realizado com as seguintes concentrações: 0,125 a 64 µg/mL. Estas diluições foram preparadas ao dobro da concentração final sendo dispensados 100 µL de cada concentração nos poços das placas de microtitulação de fundo chato de 96 poços (Techno Plastic Products, Switzerland). Cada placa contém 12 colunas numeradas de um a doze e 8 linhas identificadas de A a H. Concentrações decrescentes da droga foram dispensadas seqüencialmente nas placas de microtitulação nos poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez. Os

poços de número 11 foram utilizados como controles de crescimento, contendo neles 100 µL de RPMI-1640 sem droga. Os poços pertencentes à coluna identificada com o número 12 foram utilizados como controles de esterilidade, contendo apenas 200 µL do meio RPMI-1640. As placas foram mantidas a -70v °C até sua utilização por período máximo de seis meses. No dia do experimento, as placas foram mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos antes de serem utilizadas.

A partir de um cultivo de 24 horas da levedura a ser testada, realizado em Sabouraud Dextrose Ágar (SDA), foi preparada uma suspensão de inóculo inicial com transmitância de 90% determinada por espectrofotometria, utilizando-se comprimento de onda a 530 nm. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI-1640 para obtenção de inóculo final contendo 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Alíquotas de 100 µL da solução do inóculo final foram dispensadas na placa de microdiluição, nas posições de 1 a 11, contendo 100 µL de diferentes concentrações dos antifúngicos testados. O poço 12 foi reservado para controle de esterilidade do meio, como mencionado anteriormente. Ao final, as placas foram transferidas para a estufa a 35 °C e leitura do teste foi realizada após 24 horas de incubação.

Além dos isolados clínicos selecionados, seguindo as orientações do CLSI, documento M27-A3 (2008), organismos controle de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 foram incluídos em cada lote de ensaios para a verificação da perfeita diluição dos antifúngicos. Esta verificação é possível uma vez que são conhecidas previamente as CIMs para estes microrganismos controles frente aos antifúngicos a serem testados.

3.1.2.1. Leitura e interpretação dos resultados de microdiluição em caldo

Para leitura do teste de microdiluição em caldo, as placas foram colocadas em suporte contendo espelho, permitindo a observação clara do reverso das mesmas. Foram realizadas leituras visuais após 24 horas de incubação. Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Caspofungina foram definidos como a menor concentração capaz de induzir

proeminente inibição (em torno de 50%) do crescimento celular, em relação ao poço controle, conforme orientações do CLSI, documento M27-A3 (43). Os isolados que apresentaram valores $\leq 2,0 \mu\text{g/mL}$ de CAS foram classificados como sensíveis.

Além disso, as CIMs foram classificadas de forma descritiva em termos de variação, CIM₅₀ (concentração de antifúngico capaz de inibir 50% dos isolados testados) e CIM₉₀ (concentração de antifúngico capaz de inibir 90% dos isolados testados).

O EP da CAS foi definido como retorno do crescimento celular em concentrações acima da CIM, devendo haver um intervalo mínimo de duas concentrações entre a CIM e o ressurgimento do crescimento celular.

3.1.3. Seleção de amostras para análise da atividade fungicida da caspofungina, análise das alterações morfológicas e dos mecanismos moleculares do EP da caspofungina

A partir dos resultados do teste de susceptibilidade da CAS, foram selecionados dois isolados de cada espécie que apresentaram EP da CAS. Os isolados selecionados deveriam apresentar valores semelhantes de CIM da CAS e padrão similar de EP, com presença de crescimento em $16 \mu\text{g/mL}$ de CAS. Estas cepas foram submetidas a ensaios para análise da atividade fungicida da caspofungina e análise das alterações morfológicas e dos mecanismos moleculares do EP.

3.2. Análise da atividade fungicida da caspofungina

3.2.1. Concentração fungicida mínima (CFM)

A CFM foi realizada segundo metodologia adaptada de Barchiesi *et al.* (14). Para essa metodologia foi utilizado inicialmente o mesmo protocolo para teste de sensibilidade em microdiluição em caldo, conforme descrito acima. No entanto, decorrido 24 horas de incubação e após a leitura da CIM, o conteúdo

total de cada poço, a partir do último poço com crescimento visível, foi plaqueado em SDA. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Decorrido esse período, foram quantificadas as unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). Também foi realizada a determinação das UFC/mL do inóculo utilizado em cada teste. A CFM foi determinada como a última concentração capaz de inibir $\geq 99\%$ das UFC/mL do teste em relação ao inóculo inicial.

3.2.2. Curva de morte em relação ao tempo

A curva de tempo de morte foi realizada segundo metodologia de Barchiesi *et al.* (14). O inóculo inicial utilizado para essa técnica foi de 1×10^6 a 5×10^6 UFC/mL. A partir dessa suspensão celular, 1 mL foi retirado e acrescentado a 9 mL do meio RPMI-1640 tamponado com MOPS com as seguintes concentrações de CAS: 0; 0,25; 0,5; 2,0; 16,0; 32,0 $\mu\text{g/mL}$ para os isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* e 0; 0,5; 1,0; 4,0; 16,0; 32,0 $\mu\text{g/mL}$ para *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*. O planejamento das concentrações utilizadas nos ensaios de curva de morte incluiu concentrações de CAS abrangendo concentrações abaixo da CIM, a concentração referente à CIM, ao menos uma concentração entre a CIM e o EP, e as concentrações onde foi observado o EP. As diferenças das concentrações utilizadas são necessárias devido às diferentes CIMs observadas para cada espécie. Nos tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas, 100 μL de cada tubo foram retirados, submetidos à diluição seriada e plaqueamento em SDA. As placas de SDA foram incubadas por 48 horas a 37 °C e posteriormente foi realizada a contagem do número de UFC/mL. Também foi realizada a determinação das UFC do inóculo utilizado em cada teste. A atividade fungicida foi determinada pela concentração do antifúngico capaz de inibir $\geq 99\%$ das UFC/mL do tubo teste comparado ao inóculo inicial.

3.2.3. Análise da viabilidade celular durante a exposição à caspofungina

3.2.3.1. Ensaio de redução do XTT

Além do teste convencional de microdiluição em caldo, realizamos o ensaio de redução do XTT, técnica esta já padronizada em nosso laboratório (Melo *et al.*, 2007; Melo *et al.*, 2010), para avaliar a atividade metabólica das células do EP. Este ensaio foi realizado apenas com os isolados selecionados, já mencionados anteriormente. Esse método baseia-se na capacidade das células viáveis reduzirem o XTT [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenil-amino)carboxil]-2H-tetrazólio hidróxido] ao sal tretazolium, através de suas desidrogenases mitocondriais. Essa reação ocasiona uma mudança colorimétrica que pode ser mensurada em espectrofotômetro e a quantidade de cor produzida tem relação com o número de células metabolicamente ativas.

Após a leitura do teste de microdiluição em caldo (24 horas de incubação), os isolados foram submetidos ao ensaio de redução do XTT. Foram adicionados 12 µL de uma solução contendo 1,0 mg/mL XTT (Sigma) e 0,4 mM menadiona (Sigma) a cada poço da placa de microdiluição. As placas foram incubadas a 37 °C por 1,5 hora protegidas da luz. Decorrido esse período, as placas foram submetidas à leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 490 nm. Os valores de absorbância dos controles negativos foram subtraídos das amostras teste para normalização dos resultados. A CIM foi determinada pela menor concentração do antifúngico capaz de inibir 50% da atividade metabólica, quando comparado ao controle de crescimento (sem adição do antifúngico). O EP da caspofungina foi caracterizado pela presença de atividade metabólica nas concentrações acima da CIM, onde foi observado retorno do crescimento celular nos testes de microdiluição em caldo. Estes testes foram realizados em triplicata em três ocasiões diferentes.

3.2.3.2. Microscopia de fluorescência utilizando o fluoróforo FUN1

Com o objetivo de analisar a viabilidade das células durante o EP e identificar as células metabolicamente ativas, aplicamos a técnica de microscopia de fluorescência, utilizando os fluoróforos CalcoFluor White (CFW)

e FUN1 (LIVE/DEAD® Yeast Viability Kit – Invitrogen).

O CFW é responsável pela marcação da quitina presente na parede celular, permitindo a visualização do contorno da célula fúngica. O FUN1 tem como objetivo a avaliação da viabilidade celular. Uma vez que a célula apresente a membrana citoplasmática íntegra e esteja metabolicamente ativa, este fluoróforo, originalmente verde e localizado de forma homogênea no citoplasma, é convertido a grânulos de coloração vermelha.

Os isolados selecionados foram cultivados em 10 mL de RPMI 1640 tamponado com MOPS (pH 7,0) por 24 horas a 37 °C com 150 rpm. Para obtenção das células do EP, o crescimento foi realizado em meio acrescido de 16 µg/mL de CAS. As células controle foram cultivadas sem adição da droga. Após o período de crescimento, as células foram lavadas duas vezes em solução de HEPES 10 mM pH 7,2, acrescido de 2% de glicose, para eliminação do meio de cultura. Os fluoróforos foram diluídos na solução HEPES/glicose nas concentrações de 15 µM de CalcoFluor e 10 µM de FUN1. Posteriormente, 100µL da solução dos fluoróforos foram adicionados a um tubo contendo 2,5 a 5×10^7 células/mL. Subsequentemente, a reação foi incubada a 37 °C por 2 horas. Após esse período de incubação, 5 µL de cada reação foram adicionados a uma lâmina de vidro e coberto com lamínula de 24 mm x 24 mm. Finalmente, as células foram observadas em microscópio invertido de fluorescência (Olympus IX81) e as imagens capturas através do software Cell[^]P, utilizando a câmera Olympus DP71. A captura das imagens referentes ao fluoróforo FUN1 foi realizada através do filtro azul U-MWB2 (Excitação: 460-590; Emissão: > 500) e CFW através do filtro U-MWU2 (Excitação: 330-385; Emissão: > 400).

3.3. Análise dos componentes da parede celular

3.3.1. Análise bioquímica dos componentes da parede celular fúngica

Tendo em vista que as equinocandinas inibem a síntese da parede celular, com a utilização dessa técnica, analisamos as mudanças na composição da parede celular das diferentes espécies durante o EP da CAS.

3.3.1.1. Cultivo e preparação das células

Os isolados selecionados foram cultivados em 50 mL de RPMI-1640 por 24 horas a 37 °C a 150 rpm. Para obtenção das células do EP, o crescimento foi realizado em meio acrescido de 16µg/mL de CAS. As células controle foram cultivadas sem adição da droga. Posteriormente, as células foram centrifugadas e lavadas em água destilada esterilizada por 3 vezes para eliminação do meio de cultura. No final deste processo, 1 mL de água destilada esterilizada foi adicionado ao *pellet* celular.

3.3.1.2. Lise mecânica das células e isolamento dos fragmentos da parede celular

Após o processo de lavagem, as células foram submetidas à lise mecânica, através do uso de pérolas de vidro. Foram adicionados ao *pellet* celular cerca de 600µL de volume de pérolas de vidro de 0,5mm (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA). Realizou-se, aproximadamente, 100 ciclos de congelamento/descongelamento e agitação em vortex, até completa lise celular, observada em microscópio de luz e subcultura. Após este processo, o lisado foi separado das pérolas de vidro, transferido para um novo tubo, centrifugado 10 min a 20.000 X g a 4 °C e lavado uma vez em água destilada. O sobrenadante foi dispensado e o *pellet*, contendo os fragmentos da parede celular, foi transferido para um tubo novo com peso conhecido. O *pellet* foi submetido a um processo de liofilização por 24 horas. Após este processo o tubo com o *pellet* foi pesado para sabermos o peso seco do *pellet* (peso do tubo com *pellet* – peso do tubo = peso do *pellet*).

3.3.1.3. Extração dos componentes da parede celular

O *pellet* liofilizado foi submetido a 3 ciclos de extração com 500µL de NaOH 3% a 75°C por 1 hora. A cada tratamento, a reação foi centrifugada 10 min a 20.000 X g, o sobrenadante foi descartado e 500 µL de NaOH 3% novamente adicionados ao *pellet*. No final deste processo, o *pellet* foi lavado uma vez em Tris-HCl 100 mM pH 7,5 e uma vez em Tris-HCl 10 mM pH 7,5.

Após essa lavagem, o *pellet* foi submetido à digestão em 500 μ L de Zymolyase (4 mg/mL em Tris-HCl 10 mM pH 7,5) (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan) em banho maria a 37 °C por 12 horas. Ao final da digestão, o material digerido foi centrifugado por 10 min a 20.000 X g a 4 °C. O sobrenadante foi dividido em duas partes iguais, uma delas transferida para um tubo novo (**fração 1**) para medir o conteúdo de hexose (β -1,3 + β -1,6 glucanas) e outra parte submetida a um processo de diálise em água por 24 horas, utilizando membrana de exclusão de 7000 (Spectrum Medical Industries, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA). O conteúdo restante no interior da membrana de diálise (**fração 2**) foi submetido à dosagem do conteúdo de hexose (apenas β -1,6 glucana). Com isso, subtraindo o valor do conteúdo de hexose do dialisado (apenas β -1,6 glucana) do conteúdo de hexose da fração 1 (β -1,3 + β -1,6 glucana), podemos chegar indiretamente ao valor do conteúdo de β -1,3 glucana.

O *pellet* da digestão com Zymolyase foi centrifugado, lavado uma vez com Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e uma vez com água destilada, e posteriormente eluído em água destilada. Seguiu-se com um processo de hidrólise em HCl 6N a 100 °C por 6 horas. O HCl foi evaporado e o *pellet* resultante foi ressuscitado em água destilada (**fração 3**), neutralizado em dissecador a vácuo contendo pastilhas de NaOH e posteriormente submetido à quantificação do conteúdo de hexosamina (quitina).

3.3.1.4. Determinação do conteúdo de hexose: método fenol-sulfúrico (dosagem de glucanas)

A determinação do conteúdo de hexose foi realizada para estimar o conteúdo de β -1,3 + β -1,6 glucana e β -1,6 glucana presentes nas **frações 1 e 2**, respectivamente, obtidas através dos processos de extração com NaOH e digestão com Zymolyase. Este método tem sido bastante utilizado em ensaios de determinação do conteúdo de glucanas da parede celular de *Candida* spp. (Stevens *et al.*, 2006; Nett *et al.*, 2007).

O ensaio foi realizado dentro de capela de segurança, utilizando tubos de ensaio de 5 mL. Foram adicionados 200 μ L da amostra, 200 μ L de fenol 5% e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. O tubo foi agitado e deixado em

repouso por 10 min a temperatura ambiente. Após esse período, realizou-se a leitura espectrofotométrica da reação em comprimento de onda de 492 nm. Foi realizada uma curva de calibração utilizando glicose como padrão para ser utilizada na quantificação do conteúdo de hexose das amostras. As seguintes concentrações de glicose foram utilizadas para realização da curva de calibração: 0, 6, 12, 18, 24 e 30 $\mu\text{g/mL}$. Como controles negativo no lugar da amostra foram adicionados 200 μL de água destilada. A concentração do conteúdo de glucana foi calculada em relação ao peso seco da parede celular (peso seco do *pellet*) (μg de glucana/mg de parede celular). Após esse processo de quantificação, o valor do conteúdo de hexose da fração 2 (apenas β -1,6 glucana) foi subtraído do conteúdo de hexose da fração 1 (β -1,3 + β -1,6 glucanas), possibilitando assim a quantificação indireta da concentração do conteúdo de β -1,3 glucana

3.3.1.5. Determinação do conteúdo de hexosamina: método de Morgan-Elson (dosagem de quitina)

A determinação do conteúdo de hexosamina foi realizada na **fração 3** obtida a partir do material não digerido pela Zymolyase. Este método tem sido empregado por outros estudos visando à determinação do conteúdo de quitina da parede celular de *Candida* spp. (Stevens *et al.*, 2006).

Os seguintes reagentes foram utilizados para realização deste teste:

- a) Solução de acetilacetona, preparado através da adição de 1 mL de acetilacetona (Sigma) em 50 mL de Na_2CO_3 preparado no dia do experimento;
- b) Reagente de Ehrlich's, preparado através da adição de 0,8 g de p-dimetilaminobenzaldeído (Sigma) em 30 mL de metanol (Merck) e 30 mL de HCl concentrado (Merck).

O ensaio foi realizado em tubos de ensaio de 5 mL dentro de capela de segurança. Foram adicionados 200 μL da amostra e 200 μL de solução de acetilacetona seguido de incubação a 100°C por 15 min (os tubos foram tampados com esferas de vidro). Após essa incubação, foram adicionados 1 mL de etanol 95% e 200 μL do reagente de Ehrlich's. A reação foi homogeneizada e 400 μL de etanol 95% foram adicionados ao conteúdo de

cada tubo, que foi incubado a temperatura ambiente por 30 min. A leitura do teste foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm. Como padrão para realização da curva de calibração, utilizamos D-glicosamina nas seguintes concentrações: 0, 5, 10, 20, 30 e 40 µg/mL. Como controle negativo, no lugar da amostra foram adicionados 200 µL de água destilada. A concentração do conteúdo de quitina foi calculada em relação ao peso seco da parede celular (peso seco do *pellet*) (µg de quitina/mg de parede celular).

Estes experimentos foram realizados com a colaboração do Prof. Hélio K. Takahashi e Prof^a. Dr^a. Anita Straus do departamento de bioquímica – UNIFESP.

3.3.2. Análise do conteúdo de quitina da parede celular por microscopia de fluorescência utilizando o fluoróforo CalcoFluor White (CFW)

Seguindo a mesma metodologia aplicada à análise da viabilidade celular por microscopia de fluorescência, os isolados selecionados foram cultivados em 10 mL de RPMI-1640 tamponado com MOPS (pH 7,0) por 24 horas a 37°C com 150 rpm. Para obtenção das células do EP, o crescimento foi realizado em meio acrescido de 16µg/mL de CAS. As células controle foram cultivadas sem adição da droga. Após o período de crescimento, as células foram lavadas duas vezes em solução de HEPES 10 mM pH 7,2, acrescido de 2% de glicose, para eliminação do meio de cultura. As células foram fixadas por 12 horas a 4°C em solução de formalina 10% tamponada (pH 7,0) (Sigma-Aldrich). O fluoróforo CalcoFluor White foi diluído na solução HEPES/glicose para concentração final de 5 µM. Posteriormente, 100 µL da solução de CFW foram adicionados a um tubo contendo 2,5 a 5 X 10⁷ células/mL. Subseqüentemente, a reação foi incubada a 37 °C por 10 min. Após esse período de incubação, 10 µL de cada reação foram adicionados a uma lâmina de vidro e coberto com lamínula de 24 x 24 mm. Finalmente, as células foram observadas em microscópio invertido de fluorescência (Olympus IX81) e as imagens capturadas através do software Cell[^]P, utilizando a câmera Olympus DP71. A captura das imagens referentes ao fluoróforo CFW foi realizada através do filtro U-MWU2 (Excitação: 330-385; Emissão: > 400).

O CFW é responsável pela marcação da quitina presente na parede celular, permitindo a quantificação relativa através da intensidade de fluorescência. Assim, nós fixamos o tempo de exposição em 0,3 segundos e realizamos uma análise comparativa entre a intensidade de fluorescência de células controle e células do EP. A maior intensidade de fluorescência indica maior concentração de quitina na parede celular. Para este tipo de experimento, analisamos a intensidade de fluorescência de 30 células do grupo controle e EP, para cada isolado testado. A comparação entre as células controle e células do EP foi realizada utilizando o teste *t* de Student (Microsoft Office Excel 2003 e Cell[^]P software). O nível de significância para o valor de *P* foi considerado como $> 0,05$.

3.4. Análise das alterações ultraestruturais em células do EP

3.4.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os isolados selecionados foram cultivados em 10mL de RPMI-1640 tamponado com MOPS (pH 7,0) por 24 horas a 37 °C com agitação de 150 rpm. Para obtenção das células do EP, o crescimento foi realizado em meio acrescido de 16 µg/mL de CAS. As células controle foram cultivadas sem adição da droga. Após o período de crescimento, as células foram lavadas duas vezes em tampão PBS (pH 7,2) para eliminação do meio de cultura. Posteriormente, as seguintes etapas foram realizadas: **1) Fixação:** Após os processos de lavagem as células foram fixadas em uma solução de 4% de formaldeído e 2% de glutaraldeído por 24 h a 4 °C. Após a fixação, as células foram colocadas em lamínulas de vidro de 13mm, recobertas com poli-*L*-lisina, para adesão celular. **2) Lavagem:** as células foram lavadas 3 vezes por 30 min em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2 e deixadas neste tampão por 12 horas a 4 °C. **3) Fixação II:** realizou-se um processo de pós-fixação com 1% de tetróxido de ósmio por 1 h. **3) Lavagem II:** as células foram lavadas 3 vezes por 30 min em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2. **4) Tratamento com ácido tânico:** após a lavagem, realizou-se um tratamento com 1% de ácido tânico por 45 min. **5) Impregnação do ósmio:** as células foram tratadas com tetróxido de ósmio a 1% por 45 min. **6) Lavagem III:** nesta etapa, realizou-se a lavagem

com água destilada por 10 min, este processo foi repetido por 3 vezes. **7) Desidratação:** Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol: 2 vezes por 15 min em etanol 50%; 2 vezes por 15 min em etanol 70%; 2 vezes por 15 min em etanol 90% e 4 vezes por 15 min em etanol 100%. **8) Ponto crítico:** as amostras foram submetidas a ponto crítico usando CO₂, onde o conteúdo de etanol é substituído gradativamente pelo CO₂. Após a realização do ponto crítico a amostra encontra-se totalmente seca. **9) Recobrimento com ouro:** as amostras foram submetidas a um processo de recobrimento metálico utilizando ouro por *sputtering*, com uma camada de 25 nm do metal.

Cumprida todas as etapas acima, as amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JSM 5300), as imagens foram capturadas em filme fotográfico e reveladas em papel fotográfico. A medição do perímetro celular foi realizada através da análise das imagens no *software* Cell[^]P (Olympus), utilizando 20 células do grupo controle e EP de cada isolado. A comparação do perímetro celular das células controle e células do EP foi realizada utilizando o teste *t* de Student (Microsoft Office Excel 2003 e Cell[^]P *software*). O nível de significância para o valor de *P* foi considerado como > 0,05.

3.4.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Após o cultivo dos isolados e a lavagem, conforme metodologia descrita para MEV, as seguintes etapas foram realizadas: **1) Fixação:** Após os processos de lavagem as células foram fixadas em uma solução de 4% de formaldeído e 2% de glutaraldeído por 24 h a 4 °C. **2) Lavagem:** as células foram lavadas 3 vezes por 30 min em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2 e deixadas neste tampão por 12 horas a 4 °C. **3) Pós-fixação:** realizou-se um processo de pós-fixação com 1% de tetróxido de ósmio por 1 h. **3) Desidratação:** Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol: 2 vezes por 15 min em etanol 50%; 2 vezes por 15 min em etanol 70%; 2 vezes por 15 min em etanol 90% e 4 vezes por 15 min em etanol 100%. Após a desidratação, as células foram lavadas 2

vezes por 15 min em óxido de etileno. **4) Infiltração:** A infiltração das células em resina foi realizada através do seguinte tratamento: 1 vez por 2 h em resina epon/óxido de etileno 1:2; 1 vez por 12 horas em resina epon/óxido de etileno 1:1; 1 vez em resina epon pura por 12 horas; 1 vez por 1 hora em resina epon pura a 37 °C; **5) Polimerização:** finalmente, as células foram submetidas à inclusão e polimerização em resina epon pura a 60°C por 48 horas.

Os cortes ultrafinos foram realizados em ultramicrotomo. Cortes de aproximadamente 70 nm foram contrastados em 4% de acetato de uranila por 8 min e citrato de chumbo por 4 min. Em seguida, foram observados em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL, JEM-1200EX II).

Os experimentos de microscopia eletrônica foram realizados com a colaboração da Prof^a. Dr^a. Edna F. Haapalainen do Centro de Microscopia Eletrônica – CEME/UNIFESP.

3.5. Análise da expressão de genes relacionados à síntese da parede celular em *C. albicans* durante o EP da CAS

Para realização desses experimentos selecionamos o isolado 1399 de *C. albicans*. O isolado selecionado foi cultivado em 10 mL de RPMI 1640 tamponado com MOPS (pH 7,0) por 24 horas a 37 °C com agitação de 150 rpm. Para obtenção das células do EP, o crescimento foi realizado em meio acrescido de 16 µg/mL de CAS. As células controle foram cultivadas sem adição de CAS. As células foram lavadas 2 vezes em tampão PBS a 4°C e submetidas à extração do RNA total utilizando o RNeasy® Mini Kit (Qiagen), através do protocolo de lise mecânica com pérolas de vidro, durante o qual foi realizado um tratamento com DNase, segundo recomendações do fabricante.

O RNA total foi submetido à transcrição reversa para obtenção do cDNA. Para tanto, utilizou-se 1 µg de RNA total incubado por 10 min a 70 °C na presença de 1 µL do iniciador oligo(dT) 10 µM e água livre de RNase para volume final de 9,6 µL. Posteriormente, foi realizada a transcrição reversa através do kit Improm II™ - enzima transcriptase reversa (Promega) com incubação por 2 h a 42 °C. Ao final da reação, foi adicionado 4U de RNaseH (Promega) e incubou-se por 20 min a 37°C para degradação do RNA. O cDNA

obtido foi quantificado espectrofotometricamente. A PCR em tempo real foi realizada em um volume final de 25 uL contendo 12,5 uL de Master Mix (Power SYBR Green Master Mix – Applied Biosystems), 1 uL de cada oligonucleotídeo (5 µM), 10 µL de cDNA e 1,5 µL de água. Com o objetivo de usar a técnica de quantificação relativa através da metodologia de $\Delta\Delta C_t$, realizamos curva de calibração com 5 diferentes concentrações de cDNA, variando de 100 ng a 0,16 ng. A curva de calibração foi realizada para cada par de oligonucleotídeos. O seguinte protocolo de ciclagem foi utilizado: 55 °C 2 min, desnaturação a 94 °C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 94 °C por 15 seg, 55 °C por 30 seg e 60 °C por 30 seg. A PCR em tempo real foi realizada no sistema de detecção StepOnePlus (Applied Biosystems). Os oligonucleotídeos selecionados têm como alvo genes relacionados à biossíntese da parede celular (β -1,3-glucana sintase 1: FKS1; Quitina sintase 1, 2, e 3: CHS1, CHS2 e CHS3, respectivamente) e à regulação da síntese de elementos da parede celular (Calcineurin-like protein serine/threonine protein phosphatase – CNA1; MAP kinase involved in osmoregulation – HOG1; e Mitogen-activated protein kinase – MKC1). As sequências nucleotídicas dos genes foram obtidas através de sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e os oligonucleotídeos iniciadores foram “desenhados” com a utilização da ferramenta *primerselect* do software DNASTAR. A tabela 1 mostra a lista de oligonucleotídeos (*primers*), o nº de acesso do GenBank, a descrição dos genes e o tamanho do fragmento amplificado para cada gene selecionado para estudo de expressão.

Tabela 1. Lista de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para análise de expressão através de PCR em tempo real de células do EP de *C. albicans*.

Espécie	Primers	Tamanho do fragmento amplificado	Gene	Nº de acesso no GenBank
<i>C. albicans</i>	FKS1-Ca-F FKS1-Ca-R	138 pb	1,3-beta-D-glucan synthase subunit 1 (FKS1)	XM_716336.1 D88815.1
<i>C. albicans</i>	CHS1-Ca-F CHS1-Ca-R	158 pb	Chitin Synthase 1	XM_711849
<i>C. albicans</i>	CHS2-Ca-F CHS2-Ca-R	210 pb	Chitin Synthase 2	XM_711340
<i>C. albicans</i>	CHS3-Ca-F CHS3-Ca-R	248 pb	Chitin Synthase 3	DJ13454
<i>C. albicans</i>	CNA1-Ca-F CNA1-Ca-R	201 pb	calcineurin-like protein serine/threonine protein phosphatase – CNA1	XM_713902
<i>C. albicans</i>	HOG1-Ca-F HOG1-Ca-R	119 pb	MAP kinase involved in osmoregulation – HOG1	XM_715923
<i>C. albicans</i>	MKC1-Ca-F MKC1-Ca-R	221 pb	mitogen-activated protein kinase – MKC1	XM76708

pb: pares de base.

4.0 RESULTADOS

4.1. Triagem do efeito paradoxal da CAS em isolados de *Candida* spp.

4.1.1. Microrganismos

Foram utilizados 21 isolados de *C. albicans*, 22 isolados de *C. tropicalis*, 23 isolados de *C. parapsilosis* e 11 isolados de *C. orthopsilosis*, totalizando 77 amostras, todas provenientes de infecção de corrente sanguínea. Inicialmente, todos os isolados foram submetidos aos testes de susceptibilidade à caspofungina para determinação da CIM para caspofungina e análise da presença do EP, visando à seleção de isolados que apresentassem o EP. Todos os resultados são apresentados abaixo.

4.1.2. Teste de susceptibilidade à caspofungina

Os resultados do teste de susceptibilidade mostraram que os 77 isolados analisados neste estudo apresentaram valores de CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$, sendo classificados como sensíveis, de acordo com os valores sugeridos pelo CLSI, documento M27-A3 (2008). A tabela 2 mostra a distribuição dos valores de CIM da CAS entre os isolados das diferentes espécies de *Candida* analisadas neste estudo.

Tanto *C. parapsilosis* como *C. orthopsilosis* apresentaram CIM₅₀ e CIM₉₀ de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e 2,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram os mesmos valores de CIM₅₀ e CIM₉₀, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e 0,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Esses resultados mostram que *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* apesar de sensíveis à caspofungina, apresentam valores de CIM mais elevados quando comparado à *C. albicans* e *C. tropicalis*.

A tabela 2 mostra ainda a ocorrência do EP e as concentrações onde foi observado este fenômeno. Em relação ao EP, foi constatado que 42 (54,5%) dos 77 isolados testados apresentaram EP da CAS. As concentrações onde foi observado este fenômeno variaram de 4 a 32 $\mu\text{g/mL}$ de caspofungina, sendo mais frequentemente observado na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$, uma vez que 37 dos 42 isolados apresentaram EP nesta concentração. Interessantemente, notamos um intervalo mínimo de duas concentrações entre a CIM e o ressurgimento do crescimento celular. Importante ressaltarmos ainda, que o EP pode ocorrer em mais de uma concentração de CAS: 16 dos 42 isolados

apresentaram EP nas concentrações de 16 e 32 µg/mL; 8 dos 42 isolados, em 8 e 16 µg/mL; 4 dos 42 isolados, em 4, 8 e 16 µg/mL. Além disso, houve diferenças na frequência do EP entre as diferentes espécies analisadas, *C. parapsilosis* apresentou maior frequência (65,2%), seguida por *C. albicans* (61,9%), *C. tropicalis* (54,5%) e *C. orthopsilosis* (18,2%).

Tabela 2A. Concentração inibitória mínima (CIM) da Caspofungina dos 77 isolados estudados, obtida através da técnica de microdiluição em caldo, segundo documento M27-A3 do CLSI (2008). Os resultados mostram a presença do Efeito Paradoxal (EP) da Caspofungina durante o teste de susceptibilidade e as concentrações onde foi observado o EP.

Isolados	Crescimento celular nas concentrações de caspofungina (µg/mL)										EP
	0.12	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	16	32	64	
<i>C. albicans</i>											
1399	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	Sim
1487	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	Sim
1499	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	Sim
1513	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1585	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	Sim
1600	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	Sim
1697	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1804	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1811	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1817	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1950	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Sim
1954	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Sim
1961	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
2164	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
2178	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Sim
1238B	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Sim
1251A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Sim
1254C	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Sim
1389A	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Sim
1917B	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Sim
1926A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CIM: nº cumulativo de isolados (%)	7 (33)	14 (67) ^a	19 (90) ^b	21 (100)							
EP: número de isolados (%)							3	9	7	0	13 (62)

Tabela 2B.

<i>C. tropicalis</i>	Crescimento celular nas concentrações de caspofungina (µg/mL)										EP
	0.12	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	16	32	64	
1215	+	+	-				+	+			Sim
1242	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Sim
1257	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Sim
1284	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Sim
1307	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Sim
1398	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
1437	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1507	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Sim
1552	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1614	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	Sim
1801	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1821	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1826	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1854	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1914	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
1985	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
2142	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
2541	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	Sim
2546	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	Sim
1490A	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	Sim
1684A	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Sim
1933A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Sim
CIM: nº cumulativo de isolados (%)	4 (18)	11 (50) ^a	20 (91) ^b	22 (100)							
EP: nº de isolados (%)						3	7	11	2	0	12 (54)

Tabela 2C.

<i>C.parapsilosis</i>	Crescimento celular nas concentrações de caspofungina (µg/mL)										EP
	0.12	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	16	32	64	
1240	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	Sim
1277	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
1302	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	Sim
1403	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Sim
1620	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
1639	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
1683	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
1761	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
1800	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
1856	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	Sim
1938	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	Sim
1960	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	Sim
1973	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	Sim
1974	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	Sim
2195	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	Sim
2248	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	Sim
2271	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	Sim
2401	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	Sim
1268A	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	Sim
1431A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
1529A	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	Sim
1659A	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	Sim
1912A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CIM: nº cumulativo de isolados (%)	1 (4)	2 (9)	4 (17)	17 (74) ^a	23 (100) ^b						
EP: n número de isolados (%)						1	3	15	11	0	15 (65)

Tabela 2D.

<i>C. orthopsilosis</i>	Crescimento celular nas concentrações de caspofungina ($\mu\text{g/mL}$)										EP	
	0.12	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	16	32	64		
1502	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1698	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
1803	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1825	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	Sim	
1860	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-		
1868	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-		
1963	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-		
1971	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-		
1238A	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	Sim	
2014A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
2077A	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-		
CIM: nº cumulativo de isolados (%)	0	1 (9)	3 (27)	8 (73) ^a	11 (100) ^b							
EP: nº isolados (%)							1	2	2	0	2 (18)	

+ (cinza): indica crescimento celular;

- : indica inibição do crescimento celular.

- (azul): indica a concentração inibitória mínima do isolado.

a: indica a CIM₅₀ (concentração de antifúngico capaz de inibir 50% dos isolados testados).

b: indica a CIM₉₀ (concentração de antifúngico capaz de inibir 90% dos isolados testados).

EP: Efeito Paradoxal da Caspofungina.

4.1.3. Seleção de amostras para análise da atividade fungicida da caspofungina, análise das alterações morfológicas e dos mecanismos moleculares do EP da caspofungina

Após os resultados dos testes de susceptibilidade à caspofungina, entre os isolados que apresentaram EP da CAS no teste de susceptibilidade, dois isolados de cada espécie foram selecionados para os demais testes. Foram selecionados isolados que apresentaram valores semelhantes de CIM e padrão similar do EP, devendo apresentar EP na concentração de 16 µg/mL. Abaixo segue a tabela 3 com os isolados selecionados para os ensaios de viabilidade celular, concentração fungicida mínima (CFM), curva de morte em relação ao tempo, análise ultraestrutural, análise bioquímica dos componentes da parede e expressão de genes relacionados à síntese da parede celular.

Tabela 3. Características dos isolados selecionados para os demais testes propostos neste estudo.

Espécies (n)	Isolados	CIM - CAS (µg/mL)	EP observado nas concentrações de (µg/mL)
<i>C. albicans</i> (2)	1399	0.5	8.0 e 16.0
	1954	0.25	16.0
<i>C. tropicalis</i> (2)	1507	0.25	8.0 e 16.0
	1490A	0.5	16.0
<i>C. orthopsilosis</i> (2)	1825	1.0	8.0, 16.0 e 32.0
	1238A	1.0	16.0 e 32.0
<i>C. parapsilosis</i> (2)	1856	1.0	16.0 e 32.0
	1529A	1.0	16.0 e 32.0

CIM: concentração inibitória mínima.

CAS: Caspofungina.

EP: efeito paradoxal.

4.2. Análise da atividade fungicida da caspofungina

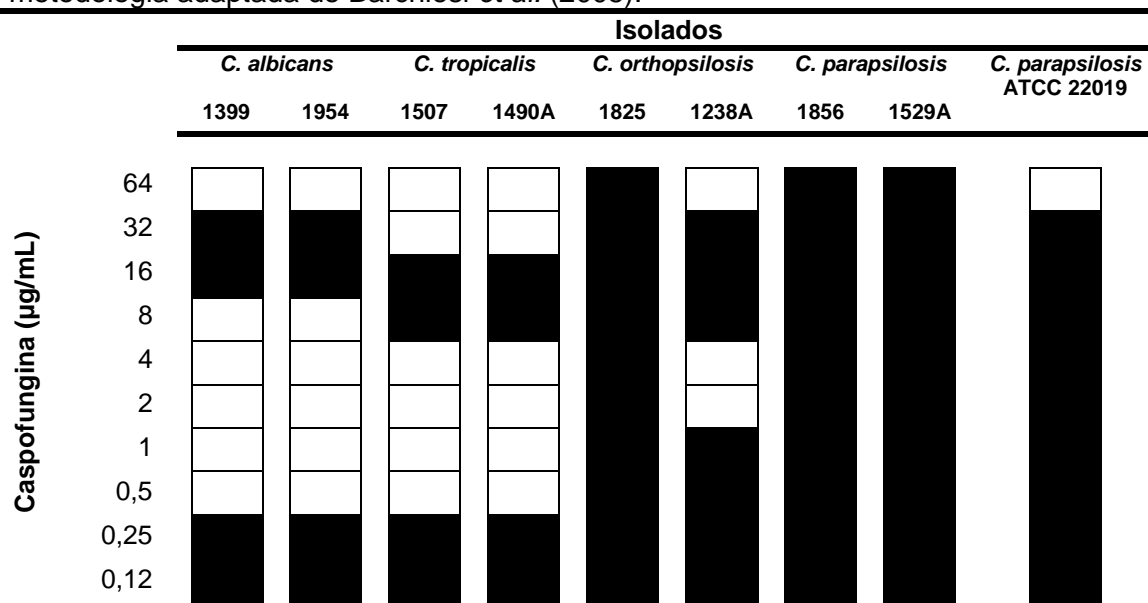
4.2.1. Concentração fungicida mínima (CFM)

Este ensaio teve como objetivo analisar a atividade fungicida da CAS e confirmar a presença do EP. Entre os isolados testados, os resultados da CFM mostraram que a atividade fungicida da CAS foi diferente entre as espécies de

Candida analisadas. Os isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram um perfil semelhante, com CFM de 0,5 µg/mL de CAS (Tabela 4). No entanto, devido ao EP, nota-se claramente o retorno do crescimento celular entre 8,0 e 32 µg/mL de CAS. Contra os isolados de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* a CAS parece não possuir atividade fungicida, uma vez que estes isolados apresentaram crescimento celular em todas as concentrações analisadas, com exceção do isolado 1238A de *C. orthopsilosis*, que mostrou inibição do crescimento nas concentrações de 2,0 e 4,0 µg/mL de CAS, com retorno do crescimento nas concentrações entre 8 e 32 µg/mL (Tabela 4).

Assim, constatamos que contra isolados que apresentam o EP, a CAS não apresentou atividade fungicida em altas concentrações. Além disso, nos testes com *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* este antifúngico não mostrou atividade fungicida satisfatória, uma vez que não houve redução de 99% das UFC, em relação ao inóculo inicial, em nenhuma das concentrações analisadas. Dessa forma, não foi possível analisar adequadamente a presença do EP em isolados de *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* utilizando o teste de CFM.

Tabela 4. Concentração fungicida mínima (CFM) da caspofungina, segundo metodologia adaptada de Barchiesi *et al.* (2005).



As regiões das barras preenchidas em preto representam as concentrações onde a caspofungina não apresentou atividade fungicida (inibição < 99%). Os espaços sem preenchimentos representam as concentrações onde a inibição foi ≥ 99% em relação ao inóculo inicial.

4.2.2. Curva de morte em relação ao tempo

Através deste ensaio, analisamos o comportamento celular em diferentes concentrações de CAS em relação ao tempo. Foram utilizadas as concentrações em que foi constatada previamente a inibição do crescimento no teste de microdiluição em caldo e onde houve ocorrência de EP, além de um controle de crescimento na ausência do antifúngico.

Os ensaios de curva de morte confirmaram a ocorrência do EP em todos os oito isolados testados (Figura 5), mas algumas diferenças foram observadas em relação às diferentes espécies analisadas. Os isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* (Figura 5 A-D) apresentaram padrões semelhantes, sendo que o EP foi caracterizado pela atividade fungicida em baixas concentrações de CAS (0,25; 0,5 e 2,0 µg/mL) e crescimento celular em altas concentrações, principalmente em 16 µg/mL de CAS. Nas concentrações onde houve inibição do crescimento (0,5 e 2,0 µg/mL) no teste de microdiluição em caldo, houve redução total no número de UFC, mostrando que para *C. albicans* e *C. tropicalis* a CAS possui atividade fungicida em baixas concentrações.

Já para os isolados de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* (Figura 5 E-H), as concentrações de CAS variando de 0,25 a 32 µg/mL apresentaram atividade predominantemente fungistática, uma vez que não foi observada redução superior a 99% das UFC, com exceção do isolado 1238A de *C. orthopsilosis* que apresentou redução total das UFC nas concentrações de 1,0 e 4,0 µg/mL de CAS. Diferente do teste de CFM, onde não foi possível analisarmos o EP devido à atividade fungistática da CAS, através dos ensaios de curva de morte foi possível observarmos a ocorrência do EP em *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis*, uma vez que nas concentrações de 16 e 32 µg/mL o número de UFC apresentou-se muito mais elevado quando comparado ao encontrado em concentrações mais baixas (entre 0,5 e 4,0 µg/mL). Interessantemente, notamos que nas concentrações referentes ao EP (16 e 32 µg/mL de CAS), houve uma redução das UFC nas horas iniciais (até 6 horas), seguida por crescimento nas horas seguintes (9 a 48 horas).

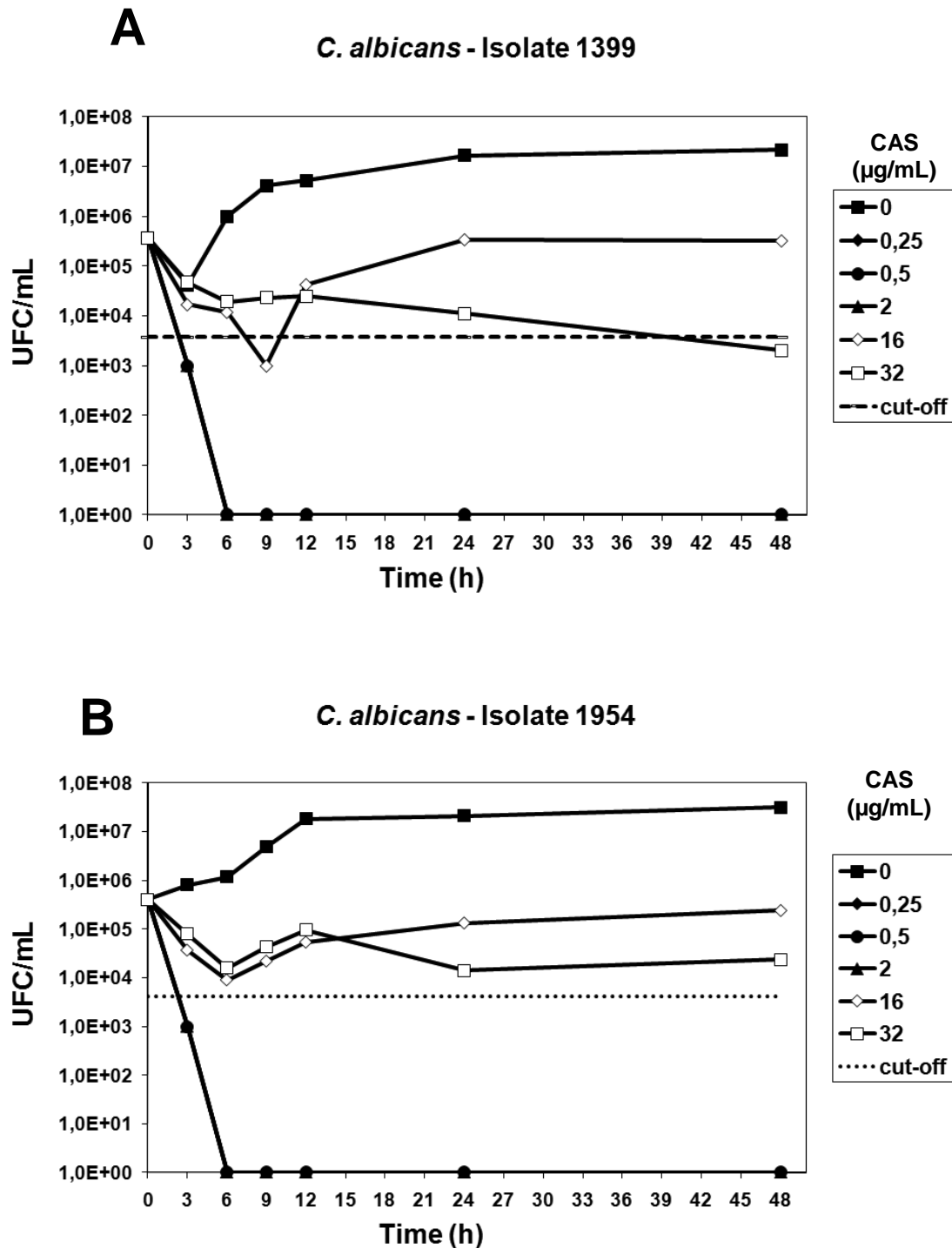
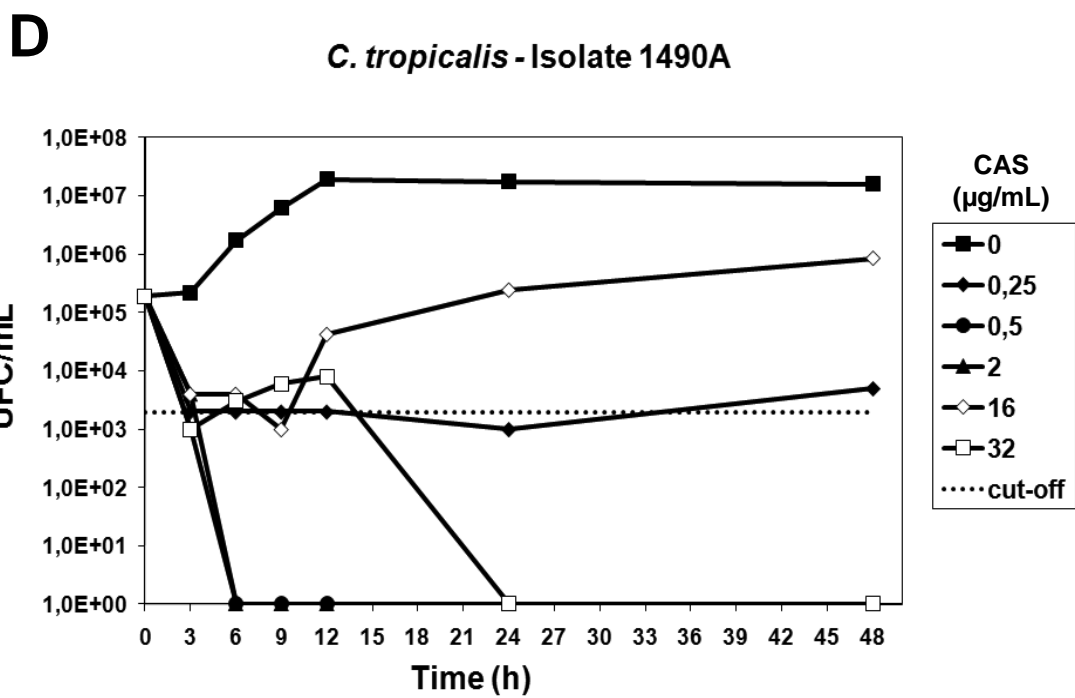
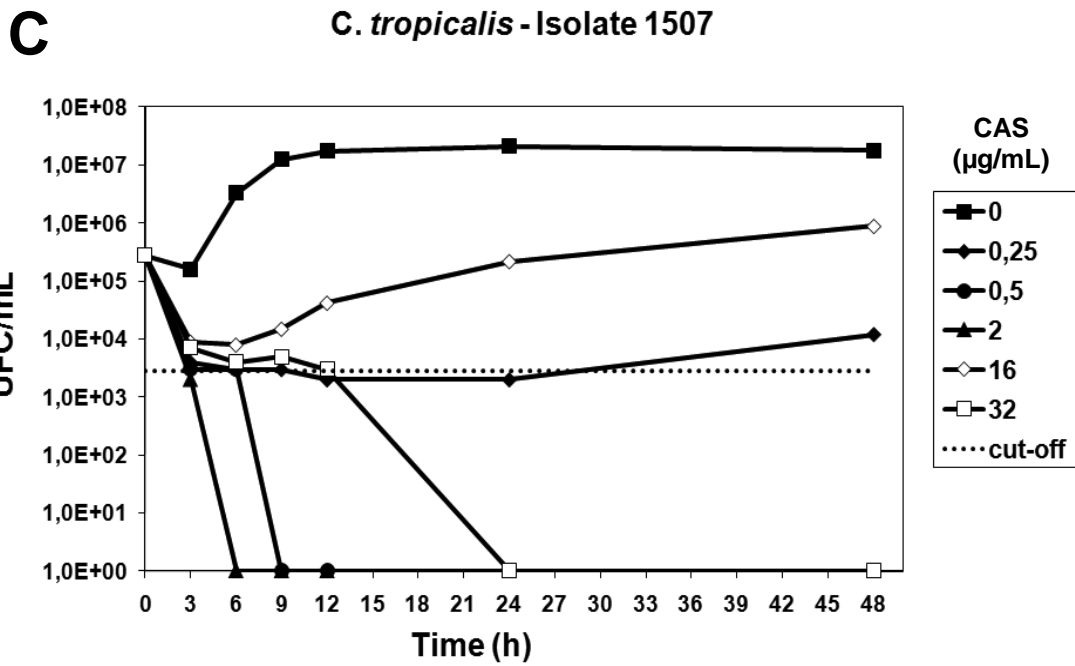
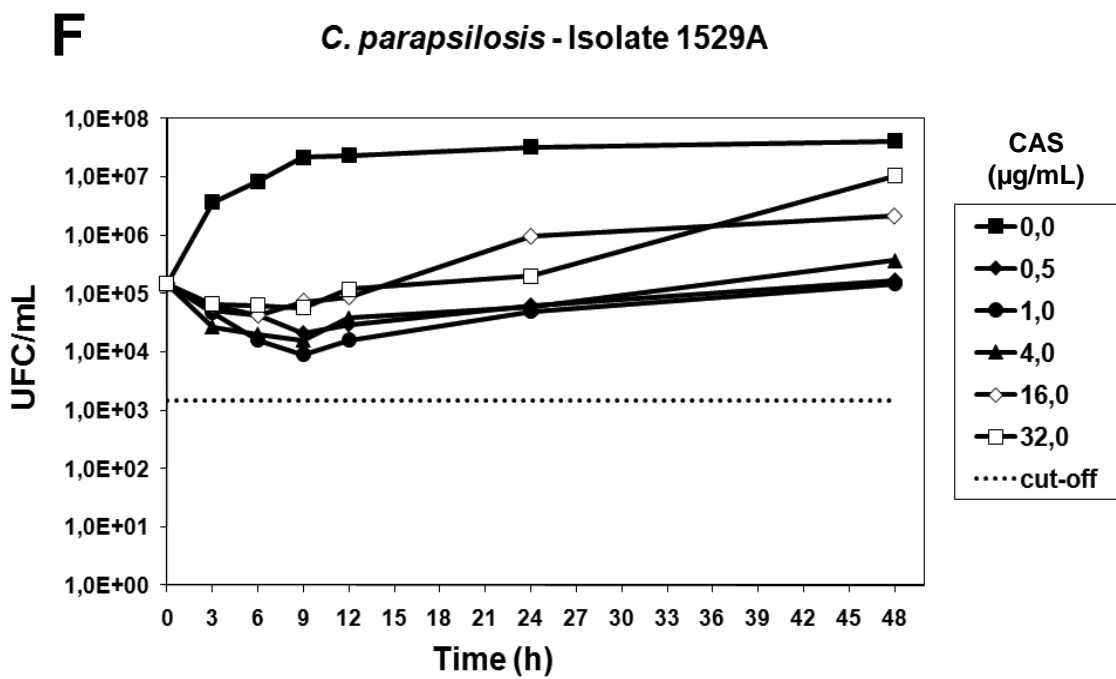
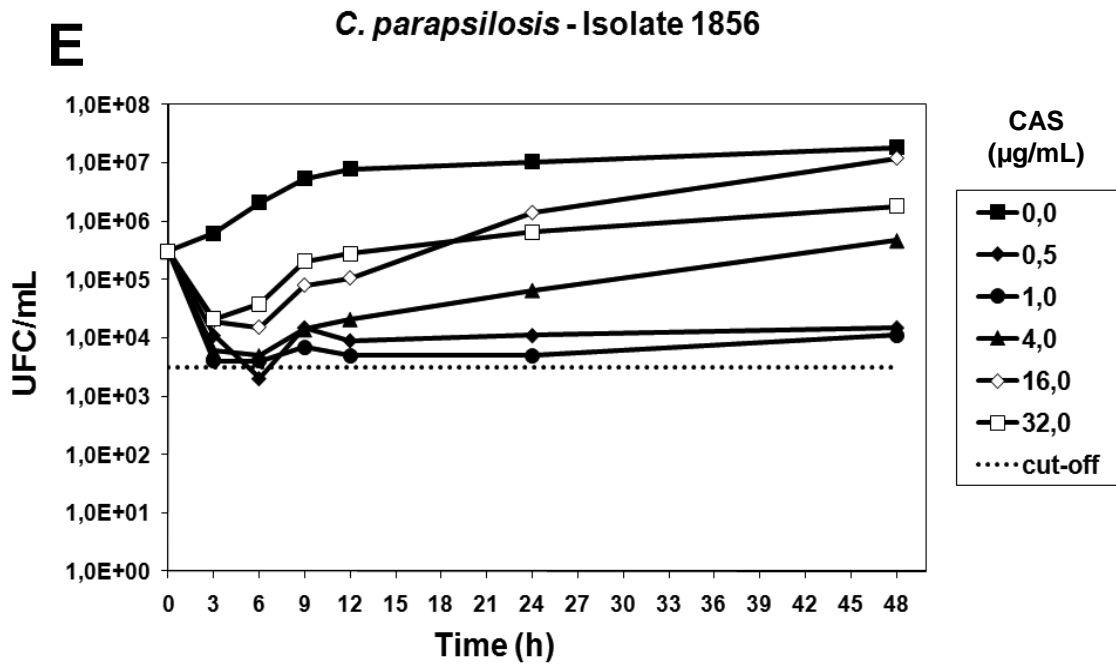


Figura 5: Curva de morte em relação ao tempo, segundo metodologia adaptada de Barchiesi *et al.*, 2005. Isolados de *C. albicans* (A-B), *C. tropicalis* (C-D), *C. parapsilosis* (E-F) e *C. orthopsilosis* (G-H) foram cultivados em concentrações de droga que variaram entre 0 e 32 $\mu\text{g/mL}$. Estas culturas foram avaliadas quanto às UFC nos tempos: 0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas de incubação. A linha pontilhada representa o *cut-off* do teste, referente a 99% de inibição das UFC em relação ao inóculo inicial (atividade fungicida).

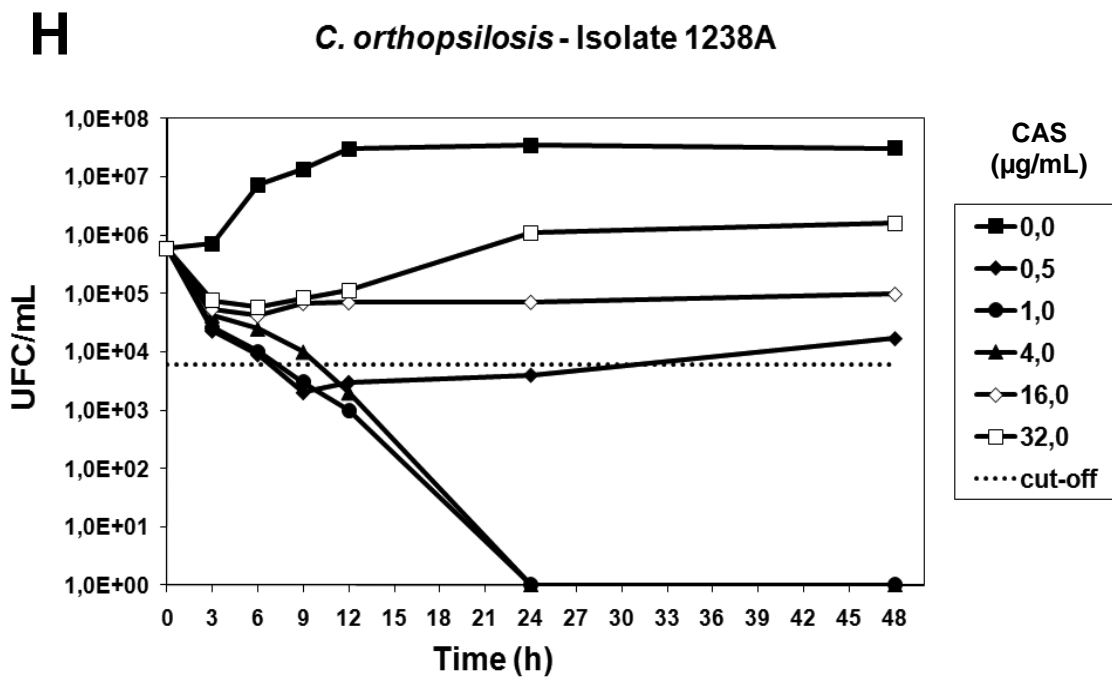
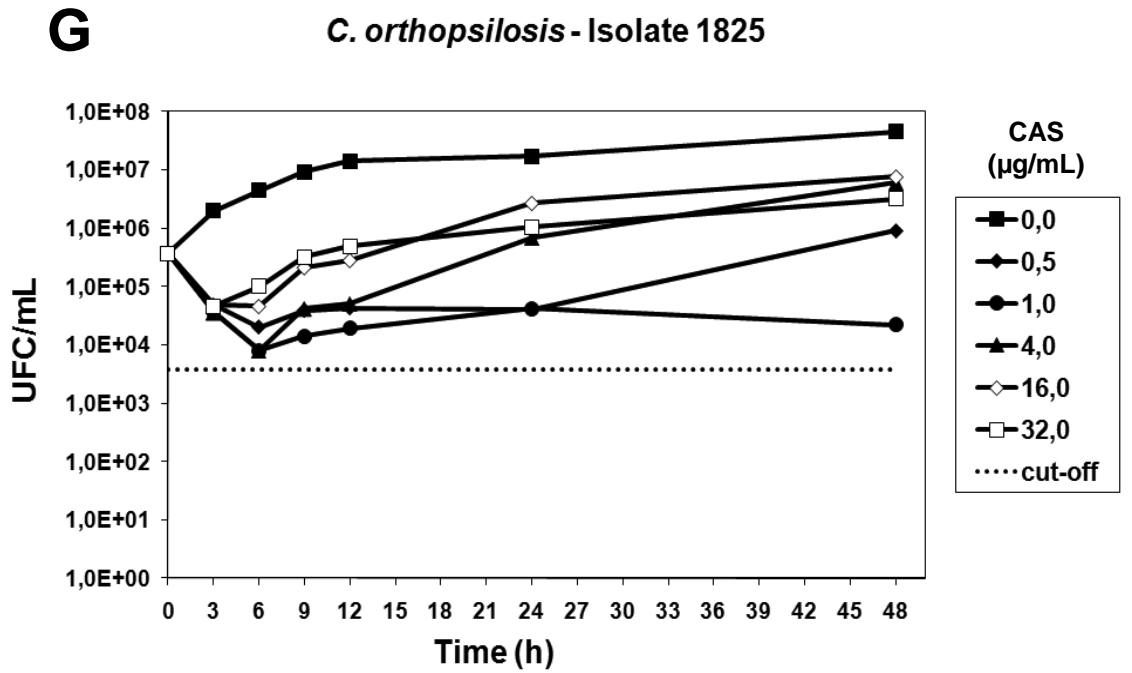
Cont. Figura 5.



Cont. Figura 5.



Cont. Figura 5.



4.2.3. Análise de viabilidade celular durante exposição à caspofungina

4.2.3.1. Ensaio de redução do XTT

Além do teste convencional de microdiluição em caldo, os isolados selecionados (Tabela 3) foram submetidos ao ensaio de redução do XTT para verificar a atividade metabólica das células do EP. A atividade metabólica está diretamente relacionada à densidade celular observada visualmente.

Neste ensaio, percebemos uma diminuição da atividade metabólica nas concentrações subsequentes às CIM e aumento da atividade metabólica nos poços entre 8 e 32 $\mu\text{g/mL}$ de CAS, fenômeno característico do EP (Figura 6). Interessantemente, percebemos que o fenômeno do EP da caspofungina, se dá em quatro fases distintas: na primeira fase há crescimento celular em concentrações abaixo da CIM; na segunda fase percebe-se um intervalo de concentrações (no mínimo duas) onde há diminuição da atividade metabólica; na terceira fase há o retorno do crescimento celular, caracterizando o EP; e por fim, na quarta fase há diminuição da atividade metabólica em concentrações muito elevadas de CAS, geralmente 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.3.2. Microscopia de fluorescência utilizando o fluoróforo FUN1

Através da microscopia de fluorescência, utilizando os fluoróforos FUN1 e CFW, observamos a viabilidade celular de células controle e células do EP (cultivados em 16 $\mu\text{g/mL}$ de CAS). A confirmação da viabilidade celular é realizada pela visualização de grânulos vermelhos no citoplasma, oriundos da metabolização do fluoróforo FUN1 (Figura 7). Como esperado, as células controle apresentaram filamentos e leveduras em forma elíptica, todas metabolicamente ativas, uma vez que não estão sob ação da CAS. Por outro lado, observamos que as células do EP apresentam forma esférica, tamanho aumentado, geralmente em aglomerados celulares, além de não apresentarem filamentos (Figura 7). No entanto, apesar das alterações morfológicas apresentadas pelas células do EP, a reação com o fluoróforo FUN1 mostrou que as células mostraram-se viáveis, apresentando grânulos vermelhos bastante característicos em seu citoplasma. Foi possível mostrar, por exemplo, que os aglomerados celulares e aquelas células de tamanho bastante

aumentado estão, em sua maioria, metabolicamente ativas durante o EP. Nas mesmas imagens podemos verificar ainda que poucas células do EP estão mortas (coloração verde ou laranja difuso), indicando a alta capacidade destas em sobreviverem a altas concentrações de CAS.

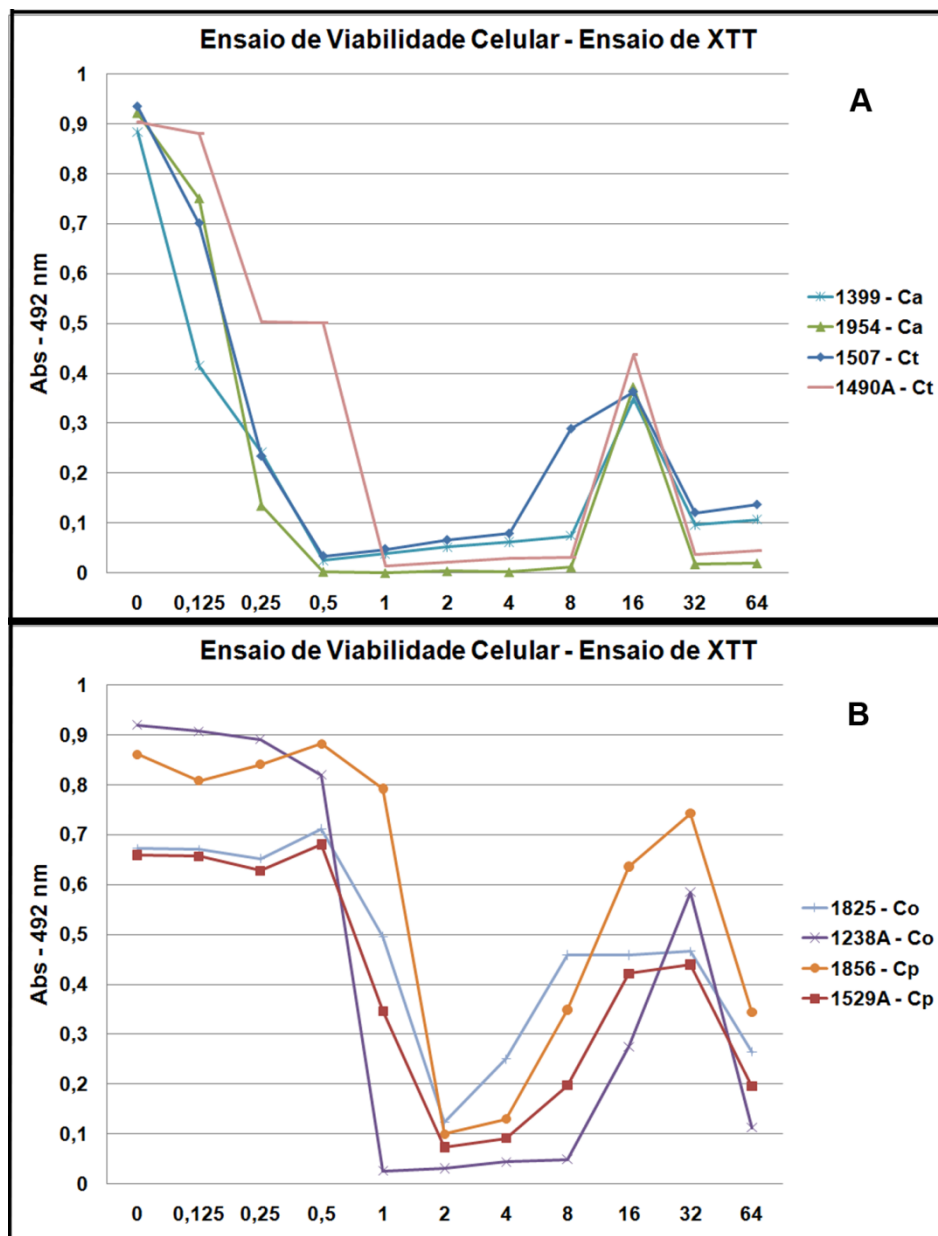


Figura 6: Ensaio de redução do XTT para análise de viabilidade de células do efeito paradoxal da caspofungina durante os testes de microdiluição em caldo. Verifica-se que há um intervalo de concentrações onde há diminuição da atividade metabólica, geralmente entre 0,25 e 1,0 µg/mL de CAS. Por outro lado, podemos perceber um aumento da atividade metabólica nas concentrações referentes ao EP (entre 8,0 e 32 µg/mL de CAS), indicando que as células do EP permanecem viáveis, mesmo em altas concentrações de CAS. A, isolados de *C. albicans* (Ca) e *C. tropicalis* (Ct). B, isolados de *C. orthopsilosis* (Co) e *C. parapsilosis* (Cp).

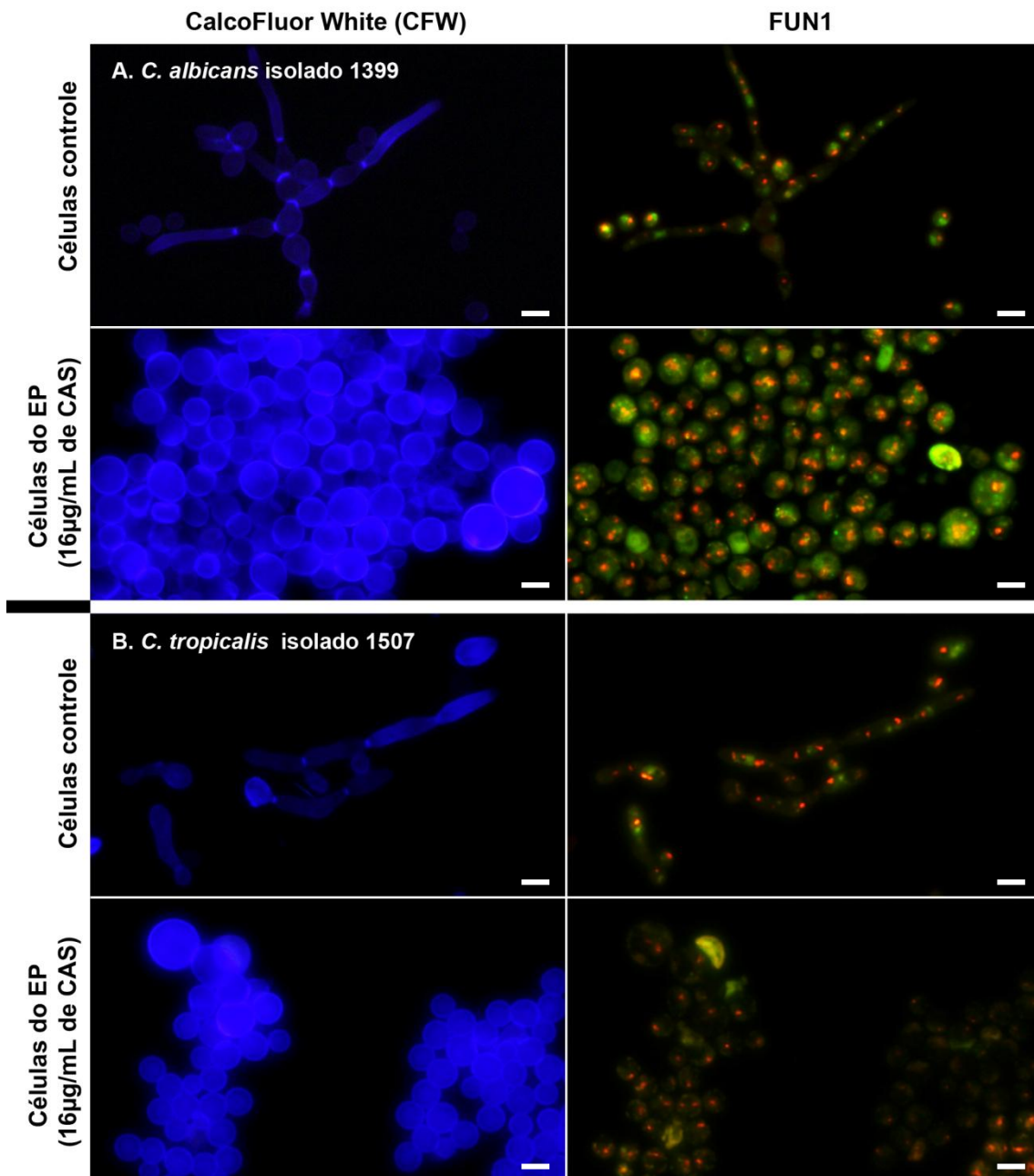
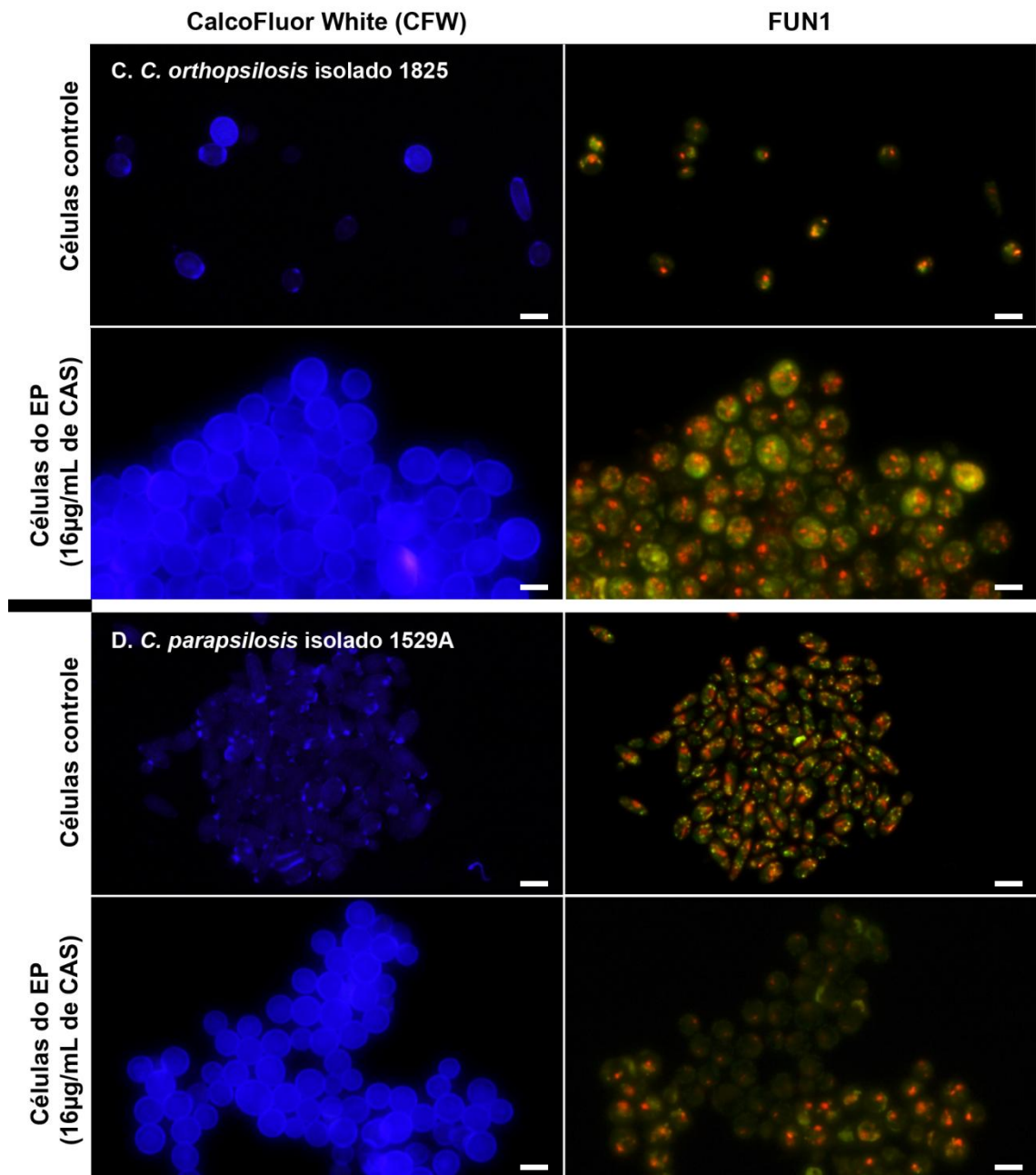


Figura 7. Microscopia de fluorescência utilizando os fluoróforos FUN1 e CalcoFluor White (CFW). O CFW liga-se especificamente à quitina presente na parede celular, permitindo visualizar o contorno da célula fúngica (coluna à esquerda). As células viáveis possuem a capacidade de metabolizar o FUN1, originando grânulos citoplasmáticos de coloração vermelha (coluna à direita). *C. albicans* isolado 1399 (A). *C. tropicalis* isolado 1507 (B). *C. orthopsilosis* isolado 1825 (C). *C. parapsilosis* isolado 1529 A (D). Podemos perceber que as células do EP estão metabolicamente ativas, apresentando formato esférico, com tamanho aumentado e em aglomerados celulares. Barras: 5 µm.

Cont. Figura 7.



4.3. Análise dos componentes da parede celular

4.3.1. Análise bioquímica dos componentes da parede celular fúngica

Utilizando métodos bioquímicos foram quantificados os seguintes componentes da parede celular fúngica: glucana total (β -1,3 + β -1,6-glucanas), β -1,3-glucana e quitina. Nossos dados mostram que os isolados das diferentes espécies de *Candida* analisadas apresentaram resultados semelhantes em relação às modificações da composição da parede celular durante o EP da CAS (Figura 8), principalmente no que se refere à quantidade de glucana e quitina presentes na parede celular. Quando cultivados na presença de 16 μ g/mL de CAS, todos os isolados testados mostraram uma diminuição significativa na quantidade de glucana total da parede celular (Figura 8A) e pela diminuição acentuada no conteúdo de β -1,3-glucanas (Figura 8B). Por outro lado, as células do EP apresentaram um aumento significativo no conteúdo de quitina da parede celular fúngica (Figura 8C).

Para melhor visualizar as alterações dos componentes da parede celular, fizemos uma análise comparativa entre o conteúdo destes componentes em células do EP (16 μ g/mL de CAS) e células controle (Figura 8D). Percebe-se que houve uma diminuição de 2,9 a 5,0 vezes no conteúdo de glucana total (β -1,3 + β -1,6-glucana), enquanto o conteúdo de β -1,3-glucana apresentou diminuição de 2,7 a 7,8 vezes. Por outro lado, constatamos um aumento de 4,0 a 6,6 vezes no conteúdo de quitina na parede celular de células do EP.

Uma vez que a atividade da CAS se dá pela inibição da síntese de β -1,3-glucana e que o EP é fenômeno diferente da resistência, a diminuição de β -1,3-glucana em células do EP já era esperada. Por outro lado, as células do EP parecem utilizar mecanismos compensatórios para suprir a carência de β -1,3-glucana, principalmente através do aumento da síntese de quitina.

Nossos achados foram bastante semelhantes aos observados por Stevens *et al.* (200) utilizando um único isolado de *C. albicans*. Contudo, em nosso estudo, nós mostramos que essas alterações podem ocorrer em outras espécies de *Candida*, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*, indicando que as diferentes espécies de *Candida* respondem de forma

bastante semelhante durante o EP, basicamente aumentando o conteúdo de quitina para compensar a carência de β -1,3-glucana.

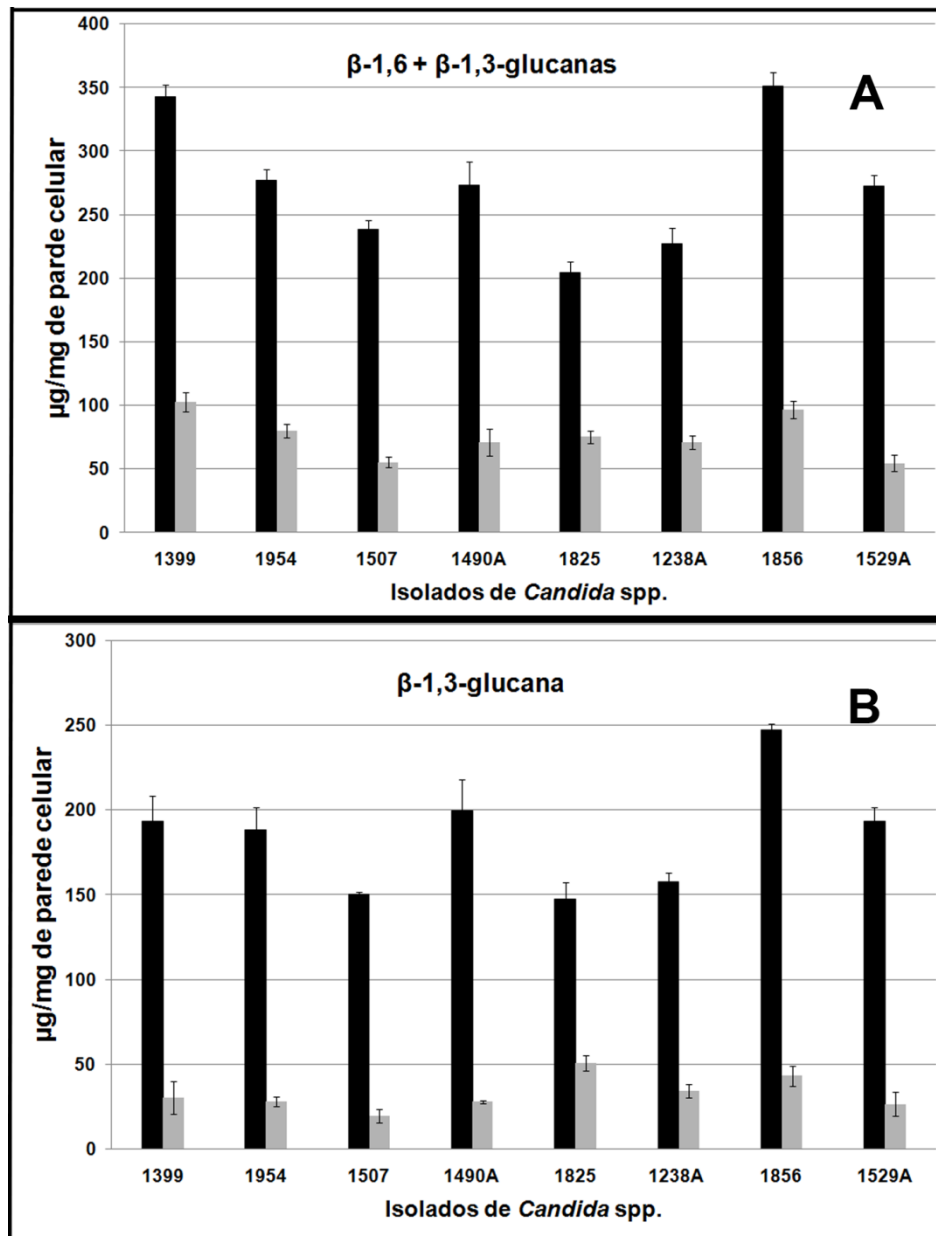
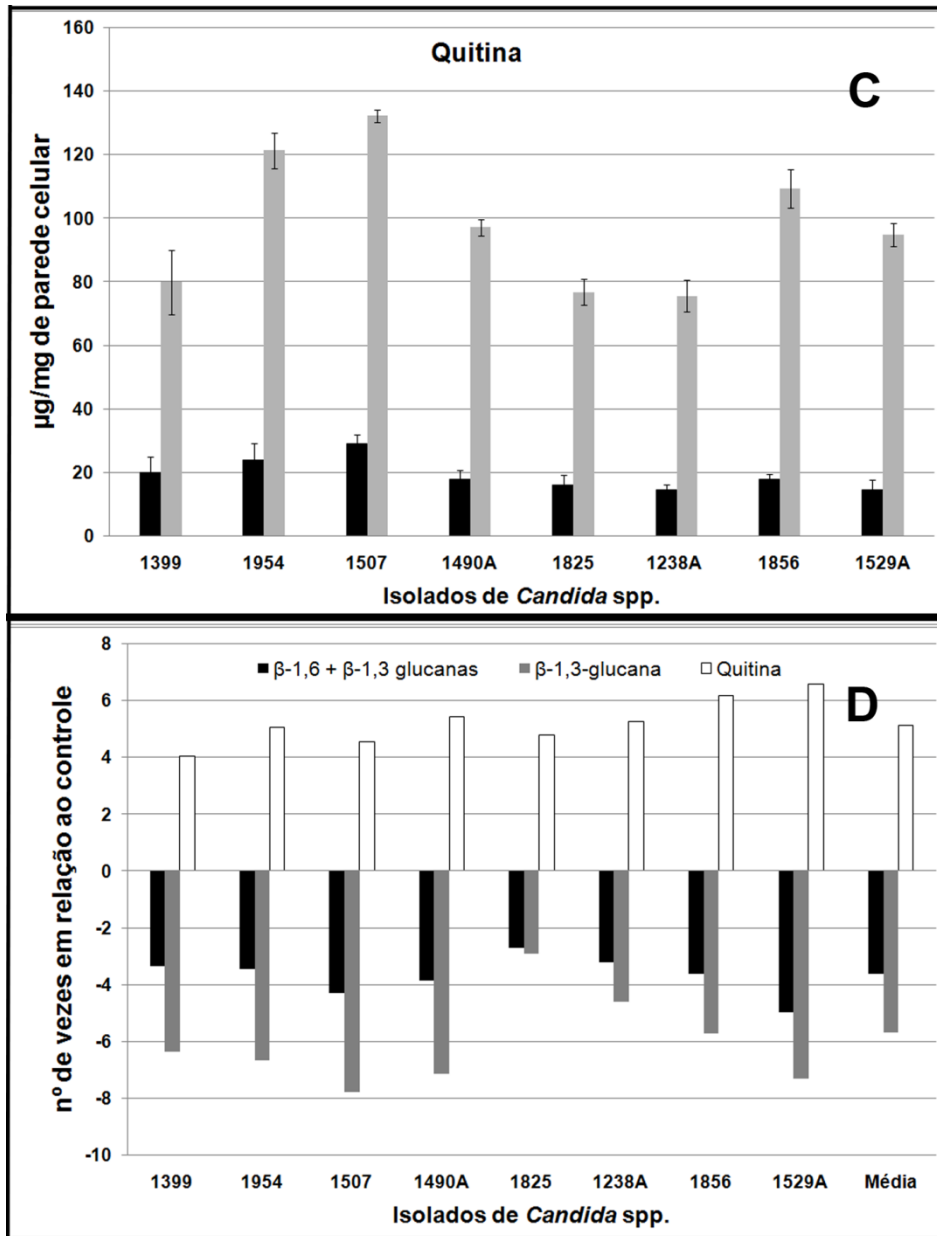


Figura 8. Análise bioquímica dos componentes da parede celular de células controle e células do efeito paradoxal da caspofungina. Os valores absolutos de β -1,6 + β -1,3-glucanas (A), β -1,3-glucana (B) e quitina (C) das células controle e células do EP (barras pretas e cinzas, respectivamente) estão expressos em μg de carboidrato por mg de parede celular. O gráfico D representa o conteúdo de β -1,6 + β -1,3-glucanas (barras pretas), β -1,3-glucana (barras cinza) e quitina (barras brancas) das células do EP em relação às células controle.

Cont. Figura 8.



4.3.2. Análise do conteúdo de quitina da parede celular por microscopia de fluorescência utilizando o fluoróforo CalcoFluor White (CFW)

A Figura 9 mostra imagens de microscopia de fluorescência de células controle e células do EP, após o tratamento com CFW. Desde que CFW liga-se especificamente à quitina da parede celular de fungos, a intensidade da fluorescência das células é proporcional ao conteúdo de quitina da parede celular, sendo possível uma análise comparativa entre células controle e células do EP. Em nossos ensaios, verificamos que as células controle exibiram baixa intensidade de fluorescência em torno de sua superfície celular, porém mostraram fluorescência particularmente intensa entre as células mãe e as células em brotamento, região onde se localiza o septo de brotamento, rico em quitina.

Em contraste com as células não tratadas, as células do EP mostraram maior intensidade de fluorescência quando comparado às células controle. Pode-se observar que as células do EP apresentaram alta intensidade de fluorescência em torno de toda a superfície celular, com algumas regiões apresentando um espessamento de parede com forte intensidade de fluorescência, indicando um possível acúmulo de quitina (Figura 9). Em todos os isolados analisados a diferença da intensidade de fluorescência entre as células do EP e as células controle foi estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

Esses resultados indicam que as células do EP apresentam maior quantidade de quitina em sua parede celular quando comparado às células controle, resultados que corroboram os dados obtidos pela análise dos componentes da parede celular.

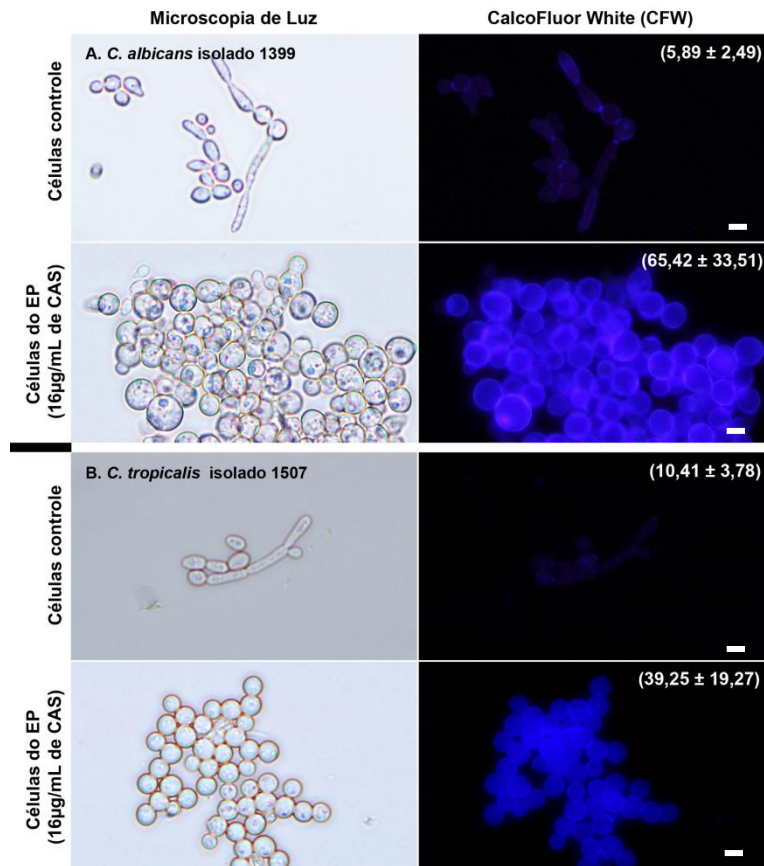
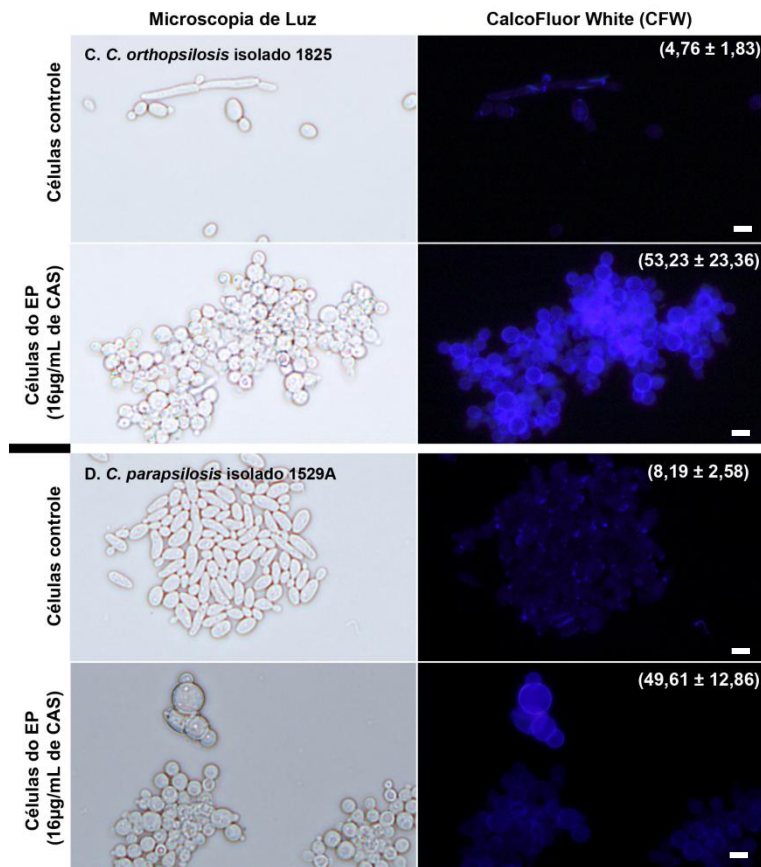


Figure 9. Análise do conteúdo de quitina da parede celular através de microscopia de fluorescência utilizando o fluoróforo CalcoFluor White (CFW). A coluna da esquerda mostra as imagens da microscopia de luz, enquanto a coluna da direita mostra as imagens da microscopia de fluorescência com CFW. Os valores (média \pm desvio padrão) da intensidade de fluorescência estão relacionados ao conteúdo de quitina da parede celular. As células do EP da CAS apresentaram maior intensidade de fluorescência quando comparado às células controle. Para todos os isolados analisados a diferença entre a intensidade de fluorescência das células do EP e das células controle foi estatisticamente significativa ($P < 0.05$). Em algumas células do EP pode-se notar ainda um forte sinal de fluorescência, indicando que há acúmulo de quitina. *C. albicans* isolado 1399 (A). *C. tropicalis* isolado 1507 (B). *C. orthopsilosis* isolado 1825 (C). *C. parapsilosis* isolado 1529 A (D). Barras: 5 μ m.

Cont. Figura 9.



4.4. Análise das alterações ultraestruturais em células do EP da CAS

Ao observarmos as células do EP através da microscopia de fluorescência, durante os testes de viabilidade celular, notamos que as células do EP apresentavam-se em aglomerados celulares, com formato esférico, tamanho aumentado e ausência de filamentos (Figura 9). Além disso, observamos a presença de brotamentos, indicando atividade de multiplicação celular. Para análise das alterações ultraestruturais, principalmente em relação às alterações da superfície da célula e da parede celular, utilizamos as técnicas de microscopia eletrônica de varredura e transmissão, respectivamente.

4.4.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Conforme mostrado na Figura 10, as células do EP apresentaram anormalidades morfológicas representadas por: i) células em brotamento sem o anel de quitina que circunda a região de constricção entre as células mãe e filha; ii) as leveduras apresentaram tamanho aumentado; iii) havia grande quantidade de aglomerados celulares, e, iv) ausência de filamentação. Essas mudanças foram igualmente encontradas nas quatro espécies de *Candida* estudadas neste trabalho. Por outro lado, as células controle apresentaram uma forma elíptica normal, brotamento com um anel de constricção entre a célula mãe e filha e presença de filamentação.

Para analisarmos de forma quantitativa a diferença no tamanho celular, realizamos a medição do perímetro celular (μm), onde foram confirmadas as diferenças entre as células controle e células do EP de *C. albicans* ($10,86 \pm 1,41$ e $21,21 \pm 3,57$ μm , respectivamente), *C. tropicalis* ($10,76 \pm 1,34$ e $15,92 \pm 2,28$ μm , respectivamente), *C. orthopsilosis* ($8,32 \pm 1,32$ e $13,21 \pm 1,66$ μm , respectivamente) e *C. parapsilosis* ($8,59 \pm 1,39$ e $10,54 \pm 1,22$ μm , respectivamente). Em todos os casos, a diferença foi estatisticamente significativa ($P < 0,001$). O perímetro médio de células controle de todas as espécies de *Candida* foi de $9,56 \pm 1,83$ μm , enquanto que as células do EP mostraram perímetro médio de $15,22 \pm 4,56$ μm ($P < 0,001$).

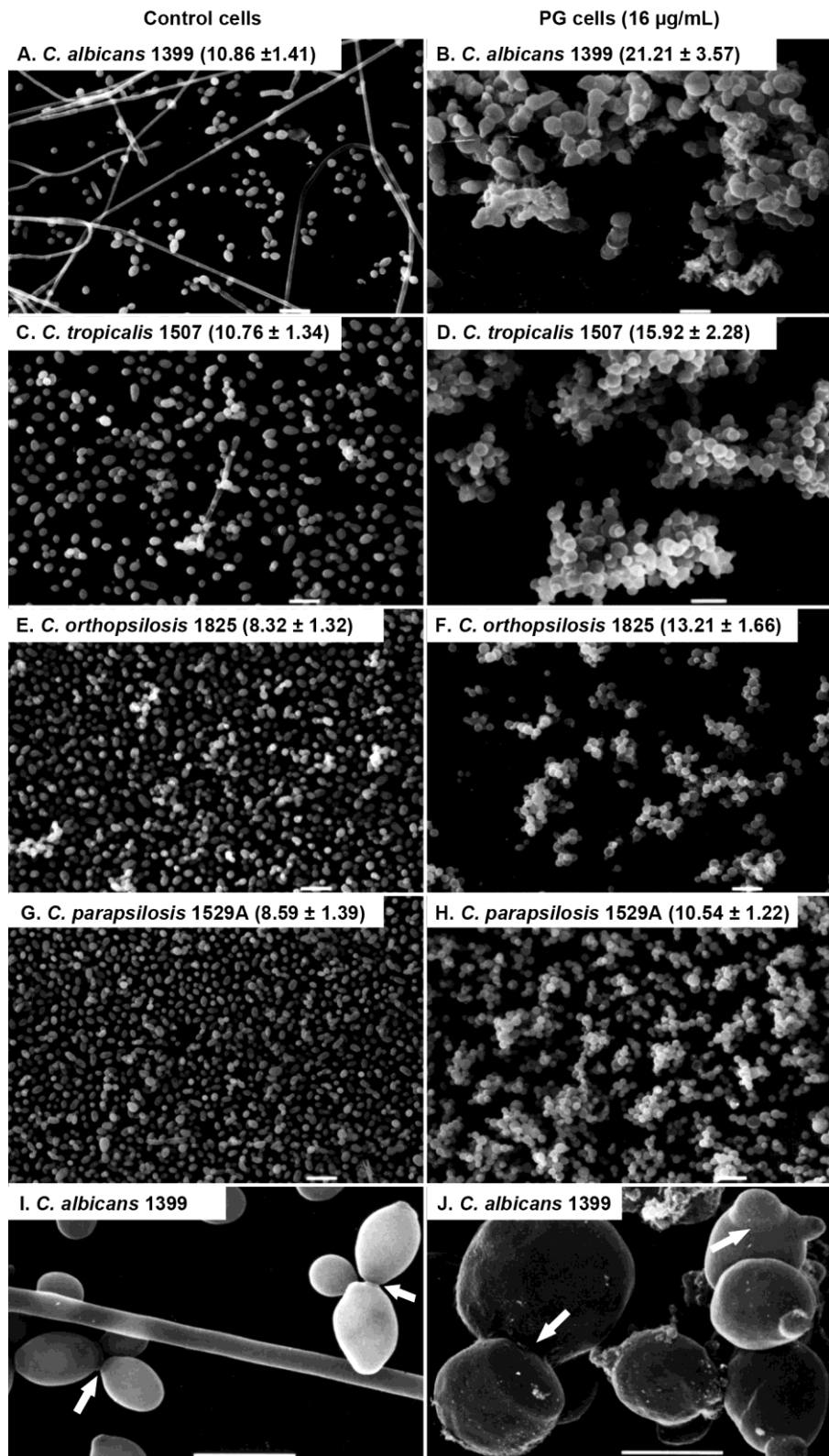


Figure 10. Microscopia eletrônica de varredura de isolados de *Candida* spp., comparando a morfologia de células controle (esquerda) e células do EP (direita) com crescimento em 16 µg/mL de CAS. Os valores representam o perímetro celular (µm) (média ± desvio padrão). As células do EP apresentaram aumento no tamanho celular quando comparado às células controle ($P < 0.01$). As imagens I e J são ampliações das imagens A e B, respectivamente: o anel de quitina que circunda a região entre as células mãe e filha estão presentes apenas nas células controle (setas). Barras: 10µm para imagens de A-H e 5µm para imagens I-J.

4.4.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As alterações morfológicas observadas nas células do EP através da MET estão relacionadas principalmente à estrutura da parede celular e formação do septo de brotamento (Figura 11). Observou-se uma espessura anormal dos septos entre as células mãe e filha, sem uma separação clara entre as células (Figura 11B e 11F - setas pretas). Quando comparado às células controle, percebemos que algumas células do EP apresentaram septos mais delgados, enquanto outras apresentaram septos mais espessos, indicando um distúrbio na formação do septo de brotamento.

Em relação à parede celular lateral das células controle e células do EP, notamos diferenças marcantes em sua morfologia (Figura 11). Através da MET convencional, observou-se que as células controle apresentaram parede celular com duas camadas: i) uma camada externa mais eletrodensa; e ii) uma camada interna menos eletrodensa, contínua com a membrana plasmática (Figura 11I). Em contraste, em células do EP foi observada uma diminuição da camada interna da parede celular, com predomínio da camada mais eletrodensa (Figura 11B, D, F, H e J - setas brancas). Além disso, é importante mencionar que algumas células do EP mostraram múltiplas camadas em sua parede celular e, em alguns casos, uma região de acúmulo de componentes da parede celular (11D e H, respectivamente - cabeça setas pretas).

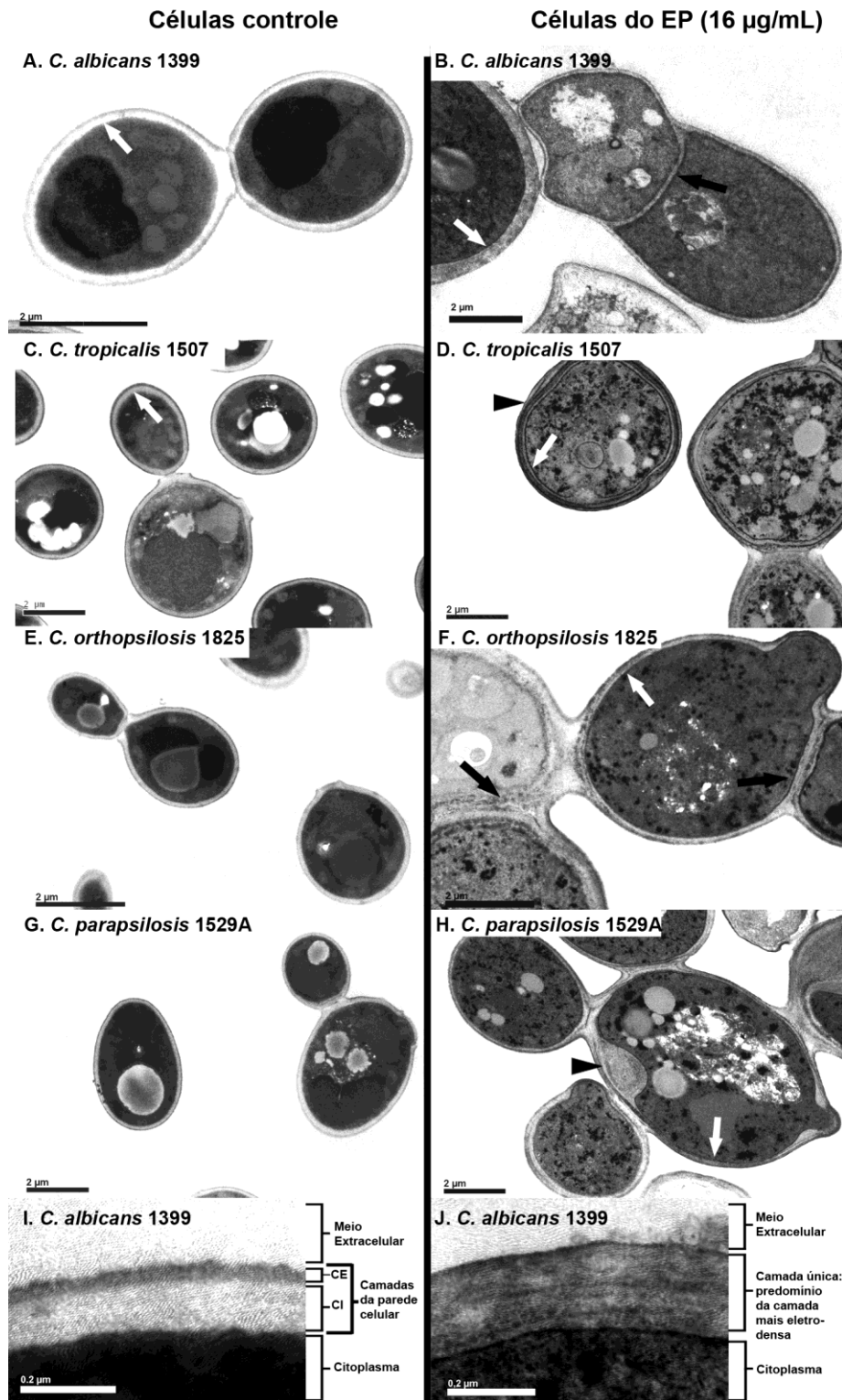


Figure 11. Microscopia eletrônica de transmissão de isolados de *Candida* spp., comparando a ultraestrutura da parede celular de células controle e células do EP da CAS, com crescimento em 16 µg/mL de CAS. As setas pretas indicam alterações no septo de brotamento nas células do EP. As setas brancas mostram que a parede celular das células controle exibe basicamente duas camadas, enquanto nas células do EP há um predomínio da camada mais eletrodensa. A ponta de seta preta mostra diversas camadas na parede celular de células do EP (D) e um acúmulo de componentes da parede celular (H). As imagens I e J são ampliações de imagens da parede celular de células controle e células do EP, respectivamente. A parede celular das células controle (I) exibiu basicamente duas camadas: uma camada externa (CE), mais eletrodensa, e uma camada interna (CI), menos eletrodensa. Nas células do EP (J) nós observamos uma diminuição da camada interna da parede celular, com um predomínio da camada mais eletrodensa. Barras: 2 µm para imagens de A-H e 0,2 µm para I-J.

4.5. Análise da expressão de genes relacionados à síntese da parede celular em *C. albicans* durante o EP da CAS

O perfil da expressão gênica em células do EP em relação às células controle, utilizando a metodologia de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, está representado na Figura 12. Interessante observar que não houve mudança significativa na expressão do gene *FKS1*, codificador da enzima glucana sintase, sítio alvo da CAS. Por outro lado, percebemos um aumento da expressão dos genes reguladores da síntese de quitina (*CNA1*, *HOG1* e *MKC1*), principalmente os genes *HOG1* e *MKC1* (3,7 e 2,6 vezes, respectivamente). Em relação aos genes *CHS*, foi detectado um aumento de 4,2 vezes na expressão do gene *CHS2* e de 1,8 vezes na expressão de *CHS3*. Por fim, foi possível constatar uma leve diminuição da expressão do gene *CHS1*, responsável pela produção de quitina do septo primário.

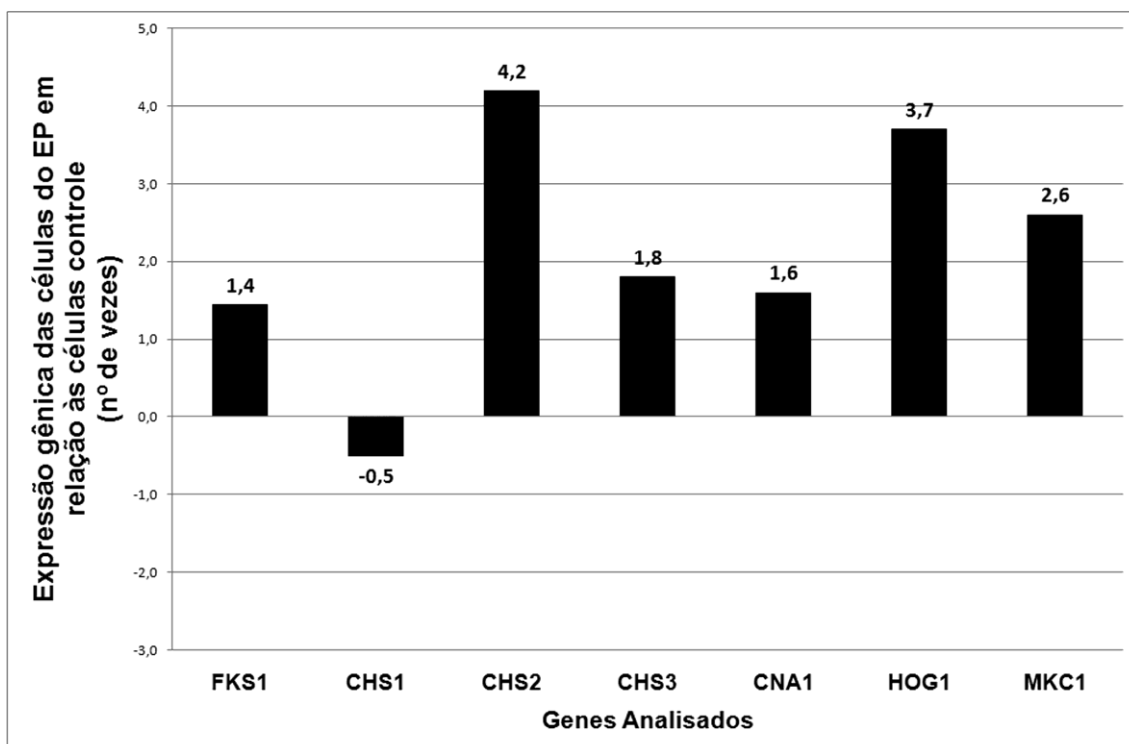


Figura 12: Análise da expressão gênica em células do EP da Caspofungina em relação às células controle. O número de vezes em que a expressão de cada gene estava aumentado ou diminuído nas células do EP em relação às células controle são mostrados sobre a barra de cada gene.

5.0 DISCUSSÃO

O gênero *Candida* responde pela maior parte das infecções fúngicas no ambiente hospitalar e é a quarta causa de infecções de corrente sanguínea (ICS) adquiridas em hospitais americanos, respondendo por cerca de 10% de todas as infecções deste sítio(163, 227).

No Brasil, candidemia ocorre em taxas 2 a 10 vezes superior às taxas observadas em países do hemisfério norte, apresentando mortalidade geral entre 50 a 60% (45, 47, 66, 83).

Embora *C. albicans* continue a ser a espécie mais frequentemente isolada de ICS por *Candida*, em diversas partes do mundo têm sido documentado um aumento da ICS causadas por espécies de *Candida* não-*C. albicans*, como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, as quais atualmente representam cerca de metade dos casos de candidemia (1, 3, 19, 39, 47, 80, 136, 151). No Brasil, há um predomínio de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* entre as espécies de *Candida* não-*C. albicans* isoladas de ICS (5, 47, 66, 83). Vale ainda mencionar que, recentemente, *C. parapsilosis* foi reclassificada de acordo com a diversidade genotípica em três diferentes táxons: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (74, 205). Aparentemente, *C. orthopsilosis* apresenta maior prevalência dentro do complexo *C. parapsilosis* no Brasil e demais países da América Latina (74, 109).

Apesar de todo conhecimento sobre a epidemiologia das ICS por *Candida* spp. e dos avanços dos métodos diagnósticos, a mortalidade associada a esta condição permanece inaceitável, da ordem de 50% (6, 39, 77, 80, 84, 178, 182).

Já está bem estabelecido que o sucesso da terapia antifúngica é um fator primordial à diminuição das taxas de mortalidade, sendo importante tanto a escolha correta do antifúngico quanto o início precoce da terapia (72, 85, 127, 204, 231). Infelizmente, as opções os antifúngicos para tratamento de candidemia ainda são limitadas, principalmente quando comparamos ao número de antibacterianos. Apesar disso, nos últimos anos avanços importantes foram obtidos na terapia antifúngica, principalmente pela

disponibilidade de uma nova classe de antifúngicos para tratamento de candidemia, as equinocandinas (150, 159).

As equinocandinas possuem uma notável atividade antifúngica *in vitro* contra *Candida* spp., incluindo isolados resistentes aos azólicos. Destacam-se ainda por apresentar baixa toxicidade ao hospedeiro e número reduzido de interações medicamentosas (34, 54, 117, 213). Sobre sua atividade antifúngica *in vitro*, estudos com grande número de isolados e diferentes espécies de *Candida* têm confirmado a excelente atividade das equinocandinas, com raros casos de resistência (162, 167).

Corroborando esses dados, nosso estudo mostrou que entre os 77 isolados de *Candida* spp. analisados todos foram classificados como sensíveis à caspofungina, apresentando valores de CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$. Baseados nos valores de CIM, as espécies mais sensíveis foram *C. albicans* e *C. tropicalis*, enquanto os isolados de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* apresentaram valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ superior às demais espécies. Outros estudos já haviam mostrado que as equinocandinas apresentam atividade reduzida contra isolados de *C. parapsilosis*, tanto em ensaios *in vitro* (167), como em ensaios *in vivo* (15)

Ainda sobre a atividade da CAS, Barchiesi *et al.* (15) mostrou que esse antifúngico apresenta apenas atividade fungistática contra *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*. Em nosso estudo, os ensaios de CFM e curva de morte mostraram que a CAS exerceu atividade fungicida contra isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* nas concentrações entre 0,5 a 2,0 $\mu\text{g/mL}$. Contra os isolados de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*, CAS apresentou atividade fungistática, com exceção do isolado 1238A de *C. orthopsilosis*. Apesar dessas variações no perfil de susceptibilidade, estudos clínicos têm mostrado que candidemia por diferentes espécies de *Candida*, incluindo *C. parapsilosis*, respondem de forma muito semelhante ao tratamento com CAS quando comparado às infecções por *C. albicans* (46).

Apesar de alguns relatos de falha terapêutica durante o tratamento de infecções por *Candida* spp. com equinocandinas (11, 69, 100, 129, 206), a detecção de resistência durante os testes convencionais *in vitro* ainda é um

fenômeno raro, sendo a grande maioria dos casos associados a mutações do gene *FKS1* (67, 154, 158, 218).

Embora a resistência de *Candida* spp. às equinocandinas seja pouco comum, tanto *in vitro* como *in vivo*, a ocorrência do Efeito Paradoxal (EP) das equinocandinas tem sido observado com maior frequência que resistência durante os testes de susceptibilidade (18, 33, 119). Os isolados que apresentam o fenômeno do EP tem seu crescimento inibido a baixas concentrações de CAS (geralmente $< 1 \mu\text{g/mL}$), no entanto, em concentrações superiores a CIM (geralmente $\geq 8 \mu\text{g/mL}$), retomam a capacidade de crescimento (199-201). Diferente da resistência às equinocandinas, o fenômeno do EP não está associado à presença de mutações no gene *FKS1*. De qualquer forma, há uma crescente preocupação em relação à possibilidade de falha terapêutica em esquemas utilizando doses elevadas de equinocandinas.

A literatura disponível sobre EP em equinocandinas reúne, em sua maioria, ensaios realizados com isolados de *C. albicans*. Neste contexto, é válido indagar se tal fenômeno ocorre na mesma proporção e com mesmo significado biológico em espécies de *Candida* não-*C. albicans*. O objetivo deste estudo foi analisar a presença do EP e seu significado biológico entre as principais espécies de *Candida* spp. isoladas de infecção de corrente sanguínea em hospitais brasileiros, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*.

Entre os 77 isolados analisados neste estudo, 42 (54%) apresentaram EP durante os testes de susceptibilidade com CAS. A espécie com maior frequência de EP foi *C. parapsilosis* (65%), seguida por *C. albicans* (62%), *C. tropicalis* (54%) e *C. orthopsilosis* (18%). Interessantemente, outros estudos têm mostrado que a frequência do EP da CAS é alta entre os isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (33, 119, 181).

Vale mencionar que, entre os vários estudos que analisaram a atividade antifúngica da caspofungina através do microdiluição em caldo, poucos têm relatado a presença do EP. Contudo, é importante ressaltar que, nesses estudos, o teste de susceptibilidade a CAS foi, via de regra, realizado em

concentrações $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ de caspofungina, não sendo possível a detecção precisa do EP nessas condições, visto que sua presença pode ocorrer em concentrações $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ (181).

Além da utilização dos testes de microdiluição em caldo, que é o método corriqueiramente utilizado para análise do perfil de susceptibilidade de isolados de *Candida* spp., alguns autores têm utilizado ensaios de concentração fungicida mínima (CFM) e curva de morte para analisar a presença do EP (196, 212). Soczó *et al.* (196) relatou que o EP da CAS em isolados de *C. tropicalis* foi mais freqüente durante os ensaios de CFM (93%) quando comparado aos testes de CIM (13%), indicando que CFM é o método mais adequado para observação do EP.

Em nosso estudo, nos ensaios de CFM foi possível observar o EP da CAS apenas em *C. albicans* e *C. tropicalis*. Os isolados destas espécies apresentaram um perfil de crescimento que permitiu identificar claramente o EP, uma vez que: i) houve inibição do crescimento nas concentrações de 0,5 a 2,0 $\mu\text{g/mL}$ de CAS; ii) ao longo do intervalo de no mínimo 2 concentrações acima da CFM não foi observado crescimento celular; iii) por fim, em concentrações mais elevadas, entre 8,0 e 32 $\mu\text{g/mL}$, houve crescimento celular, perfil característico de EP. Uma vez que CAS é apenas fungistática contra a grande maioria dos isolados do complexo *C. parapsilosis*, conforme esperado houve crescimento de colônias em todas as concentrações de CAS testadas nos experimentos de CFM quando testamos cepas deste complexo. Dessa forma, o ensaio de CFM parece não ser o mais adequado para detecção do EP da caspofungina, pelo menos em isolados de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*, e, possivelmente, *C. metapsilosis*.

Em contrapartida, nos ensaios de curva de morte onde realizamos quantificação absoluta do número de colônias que crescem mediante exposição a diferentes concentrações de CAS, aplicando-se definição operacional para caracterização de efeito fungicida (inibição $> 99\%$ das UFC quando comparado ao inóculo inicial), há possibilidade de caracterizarmos de forma acurada a ocorrência de EP em todas as espécies analisadas, incluindo cepas do complexo *C. parapsilosis*.

No presente estudo, pudemos observar que nas concentrações de 16 e 32 µg/mL de CAS houve maior crescimento celular dos isolados testados quando comparado à exposição a concentrações entre 0,5 e 4 µg/mL do mesmo antifúngico, permitindo ao investigador caracterizar a ocorrência do fenômeno do EP. Vale mencionar ainda que nas concentrações onde foi observado o EP houve uma redução do número de UFC nas primeiras horas de exposição ao fármaco (3 e 6 horas) e retorno do crescimento nas horas seguintes, entre 9 e 48 horas. Estes dados indicam que as células do EP apresentam uma fase de adaptação nos períodos iniciais, onde parte das células não resistem à atividade da CAS. Posteriormente, há a ativação dos mecanismos moleculares responsáveis pelo EP e as células restantes iniciam a fase de crescimento celular que caracteriza este fenômeno.

Para complementar as observações feitas durante os testes de CIM e CFM, realizamos os ensaios de viabilidade celular para analisar a atividade da CAS contra isolados de *Candida* spp.. O ensaio de redução do XTT confirmou os achados observados durante os testes de microdiluição em caldo. Esse método encontra-se padronizado em nosso laboratório (118, 119), não apresenta grandes dificuldades técnicas e o tempo de realização é bem menor quando comparado ao método de CFM. Basicamente, o ensaio de XTT mostrou que houve uma diminuição da atividade metabólica dos cultivos expostos a baixas concentrações de CAS e ressurgimento da atividade metabólica (sugerindo crescimento celular) em concentrações referente ao EP, entre 4 e 32 µg/mL do mesmo antifúngico.

A microscopia de fluorescência permitiu não apenas analisar a viabilidade celular, mas também apontar quais células apresentavam-se metabolicamente ativas. Utilizando o fluoróforo FUN1, observamos que, apesar das alterações celulares durante o EP, estas células mostraram-se viáveis, visto que mantiveram sua capacidade metabólica ilustrada pela presença de grânulos vermelhos em seu citoplasma (Figura 7). Interessante observar que mesmo em células que apresentaram alterações morfológicas exuberantes ao longo do EP houve documentação de atividade metabólica, ilustrando sua capacidade de sobreviver a altas concentrações de CAS.

Os estudos anteriores sobre o EP das equinocandinas focaram suas análises nas alterações observadas em isolados de *C. albicans*. Neste estudo, nós descrevemos as alterações ultraestruturais e bioquímicas observadas na parede celular durante o EP da CAS contra isolados representativos de quatro principais espécies de *Candida* clinicamente relevantes: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis*. Em realidade observamos que cepas de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* apresentaram frequência de EP da CAS em proporção semelhante à observada em isolados de *C. albicans* (Tabela 2).

As alterações morfológicas encontradas ao longo do EP da CAS guardam estreita relação com mecanismos adaptativos e de escape à exposição das células fúngicas às equinocandinas. Em relação à composição da parede celular, estudo de Stevens *et al.* (200) mostrou que durante o EP da CAS em células de *C. albicans* houve uma diminuição de 81% no conteúdo de β -1,3-glucana e aumento de 898% no conteúdo de quitina na parede celular. Nossos resultados mostraram que as diferentes espécies de *Candida* analisadas no presente estudo apresentaram o mesmo padrão de alterações na composição da parede celular durante o EP da CAS. Basicamente, as células do EP exibiram uma diminuição significativa no conteúdo de β -1,3-glucana (2,7 a 7,8 vezes) e um aumento substancial no conteúdo de quitina (4,0 a 6,6 vezes) da parede celular, independentemente da espécie de *Candida* considerada. Esses dados são suportados ainda pela análise de microscopia de fluorescência com CFW, onde as células EP mostraram uma maior intensidade de fluorescência quando comparado às células controle (Figura 9), indicando que em células do EP há um aumento significativo no conteúdo de quitina na parede celular. Nossos resultados sugerem que as diferentes espécies de *Candida* selecionadas para este estudo compartilham os mecanismos moleculares responsáveis pelo aumento do conteúdo de quitina em substituição à inibição de β -1,3-glucana durante o EP.

A aplicação de técnicas de microscopia eletrônica de varredura e transmissão (MEV e MET, respectivamente) tem permitido analisar, de forma mais detalhada, as alterações morfológicas apresentadas pelas células fúngicas durante a exposição aos antifúngicos. Através da utilização da MEV, diversos estudos mostraram que a exposição de células de *C. albicans* às

equinocandinas resulta em lise celular e diversas alterações morfológicas, incluindo aumento do tamanho celular, células com formato esférico, presença de aglomerados celulares e ausência de filamentação (29, 57, 95, 135, 138). Segundo os autores essas alterações estão relacionadas à inibição da síntese de β -1,3-glucana.

Apesar desses estudos não analisarem o fenômeno do EP das equinocandinas, podemos perceber que as alterações morfológicas descritas por esses autores, com exceção da lise celular, também foram observadas em nosso estudo durante o EP da CAS. Nossa hipótese para esse explicar esse fenômeno é de que células do EP consigam ativar mecanismos adaptativos para compensar a diminuição de β -1,3-glucana induzido pela exposição à CAS. Neste contexto, observa-se que além das alterações sugestivas de inibição eficaz da β -1,3-glucana (aumento do tamanho celular, ausência de filamentação e presença de aglomerados), nota-se que as células do EP não apresentaram o anel de quitina que circunda a região entre as células mãe e filha, uma estrutura importante tanto para o processo de brotamento como para posterior liberação da célula filha. Uma interpretação para este achado é de que, ao longo do EP, a síntese de quitina esteja sendo direcionada à manutenção da integridade da parede celular da célula fúngica, havendo redução da síntese de quitina necessária para a formação adequada do anel de quitina durante a replicação celular. Da mesma forma, a redução da síntese de β -1,3-glucana e o redirecionamento da síntese de quitina resultam na incapacidade da célula fúngica dar origem à forma filamentosa ou mesmo permitir a liberação das células filhas formadas por brotamento, o que leva a formação de grandes aglomerados celulares característicos da exposição de células de *C. albicans* a agentes inibidores da síntese de parede celular. Vale mencionar que todas essas alterações estiveram presentes de forma indistintas em todas as espécies testadas no presente estudo.

Alguns autores têm mostrado que a ultraestrutura da parede celular de células de *C. albicans* expostas às equinocandinas apresenta modificações importantes, sendo a principal delas a diminuição da camada interna da parede celular (camada menos eletrodensa), que, de acordo com Chaffin (32), é constituída em grande parte por β -1,3-glucana. Em nosso estudo, através da

MET, foi possível mostrar que as células do EP apresentam uma diminuição da camada interna da parede celular e um predomínio de uma camada mais eletrodensa. Além disso, mostramos que as células do EP apresentam alterações importantes na espessura do septo de brotamento, sem sinais de descolamento da célula filha.

Os resultados da microscopia eletrônica, quando analisados em conjunto com os resultados da análise dos componentes da parede, nos permite concluir que a diminuição da camada interna da parede celular em células do EP está relacionada com a inibição da síntese de β -1,3-glucana causada pela exposição à CAS. A inibição da síntese de β -1,3-glucana parece acarretar a perda do controle osmótico, o que justifica o aumento do tamanho celular e as formas esféricas apresentadas pelas células do EP (29, 57, 138).

Apesar de todas essas alterações morfológicas e bioquímicas, nossos resultados mostraram que as células do EP apresentam-se metabolicamente ativas, sem indícios de lise celular. A sobrevivência das células de *Candida* spp. ao longo do EP, sugerem que a inibição da síntese de β -1,3-glucana esteja sendo compensada pelo aumento do conteúdo de quitina na parede celular dessas células.

Diversos estudos têm mostrado que a exposição de *C. albicans* a substâncias que alteram a integridade da parede celular leva ao aumento da expressão dos genes quitina sintase (*CHS*) (131). Em relação à atividade das equinocandinas, Walker *et al.* (219) realizaram um estudo com mutantes individuais para cada gene *CHS* e também para os genes que controlam as vias PKC, HOG e calcineurina- Ca^{2+} , para analisar os mecanismos de regulação da parede celular fúngica em resposta à exposição à CAS. Basicamente, os autores mostraram que a produção de quitina em resposta à exposição à CAS dependente não somente da expressão dos genes *CHS2*, *CHS8* e *CHS3*, como também da regulação das vias PKC (via de integridade da parede celular dependente da proteína quinase C), HOG (via da resposta à alta osmolaridade do glicerol) e calcineurina- Ca^{2+} .

Corroborando a hipótese de que a síntese de quitina pode ser mecanismo de escape importante para sobrevivência de células expostas a

inibidores de β -1,3-glucana, Walker *et al.* (219) analisou a atividade antifúngica de concentrações de 16 $\mu\text{g/mL}$ de CAS em inóculo padrão de *C. albicans* pré-tratado com CaCl_2 e CalcoFluor White, substâncias que induzem a síntese de quitina. Nessas condições os autores observaram crescimento celular a despeito da exposição do inóculo de *C. albicans* a altas concentrações de CAS. Crescimento este que foi dependente da expressão dos genes *CHS3*, *CHS2* e *CHS8* e da regulação de *MKC1*, *HOG1* e *CNA1*.

Quando iniciamos nosso estudo, havia disponibilidade de seqüência de genes da via de síntese e regulação da parede celular descritas apenas para *C. albicans*. Sendo assim, em nosso trabalho analisamos a expressão dos genes *CHS1*, *CHS2* e *CHS3*, além dos genes *MKC1*, *HOG1* e *HOG* em *C. albicans*. Interessantemente, nossos resultados mostraram que as células de *C. albicans* expostas à concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$ (ou seja, as células do EP) apresentam um aumento da expressão dos genes *CHS2* (Classe I) e *CHS3* (Classe IV) e também um aumento da expressão dos genes *MKC1*, *HOG1* e *CNA1*. Esses resultados são semelhantes aos observados por Walker *et al.* (219) em células de *C. albicans* expostas a 16 $\mu\text{g/mL}$ de CAS, onde foi observado uma resposta dependente de *CHS3* e *CHS2* e da regulação de *MKC1*, *HOG1* e *CNA1*.

A participação das vias PKC e Calcineurina- Ca^{2+} no fenômeno do EP da CAS já havia sido mostrada em um estudo do grupo de Wiederhold *et al.* (225), no qual foi observado que mutantes para o gene *MKC1* apresentaram diminuição do EP. Além disso, a combinação de equinocandinas e inibidores da via da calcineurina- Ca^{2+} resultou na eliminação do EP (225), indicando a possível participação desta via no fenômeno do EP. Os mecanismos moleculares que levam ao aumento da síntese de quitina durante o EP ainda não está completamente elucidado. Porém, a análise de nossos resultados, em conjunto com os dados de outros estudos, sugere que o aumento da síntese de quitina durante o EP da CAS esteja relacionado principalmente à expressão de *CHS2* (Classe I) e *CHS3* (Classe IV) e à regulação das três principais vias de respostas ao estresse celular, PKC, HOG e Calcineurina- Ca^{2+} . Nossos resultados mostraram ainda que as células do EP de *C. albicans* não apresentaram aumento significativo na expressão do gene *FKS1*.

Ainda não está completamente compreendido se tais modificações morfológicas e bioquímicas exibidas por células do EP podem conferir alguma vantagem à célula fúngica ou contribuir para falha da terapia antifúngica, principalmente durante o tratamento com altas doses de equinocandinas. Sabe-se que β -1,3-glucana desempenha um papel crítico na manutenção da forma da célula e no controle da pressão osmótica (32). Portanto, a redução de β -1,3-glucana nas células do EP pode levar a diminuição do controle osmótico, o que possivelmente pode resultar em desvantagem quando comparado às células controle. Além disso, está bem estabelecido que os fatores de virulência são expressos principalmente durante forma filamentosa. Levando em consideração que as células do EP não apresentam a forma filamentosa, há uma hipótese de que as células do EP apresentem diminuição da expressão de fatores de virulência, o que conseqüentemente pode resultar em diminuição da capacidade de infecção.

O significado clínico do EP durante o tratamento com equinocandinas ainda não foi comprovado. Embora alguns autores não tenham obtido sucesso na demonstração do EP em modelos murinos de infecção sistêmica por *Candida* (18, 42, 112), esses dados ainda precisam de uma análise mais detalhada.

Sob o ponto de vista da relevância clínica do EP, dois aspectos devem ser considerados. O primeiro deles é que nenhuma vantagem na utilização de doses altas de equinocandinas tem sido observada em todos os ensaios clínicos realizados comparando concentrações convencionais a regimes de altas doses desses compostos no tratamento de pacientes com candidíase invasiva e/ou candidemia (21, 152). Um segundo aspecto a ser destacado refere-se aos achados intrigantes descritos por recente estudo clínico randomizado, conduzido por Pappas *et al.* (152), comparando a eficácia e segurança de duas diferentes doses de micafungina: 150 mg/dia versus 100 mg/dia no tratamento de candidíase invasiva. Neste estudo, os autores relataram que o tempo para negativação de hemocultura foi maior (3 dias) no grupo tratado com 150 mg/dia de micafungina quando comparado ao grupo com 100 mg/dia (2 dias). Na mesma série, os autores obtiveram maiores taxas de falha terapêutica (47%, 14/30) entre os pacientes tratados com 150 mg/dia

de micafungina quando comparado ao grupo tratado com 100 mg/dia de micafungina (22%, 6/28). Embora o significado clínico de EP permaneça obscuro, entendemos que, conforme sugerido por Pappas *et al.* (152), este fenômeno possa ajudar a entender, ao menos em parte, a ausência de maior sucesso terapêutico nos regimes terapêuticos com maiores doses de equinocandinas.

Finalizando, a presente investigação mostrou de forma inequívoca a ocorrência de EP relacionada à CAS em ensaios envolvendo as quatro principais espécies de interesse clínico em nosso meio. Foram descritos alterações morfológicas, bioquímicas e de expressão gênica que claramente refletem mecanismos adaptativos da célula fúngica que ocorrem quando da exposição a altas concentrações de CAS. A elucidação do fenômeno de EP, incluindo o entendimento dos diversos mecanismos genéticos e moleculares de escape à exposição a esses medicamentos, é conhecimento de grande utilidade para caracterização dos mecanismos de ação e resistência dessa classe de antifúngicos, assim como, para explorar possíveis estratégias de sinergismo entre substâncias antifúngicas.

6.0 CONCLUSÕES

A presente investigação obteve as seguintes conclusões:

1. Entre os 77 isolados de *Candida* spp. analisados neste estudo, 42 (54%) apresentaram o efeito paradoxal da caspofungina durante os testes de susceptibilidade, mostrando que se trata de um fenômeno bastante comum entre isolados de *C. albicans* e de *Candida* não-*C. albicans*, em particular *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* sensu strictu.
2. Os ensaios de curva de morte provaram ser mais discriminatórios que os ensaios de concentração fungicida mínima para caracterizar o EP, particularmente quando utilizamos isolados de espécies do complexo *C. parapsilosis*.
3. Os diferentes métodos utilizados mostraram que as células do EP apresentam-se metabolicamente ativas, mesmo sob altas concentrações de caspofungina.
4. As diferentes espécies de *Candida* utilizadas neste estudo apresentaram alterações morfológicas semelhantes durante o EP da caspofungina, mostrando que os isolados de *C. albicans* e de *Candida* não-*C. albicans* respondem de forma semelhante a altas concentrações desta droga.
5. Sob o ponto de vista bioquímico, ficou evidente que as células do EP apresentam um mecanismo compensatório, através do qual a diminuição do conteúdo de β -1,3-glucana é compensada pelo aumento do conteúdo de quitina na parede celular. Mais uma vez as diferentes espécies de *Candida* apresentaram um perfil bastante semelhante, ou seja, diminuição do conteúdo de β -1,3-glucana e aumento de quitina na parede celular.
6. Ainda sobre o conteúdo da parede celular, a inibição da síntese de β -1,3-glucana em células do EP mostra que a caspofungina apresentou atividade inibitória da síntese de β -1,3-glucana. Esses dados

confirmam a hipótese de que o EP é um mecanismo adaptativo, com características diferentes do fenômeno de resistência a esta classe de drogas.

7. Sobre os mecanismos moleculares envolvidos com o EP da caspofungina, nossos dados sugerem que em células do EP a síntese de quitina é regulada pelas vias de integridade da parede celular, incluindo as vias PKC, HOG e Calcineurina- Ca^{2+} . A ativação dessas vias resultou no aumento da expressão dos genes *CHS2* e *CHS3*, os quais podem ser responsáveis pelo aumento da síntese de quitina nas células do EP da CAS.

7.0 Referências Bibliográficas

1. **Abi-Said, D., E. Anaissie, O. Uzun, I. Raad, H. Pinzcowski, and S. Vartivarian.** 1997. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis* **24**:1122-8.
2. **Almirante, B., D. Rodriguez, M. Cuenca-Estrella, M. Almela, F. Sanchez, J. Ayats, C. Alonso-Tarres, J. L. Rodriguez-Tudela, and A. Pahissa.** 2006. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* **44**:1681-5.
3. **Almirante, B., D. Rodriguez, B. J. Park, M. Cuenca-Estrella, A. M. Planes, M. Almela, J. Mensa, F. Sanchez, J. Ayats, M. Gimenez, P. Saballs, S. K. Fridkin, J. Morgan, J. L. Rodriguez-Tudela, D. W. Warnock, and A. Pahissa.** 2005. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* **43**:1829-35.
4. **Alonso-Monge, R., S. Carvaihlo, C. Nombela, E. Rial, and J. Pla.** 2009. The Hog1 MAP kinase controls respiratory metabolism in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiology* **155**:413-23.
5. **Antunes, A. G., A. C. Pasqualotto, M. C. Diaz, P. A. d'Azevedo, and L. C. Severo.** 2004. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **46**:239-41.
6. **Aquino, V. R., L. W. Lunardi, L. Z. Goldani, and A. L. Barth.** 2005. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. *Braz J Infect Dis* **9**:411-8.
7. **Arendrup, M. C., E. Chryssanthou, P. Gaustad, M. Koskela, P. Sandven, and V. Fernandez.** 2007. Diagnostics of fungal infections in the Nordic countries: we still need to improve! *Scand J Infect Dis* **39**:337-43.
8. **Arendrup, M. C., G. Garcia-Effron, W. Buzina, K. L. Mortensen, N. Reiter, C. Lundin, H. E. Jensen, C. Lass-Florl, D. S. Perlin, and B. Bruun.** 2009. Breakthrough *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* double infection during caspofungin treatment: laboratory characteristics and implication for susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:1185-93.
9. **Atkinson, B. J., R. E. Lewis, and D. P. Kontoyiannis.** 2008. *Candida lusitanae* fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. *Med Mycol* **46**:541-6.
10. **Bachmann, S. P., T. F. Patterson, and J. L. Lopez-Ribot.** 2002. In vitro activity of caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* clinical isolates displaying different mechanisms of azole resistance. *J Clin Microbiol* **40**:2228-30.
11. **Baixench, M. T., N. Aoun, M. Desnos-Ollivier, D. Garcia-Hermoso, S. Bretagne, S. Ramires, C. Piketty, and E. Dannaoui.** 2007. Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. *J Antimicrob Chemother* **59**:1076-83.
12. **Balashov, S. V., S. Park, and D. S. Perlin.** 2006. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in FKS1. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2058-63.
13. **Banerjee, S. N., T. G. Emori, D. H. Culver, R. P. Gaynes, W. R. Jarvis, T. Horan, J. R. Edwards, J. Tolson, T. Henderson, and W. J. Martone.** 1991. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am J Med* **91**:86S-89S.
14. **Barchiesi, F., E. Spreghini, A. W. Fothergill, D. Arzeni, G. Greganti, D. Giannini, M. G. Rinaldi, and G. Scalise.** 2005. Caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2546-9.
15. **Barchiesi, F., E. Spreghini, S. Tomassetti, A. Della Vittoria, D. Arzeni, E. Manso, and G. Scalise.** 2006. Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2719-27.
16. **Basso, L. R., Jr., C. E. Gast, Y. Mao, and B. Wong.** 2010. Fluconazole transport into *Candida albicans* secretory vesicles by the membrane proteins Cdr1p, Cdr2p, and Mdr1p. *Eukaryot Cell* **9**:960-70.
17. **Bates, D. W., L. Su, D. T. Yu, G. M. Chertow, D. L. Seger, D. R. Gomes, E. J. Dasbach, and R. Platt.** 2001. Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. *Clin Infect Dis* **32**:686-93.

18. **Bayegan, S., L. Majoros, G. Kardos, A. Kemeny-Beke, C. Miszti, R. Kovacs, and R. Gesztelyi.** 2010. In vivo studies with a *Candida tropicalis* isolate exhibiting paradoxical growth in vitro in the presence of high concentration of caspofungin. *J Microbiol* **48**:170-3.
19. **Beck-Sague, C., and W. R. Jarvis.** 1993. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J Infect Dis* **167**:1247-51.
20. **Betts, R., A. Glasmacher, J. Maertens, G. Maschmeyer, J. A. Vazquez, H. Tepler, A. Taylor, R. Lupinacci, C. Sable, and N. Kartsonis.** 2006. Efficacy of caspofungin against invasive *Candida* or invasive *Aspergillus* infections in neutropenic patients. *Cancer* **106**:466-73.
21. **Betts, R. F., M. Nucci, D. Talwar, M. Gareca, F. Queiroz-Telles, R. J. Bedimo, R. Herbrecht, G. Ruiz-Palacios, J. A. Young, J. W. Baddley, K. M. Strohmaier, K. A. Tucker, A. F. Taylor, and N. A. Kartsonis.** 2009. A Multicenter, double-blind trial of a high-dose caspofungin treatment regimen versus a standard caspofungin treatment regimen for adult patients with invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* **48**:1676-84.
22. **Boorsma, A., H. de Nobel, B. ter Riet, B. Bargmann, S. Brul, K. J. Hellingwerf, and F. M. Klis.** 2004. Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**:413-27.
23. **Borg-von Zepelin, M., L. Kunz, R. Ruchel, U. Reichard, M. Weig, and U. Gross.** 2007. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. *J Antimicrob Chemother* **60**:424-8.
24. **Bowden, R., P. Chandrasekar, M. H. White, X. Li, L. Pietrelli, M. Gurwith, J. A. van Burik, M. Laverdiere, S. Safrin, and J. R. Wingard.** 2002. A double-blind, randomized, controlled trial of amphotericin B colloidal dispersion versus amphotericin B for treatment of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* **35**:359-66.
25. **Bowden, R. A., M. Cays, T. Gooley, R. D. Mamelok, and J. A. van Burik.** 1996. Phase I study of amphotericin B colloidal dispersion for the treatment of invasive fungal infections after marrow transplant. *J Infect Dis* **173**:1208-15.
26. **Bowman, J. C., G. K. Abruzzo, A. M. Flattery, C. J. Gill, E. J. Hickey, M. J. Hsu, J. N. Kahn, P. A. Liberator, A. S. Misura, B. A. Pelak, T. C. Wang, and C. M. Douglas.** 2006. Efficacy of caspofungin against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, and *Aspergillus nidulans*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:4202-5.
27. **Cabib, E., D. H. Roh, M. Schmidt, L. B. Crotti, and A. Varma.** 2001. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem* **276**:19679-82.
28. **Canton, E., J. Peman, M. Sastre, M. Romero, and A. Espinel-Ingroff.** 2006. Killing kinetics of caspofungin, micafungin, and amphotericin B against *Candida guilliermondii*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2829-32.
29. **Cassone, A., R. E. Mason, and D. Kerridge.** 1981. Lysis of growing yeast-form cells of *Candida albicans* by echinocandin: a cytological study. *Sabouraudia* **19**:97-110.
30. **Castanheira, M., L. N. Woosley, D. J. Diekema, S. A. Messer, R. N. Jones, and M. A. Pfaller.** 2010. Low prevalence of *fks1* hot spot 1 mutations in a worldwide collection of *Candida* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:2655-9.
31. **Chaffin, W. L.** 2008. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**:495-544.
32. **Chaffin, W. L., J. L. Lopez-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo, and J. P. Martinez.** 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:130-80.
33. **Chamilos, G., R. E. Lewis, N. Albert, and D. P. Kontoyiannis.** 2007. Paradoxical effect of Echinocandins across *Candida* species in vitro: evidence for echinocandin-specific and *Candida* species-related differences. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:2257-9.
34. **Chandrasekar, P. H., and J. D. Sobel.** 2006. Micafungin: a new echinocandin. *Clin Infect Dis* **42**:1171-8.
35. **Chen, L. M., Y. H. Xu, C. L. Zhou, J. Zhao, C. Y. Li, and R. Wang.** 2010. Overexpression of CDR1 and CDR2 genes plays an important role in fluconazole resistance in *Candida albicans* with G487T and T916C mutations. *J Int Med Res* **38**:536-45.
36. **Chen, S. C., D. Marriott, E. G. Playford, Q. Nguyen, D. Ellis, W. Meyer, T. C. Sorrell, and M. Slavin.** 2009. Candidaemia with uncommon *Candida* species: predisposing factors, outcome, antifungal susceptibility, and implications for management. *Clin Microbiol Infect* **15**:662-9.
37. **Cheung, C., Y. Guo, P. Gialanella, and M. Feldmesser.** 2006. Development of candidemia on caspofungin therapy: a case report. *Infection* **34**:345-8.

38. **Chow, J. K., Y. Golan, R. Ruthazer, A. W. Karchmer, Y. Carmeli, D. Lichtenberg, V. Chawla, J. Young, and S. Hadley.** 2008. Factors associated with candidemia caused by non-albicans *Candida* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit. *Clin Infect Dis* **46**:1206-13.
39. **Cisterna, R., G. Ezpeleta, O. Telleria, J. Guinea, B. Regueiro, J. Garcia-Rodriguez, and J. Esperalba.** 2010. Nationwide sentinel surveillance of bloodstream *Candida* infections in 40 tertiary care hospitals in Spain. *J Clin Microbiol* **48**:4200-6.
40. **Clancy, C. J., and M. H. Nguyen.** 1999. Correlation between in vitro susceptibility determined by E test and response to therapy with amphotericin B: results from a multicenter prospective study of candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1289-90.
41. **Cleary, J. D., G. Garcia-Effron, S. W. Chapman, and D. S. Perlin.** 2008. Reduced *Candida glabrata* susceptibility secondary to an FKS1 mutation developed during candidemia treatment. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:2263-5.
42. **Clemons, K. V., M. Espiritu, R. Parmar, and D. A. Stevens.** 2006. Assessment of the paradoxical effect of caspofungin in therapy of candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1293-7.
43. **CLSI.** 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard—third edition, M27-A3., vol. , Wayne, PA.
44. **Colombo, A. L., and T. Guimaraes.** 2003. [Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp]. *Rev Soc Bras Med Trop* **36**:599-607.
45. **Colombo, A. L., T. Guimaraes, L. R. Silva, L. P. de Almeida Monfardini, A. K. Cunha, P. Rady, T. Alves, and R. C. Rosas.** 2007. Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol* **28**:570-6.
46. **Colombo, A. L., A. L. Ngai, M. Bourque, S. K. Bradshaw, K. M. Strohmaier, A. F. Taylor, R. J. Lupinacci, and N. A. Kartsonis.** 2010. Caspofungin use in patients with invasive candidiasis caused by common non-albicans *Candida* species: review of the caspofungin database. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:1864-71.
47. **Colombo, A. L., M. Nucci, B. J. Park, S. A. Nouer, B. Arthington-Skaggs, D. A. da Matta, D. Warnock, and J. Morgan.** 2006. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* **44**:2816-23.
48. **Colombo, A. L., M. Nucci, R. Salomao, M. L. Branchini, R. Richtmann, A. Derossi, and S. B. Wey.** 1999. High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* **34**:281-6.
49. **Cornely, O. A., J. Maertens, D. J. Winston, J. Perfect, A. J. Ullmann, T. J. Walsh, D. Helfgott, J. Holowiecki, D. Stockelberg, Y. T. Goh, M. Petrini, C. Hardalo, R. Suresh, and D. Angulo-Gonzalez.** 2007. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* **356**:348-59.
50. **Cuenca-Estrella, M., A. Gomez-Lopez, E. Mellado, M. J. Buitrago, A. Monzon, and J. L. Rodriguez-Tudela.** 2006. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:917-21.
51. **da Matta, D. A., L. P. de Almeida, A. M. Machado, A. C. Azevedo, E. J. Kusano, N. F. Travassos, R. Salomao, and A. L. Colombo.** 2007. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in Sao Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagn Microbiol Infect Dis* **57**:399-404.
52. **Delgado, A. C., R. de Jesus Pedro, F. H. Aoki, M. R. Resende, P. Trabasso, A. L. Colombo, M. S. de Oliveira, Y. Mikami, and M. L. Moretti.** 2009. Clinical and microbiological assessment of patients with a long-term diagnosis of human immunodeficiency virus infection and *Candida* oral colonization. *Clin Microbiol Infect* **15**:364-71.
53. **Denning, D. W.** 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* **362**:1142-51.
54. **Deresinski, S. C., and D. A. Stevens.** 2003. Caspofungin. *Clin Infect Dis* **36**:1445-57.
55. **Douglas, C. M.** 2001. Fungal beta(1,3)-D-glucan synthesis. *Med Mycol* **39 Suppl 1**:55-66.
56. **Drgonova, J., T. Drgon, K. Tanaka, R. Kollar, G. C. Chen, R. A. Ford, C. S. Chan, Y. Takai, and E. Cabib.** 1996. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science* **272**:277-9.
57. **Dunyach, C., P. Drakulovski, S. Bertout, S. Jouvert, J. Reynes, and M. Mallie.** 2010. Fungicidal activity and morphological alterations of *Candida albicans* induced by echinocandins: study of strains with reduced caspofungin susceptibility. *Mycoses*.

58. **Eisman, B., R. Alonso-Monge, E. Roman, D. Arana, C. Nombela, and J. Pla.** 2006. The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamyospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **5**:347-58.
59. **Enache-Angoulvant, A., A. Girard, J. L. Poirot, and C. Hennequin.** 2009. In vitro activity of caspofungin and voriconazole against uncommon *Candida* spp. *Int J Antimicrob Agents* **33**:595-6.
60. **Eschenauer, G., D. D. Depestel, and P. L. Carver.** 2007. Comparison of echinocandin antifungals. *Ther Clin Risk Manag* **3**:71-97.
61. **Espinel-Ingroff, A.** 2008. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol* **25**:101-6.
62. **Favel, A., A. Michel-Nguyen, F. Peyron, C. Martin, L. Thomachot, A. Datry, J. P. Bouchara, S. Challier, T. Noel, C. Chastin, and P. Regli.** 2003. Colony morphology switching of *Candida lusitanae* and acquisition of multidrug resistance during treatment of a renal infection in a newborn: case report and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* **47**:331-9.
63. **Fishman, J. A.** 2002. Overview: fungal infections in the transplant patient. *Transpl Infect Dis* **4 Suppl 3**:3-11.
64. **Fishman, J. A., and B. M. Kubak.** 2002. Clinical cases in transplantation. *Transpl Infect Dis* **4 Suppl 3**:62-6.
65. **Fleischhacker, M., C. Radecke, B. Schulz, and M. Ruhnke.** 2008. Paradoxical growth effects of the echinocandins caspofungin and micafungin, but not of anidulafungin, on clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **27**:127-31.
66. **Franca, J. C., C. E. Ribeiro, and F. Queiroz-Telles.** 2008. [Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: incidence, frequency of different species, risk factors and antifungal susceptibility]. *Rev Soc Bras Med Trop* **41**:23-8.
67. **Garcia-Effron, G., D. J. Chua, J. R. Tomada, J. DiPersio, D. S. Perlin, M. Ghannoum, and H. Bonilla.** 2010. Novel FKS mutations associated with echinocandin resistance in *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:2225-7.
68. **Garcia-Effron, G., S. K. Katiyar, S. Park, T. D. Edlind, and D. S. Perlin.** 2008. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:2305-12.
69. **Garcia-Effron, G., D. P. Kontoyiannis, R. E. Lewis, and D. S. Perlin.** 2008. Caspofungin-resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematologic malignancies. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:4181-3.
70. **Garcia-Effron, G., S. Lee, S. Park, J. D. Cleary, and D. S. Perlin.** 2009. Effect of *Candida glabrata* FKS1 and FKS2 mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:3690-9.
71. **Garcia-Rodriguez, L. J., J. A. Trilla, C. Castro, M. H. Valdivieso, A. Duran, and C. Roncero.** 2000. Characterization of the chitin biosynthesis process as a compensatory mechanism in the fks1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **478**:84-8.
72. **Garey, K. W., M. P. Pai, K. J. Suda, R. S. Turpin, M. D. Rege, D. E. Mingo, and D. T. Bearden.** 2007. Inadequacy of fluconazole dosing in patients with candidemia based on Infectious Diseases Society of America (IDSA) guidelines. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* **16**:919-27.
73. **Goldman, G. H., M. E. da Silva Ferreira, E. dos Reis Marques, M. Savoldi, D. Perlin, S. Park, P. C. Godoy Martinez, M. H. Goldman, and A. L. Colombo.** 2004. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* **50**:25-32.
74. **Goncalves, S. S., C. S. Amorim, M. Nucci, A. C. Padovan, M. R. Briones, A. S. Melo, and A. L. Colombo.** 2009. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. *Clin Microbiol Infect*.
75. **Gonzalez, G. M., O. J. Portillo, G. I. Uscanga, S. E. Andrade, M. Robledo, C. Rodriguez, and M. Elizondo.** 2009. Therapeutic efficacy of voriconazole against a fluconazole-resistant *Candida albicans* isolate in a vaginal model. *J Antimicrob Chemother* **64**:571-3.

76. **Groll, A. H., F. M. Muller, S. C. Piscitelli, and T. J. Walsh.** 1998. Lipid formulations of amphotericin B: clinical perspectives for the management of invasive fungal infections in children with cancer. *Klin Padiatr* **210**:264-73.
77. **Gudlaugsson, O., S. Gillespie, K. Lee, J. Vande Berg, J. Hu, S. Messer, L. Herwaldt, M. Pfaller, and D. Diekema.** 2003. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* **37**:1172-7.
78. **Guinea, J., T. Pelaez, S. Recio, M. Torres-Narbona, and E. Bouza.** 2008. In vitro antifungal activities of isavuconazole (BAL4815), voriconazole, and fluconazole against 1,007 isolates of zygomycete, *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* species. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:1396-400.
79. **Guinet, R., J. Chanas, A. Goullier, G. Bonnefoy, and P. Ambroise-Thomas.** 1983. Fatal septicemia due to amphotericin B-resistant *Candida lusitanae*. *J Clin Microbiol* **18**:443-4.
80. **Hajjeh, R. A., A. N. Sofair, L. H. Harrison, G. M. Lyon, B. A. Arthington-Skaggs, S. A. Mirza, M. Phelan, J. Morgan, W. Lee-Yang, M. A. Ciblak, L. E. Benjamin, L. T. Sanza, S. Huie, S. F. Yeo, M. E. Brandt, and D. W. Warnock.** 2004. 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. *J Clin Microbiol* **42**:1519-27.
81. **Hakki, M., J. F. Staab, and K. A. Marr.** 2006. Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2522-4.
82. **Hernandez, S., J. L. Lopez-Ribot, L. K. Najvar, D. I. McCarthy, R. Bocanegra, and J. R. Graybill.** 2004. Caspofungin resistance in *Candida albicans*: correlating clinical outcome with laboratory susceptibility testing of three isogenic isolates serially obtained from a patient with progressive *Candida* esophagitis. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1382-3.
83. **Hinrichsen, S. L., E. Falcao, T. A. Vilella, A. L. Colombo, M. Nucci, L. Moura, L. Rego, C. Lira, and L. Almeida.** 2008. [Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* **41**:394-8.
84. **Horn, D. L., 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.** 2009. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* **48**:1695-703.
85. **Hsu, D. I., M. Nguyen, L. Nguyen, A. Law, and A. Wong-Beringer.** 2010. A multicentre study to evaluate the impact of timing of caspofungin administration on outcomes of invasive candidiasis in non-immunocompromised adult patients. *J Antimicrob Chemother* **65**:1765-70.
86. **Johnson, L. B., and C. A. Kauffman.** 2003. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis* **36**:630-7.
87. **Kabbara, N., C. Lacroix, R. Peffault de Latour, G. Socie, M. Ghannoum, and P. Ribaud.** 2008. Breakthrough *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* blood stream infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients receiving long-term caspofungin therapy. *Haematologica* **93**:639-40.
88. **Kahn, J. N., G. Garcia-Effron, M. J. Hsu, S. Park, K. A. Marr, and D. S. Perlin.** 2007. Acquired echinocandin resistance in a *Candida krusei* isolate due to modification of glucan synthase. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:1876-8.
89. **Kahn, J. N., M. J. Hsu, F. Racine, R. Giacobbe, and M. Motyl.** 2006. Caspofungin susceptibility in *Aspergillus* and non-*Aspergillus* molds: inhibition of glucan synthase and reduction of beta-D-1,3 glucan levels in culture. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2214-6.
90. **Kapteyn, J. C., L. L. Hoyer, J. E. Hecht, W. H. Muller, A. Andel, A. J. Verkleij, M. Makarow, H. Van Den Ende, and F. M. Klis.** 2000. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* **35**:601-11.
91. **Kapteyn, J. C., B. ter Riet, E. Vink, S. Blad, H. De Nobel, H. Van Den Ende, and F. M. Klis.** 2001. Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol* **39**:469-79.
92. **Katiyar, S., M. Pfaller, and T. Edlind.** 2006. *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2892-4.
93. **Kelly, J., R. Rowan, M. McCann, and K. Kavanagh.** 2009. Exposure to caspofungin activates Cap and Hog pathways in *Candida albicans*. *Med Mycol* **47**:697-706.
94. **Khan, M. U., S. Ali, M. A. Baig, M. A. Rafiq, B. C. Vasavada, and I. A. Khan.** 2007. *Candida parapsilosis* endocarditis 8 months after transient candidemia. *Int J Cardiol* **118**:e58-9.

95. **Klepser, M. E., E. J. Ernst, M. E. Ernst, S. A. Messer, and M. A. Pfaller.** 1998. Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY303366. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:1387-91.
96. **Klepser, M. E., E. J. Ernst, and M. A. Pfaller.** 1997. Update on antifungal resistance. *Trends Microbiol* **5**:372-5.
97. **Klis, F. M., P. de Groot, and K. Hellingwerf.** 2001. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* **39 Suppl 1**:1-8.
98. **Kondoh, O., Y. Tachibana, Y. Ohya, M. Arisawa, and T. Watanabe.** 1997. Cloning of the RHO1 gene from *Candida albicans* and its regulation of beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol* **179**:7734-41.
99. **Kremery, V., and A. J. Barnes.** 2002. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* **50**:243-60.
100. **Krogh-Madsen, M., M. C. Arendrup, L. Heslet, and J. D. Knudsen.** 2006. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. *Clin Infect Dis* **42**:938-44.
101. **Kuse, E. R., P. Chetchotisakd, C. A. da Cunha, M. Ruhnke, C. Barrios, D. Raghunadharao, J. S. Sekhon, A. Freire, V. Ramasubramanian, I. Demeyer, M. Nucci, A. Leelarasamee, F. Jacobs, J. Decruyenaere, D. Pittet, A. J. Ullmann, L. Ostrosky-Zeichner, O. Lortholary, S. Koblinger, H. Diekmann-Berndt, and O. A. Cornely.** 2007. Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidaemia and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. *Lancet* **369**:1519-27.
102. **Lagorce, A., N. C. Hauser, D. Labourdette, C. Rodriguez, H. Martin-Yken, J. Arroyo, J. D. Hoheisel, and J. Francois.** 2003. Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**:20345-57.
103. **Laverdiere, M., R. G. Lalonde, J. G. Baril, D. C. Sheppard, S. Park, and D. S. Perlin.** 2006. Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* oesophagitis. *J Antimicrob Chemother* **57**:705-8.
104. **Legout, L., M. Assal, P. Rohner, D. Lew, L. Bernard, and P. Hoffmeyer.** 2006. Successful treatment of *Candida parapsilosis* (fluconazole-resistant) osteomyelitis with caspofungin in a HIV patient. *Scand J Infect Dis* **38**:728-30.
105. **Lesage, G., and H. Bussey.** 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:317-43.
106. **Lesage, G., A. M. Sdicu, P. Menard, J. Shapiro, S. Hussein, and H. Bussey.** 2004. Analysis of beta-1,3-glucan assembly in *Saccharomyces cerevisiae* using a synthetic interaction network and altered sensitivity to caspofungin. *Genetics* **167**:35-49.
107. **Levin, D. E.** 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**:262-91.
108. **Lipke, P. N., and R. Ovalle.** 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol* **180**:3735-40.
109. **Lockhart, S. R., S. A. Messer, M. A. Pfaller, and D. J. Diekema.** 2008. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* **46**:2659-64.
110. **Magill, S. S., C. Shields, C. L. Sears, M. Choti, and W. G. Merz.** 2006. Triazole cross-resistance among *Candida* spp.: case report, occurrence among bloodstream isolates, and implications for antifungal therapy. *J Clin Microbiol* **44**:529-35.
111. **Malik, I. A., I. Moid, Z. Aziz, S. Khan, and M. Suleman.** 1998. A randomized comparison of fluconazole with amphotericin B as empiric anti-fungal agents in cancer patients with prolonged fever and neutropenia. *Am J Med* **105**:478-83.
112. **Marine, M., F. J. Pastor, I. H. Sahand, J. Ponton, G. Quindos, and J. Guarro.** 2009. Paradoxical growth of *Candida dubliniensis* does not preclude in vivo response to echinocandin therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:5297-9.
113. **Marriott, D. J., E. G. Playford, S. Chen, M. Slavin, Q. Nguyen, D. Ellis, and T. C. Sorrell.** 2009. Determinants of mortality in non-neutropenic ICU patients with candidaemia. *Crit Care* **13**:R115.
114. **Martel, C. M., J. E. Parker, O. Bader, M. Weig, U. Gross, A. G. Warrilow, D. E. Kelly, and S. L. Kelly.** 2010. A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in ERG11 (encoding sterol 14alpha-demethylase) and ERG5 (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:3578-83.

115. **Martel, C. M., J. E. Parker, O. Bader, M. Weig, U. Gross, A. G. Warrilow, N. Rolley, D. E. Kelly, and S. L. Kelly.** 2010. Identification and characterization of four azole-resistant erg3 mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:4527-33.
116. **Mazur, P., N. Morin, W. Baginsky, M. el-Sherbeini, J. A. Clemas, J. B. Nielsen, and F. Foor.** 1995. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol* **15**:5671-81.
117. **McCormack, P. L., and C. M. Perry.** 2005. Caspofungin: a review of its use in the treatment of fungal infections. *Drugs* **65**:2049-68.
118. **Melo, A. S., F. C. Bizerra, E. Freymuller, B. A. Arthington-Skaggs, and A. L. Colombo.** 2010. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol*.
119. **Melo, A. S., A. L. Colombo, and B. A. Arthington-Skaggs.** 2007. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:3081-8.
120. **Merz, W. G.** 1984. *Candida lusitanae*: frequency of recovery, colonization, infection, and amphotericin B resistance. *J Clin Microbiol* **20**:1194-5.
121. **Messer, S. A., D. J. Diekema, L. Boyken, S. Tendolkar, R. J. Hollis, and M. A. Pfaller.** 2006. Activities of micafungin against 315 invasive clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida* spp. *J Clin Microbiol* **44**:324-6.
122. **Miller, C. D., B. W. Lomaestro, S. Park, and D. S. Perlin.** 2006. Progressive esophagitis caused by *Candida albicans* with reduced susceptibility to caspofungin. *Pharmacotherapy* **26**:877-80.
123. **Minari, A., R. Hachem, and I. Raad.** 2001. *Candida lusitanae*: a cause of breakthrough fungemia in cancer patients. *Clin Infect Dis* **32**:186-90.
124. **Mohr, J. F., A. C. Hall, C. D. Ericsson, and L. Ostrosky-Zeichner.** 2005. Fatal amphotericin B overdose due to administration of nonlipid formulation instead of lipid formulation. *Pharmacotherapy* **25**:426-8.
125. **Mora-Duarte, J., R. Betts, C. Rotstein, A. L. Colombo, L. Thompson-Moya, J. Smetana, R. Lupinacci, C. Sable, N. Kartsonis, and J. Perfect.** 2002. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med* **347**:2020-9.
126. **Morio, F., C. Loge, B. Besse, C. Hennequin, and P. Le Pape.** 2010. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* **66**:373-84.
127. **Morrell, M., V. J. Fraser, and M. H. Kollef.** 2005. Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3640-5.
128. **Morris, M. I., and M. Villmann.** 2006. Echinocandins in the management of invasive fungal infections, part 1. *Am J Health Syst Pharm* **63**:1693-703.
129. **Moudgal, V., T. Little, D. Boikov, and J. A. Vazquez.** 2005. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:767-9.
130. **Munro, C. A., and N. A. Gow.** 2001. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med Mycol* **39 Suppl 1**:41-53.
131. **Munro, C. A., S. Selvaggini, I. de Bruijn, L. Walker, M. D. Lenardon, B. Gerssen, S. Milne, A. J. Brown, and N. A. Gow.** 2007. The PKC, HOG and Ca²⁺ signalling pathways coordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **63**:1399-413.
132. **Munro, C. A., K. Winter, A. Buchan, K. Henry, J. M. Becker, A. J. Brown, C. E. Bulawa, and N. A. Gow.** 2001. Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol Microbiol* **39**:1414-26.
133. **Nagappan, V., and S. Deresinski.** 2007. Reviews of anti-infective agents: posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis* **45**:1610-7.
134. **Navarro-Garcia, F., B. Eisman, E. Roman, C. Nombela, and J. Pla.** 2001. Signal transduction pathways and cell-wall construction in *Candida albicans*. *Med Mycol* **39 Suppl 1**:87-100.
135. **Nguyen, K. T., P. Ta, B. T. Hoang, S. Cheng, B. Hao, M. H. Nguyen, and C. J. Clancy.** 2010. Characterising the post-antifungal effects of micafungin against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* isolates. *Int J Antimicrob Agents* **35**:80-4.

136. **Nguyen, M. H., J. E. Peacock, Jr., A. J. Morris, D. C. Tanner, M. L. Nguyen, D. R. Snyderman, M. M. Wagener, M. G. Rinaldi, and V. L. Yu.** 1996. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* **100**:617-23.
137. **Niimi, K., K. Maki, F. Ikeda, A. R. Holmes, E. Lamping, M. Niimi, B. C. Monk, and R. D. Cannon.** 2006. Overexpression of *Candida albicans* CDR1, CDR2, or MDR1 does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1148-55.
138. **Nishiyama, Y., K. Uchida, and H. Yamaguchi.** 2002. Morphological changes of *Candida albicans* induced by micafungin (FK463), a water-soluble echinocandin-like lipopeptide. *J Electron Microscop* (Tokyo) **51**:247-55.
139. **Nolte, F. S., T. Parkinson, D. J. Falconer, S. Dix, J. Williams, C. Gilmore, R. Geller, and J. R. Wingard.** 1997. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:196-9.
140. **Odds, F. C., A. J. Brown, and N. A. Gow.** 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* **11**:272-9.
141. **Odds, F. C., M. F. Hanson, A. D. Davidson, M. D. Jacobsen, P. Wright, J. A. Whyte, N. A. Gow, and B. L. Jones.** 2007. One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. *J Med Microbiol* **56**:1066-75.
142. **Oshero, N., G. S. May, N. D. Albert, and D. P. Kontoyiannis.** 2002. Overexpression of Sbe2p, a Golgi protein, results in resistance to caspofungin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2462-9.
143. **Ostrosky-Zeichner, L.** 2003. New approaches to the risk of *Candida* in the intensive care unit. *Curr Opin Infect Dis* **16**:533-7.
144. **Osumi, M.** 1998. [Dynamics of cell wall formation from *Trichophyton mentagrophytes* protoplast]. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **39**:151-9.
145. **Osumi, M.** 1998. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* **29**:207-33.
146. **Pagano, L., M. Caira, A. Candoni, M. Offidani, L. Fianchi, B. Martino, D. Pastore, M. Picardi, A. Bonini, A. Chierichini, R. Fanci, C. Caramatti, R. Invernizzi, D. Mattei, M. E. Mitra, L. Melillo, F. Aversa, M. T. Van Lint, P. Falcucci, C. G. Valentini, C. Girmenia, and A. Nosari.** 2006. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* **91**:1068-75.
147. **Panackal, A. A., J. L. Gribskov, J. F. Staab, K. A. Kirby, M. Rinaldi, and K. A. Marr.** 2006. Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* **44**:1740-3.
148. **Pappas, G., V. Ierodiakonou, and M. E. Falagas.** 2009. Lost in translation: differences in antimicrobial indication approval policies between the United States and Europe. *Clin Ther* **31**:1595-603.
149. **Pappas, P. G., B. D. Alexander, D. R. Andes, S. Hadley, C. A. Kauffman, A. Freifeld, E. J. Anaissie, L. M. Brumble, L. Herwaldt, J. Ito, D. P. Kontoyiannis, G. M. Lyon, K. A. Marr, V. A. Morrison, B. J. Park, T. F. Patterson, T. M. Perl, R. A. Oster, M. G. Schuster, R. Walker, T. J. Walsh, K. A. Wannemuehler, and T. M. Chiller.** 2010. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin Infect Dis* **50**:1101-11.
150. **Pappas, P. G., C. A. Kauffman, D. Andes, D. K. Benjamin, Jr., T. F. Calandra, J. E. Edwards, Jr., S. G. Filler, J. F. Fisher, B. J. Kullberg, L. Ostrosky-Zeichner, A. C. Reboli, J. H. Rex, T. J. Walsh, and J. D. Sobel.** 2009. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **48**:503-35.
151. **Pappas, P. G., 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, and W. E. Dismukes.** 2003. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis* **37**:634-43.
152. **Pappas, P. G., C. M. Rotstein, R. F. Betts, M. Nucci, D. Talwar, J. J. De Waele, J. A. Vazquez, B. F. Dupont, D. L. Horn, L. Ostrosky-Zeichner, A. C. Reboli, B. Suh, R. Digumarti, C. Wu, L. L. Kovanda, L. J. Arnold, and D. N. Buell.** 2007. Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* **45**:883-93.

153. **Park, B. J., B. A. Arthington-Skaggs, R. A. Hajjeh, N. Iqbal, M. A. Ciblak, W. Lee-Yang, M. D. Hairston, M. Phelan, B. D. Plikaytis, A. N. Sofair, L. H. Harrison, S. K. Fridkin, and D. W. Warnock.** 2006. Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida* bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1287-92.
154. **Park, S., R. Kelly, J. N. Kahn, J. Robles, M. J. Hsu, E. Register, W. Li, V. Vyas, H. Fan, G. Abruzzo, A. Flattery, C. Gill, G. Chrebet, S. A. Parent, M. Kurtz, H. Tepler, C. M. Douglas, and D. S. Perlin.** 2005. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3264-73.
155. **Pasquale, T., J. R. Tomada, M. Ghannoun, J. Dipersio, and H. Bonilla.** 2008. Emergence of *Candida tropicalis* resistant to caspofungin. *J Antimicrob Chemother* **61**:219.
156. **Pasqualotto, A. C.** 2008. Amphotericin B: the higher the dose, the higher the toxicity. *Clin Infect Dis* **47**:1110; author reply 1110-1.
157. **Pelletier, R., I. Alarie, R. Lagace, and T. J. Walsh.** 2005. Emergence of disseminated candidiasis caused by *Candida krusei* during treatment with caspofungin: case report and review of literature. *Med Mycol* **43**:559-64.
158. **Perlin, D. S.** 2007. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat* **10**:121-30.
159. **Petrikkos, G., and A. Skiada.** 2007. Recent advances in antifungal chemotherapy. *Int J Antimicrob Agents* **30**:108-17.
160. **Pfaller, M. A., L. Boyken, R. J. Hollis, J. Kroeger, S. A. Messer, S. Tendolkar, and D. J. Diekema.** 2008. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol* **46**:150-6.
161. **Pfaller, M. A., L. Boyken, S. A. Messer, S. Tendolkar, R. J. Hollis, and D. J. Diekema.** 2004. Evaluation of the etest method using Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue for determining amphotericin B MICs for 4,936 clinical isolates of *Candida* species. *J Clin Microbiol* **42**:4977-9.
162. **Pfaller, M. A., M. Castanheira, D. J. Diekema, S. A. Messer, G. J. Moet, and R. N. Jones.** 2010. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol* **48**:1592-9.
163. **Pfaller, M. A., and D. J. Diekema.** 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**:133-63.
164. **Pfaller, M. A., D. J. Diekema, D. L. Gibbs, V. A. Newell, R. Barton, H. Bijie, J. Bille, S. C. Chang, M. da Luz Martins, A. Duse, D. Dzierzanowska, D. Ellis, J. Finkelievich, I. Gould, D. Gur, A. Hoosen, K. Lee, N. Mallatova, M. Mallie, N. G. Peng, G. Petrikos, A. Santiago, J. Trupl, A. M. VanDen Abeele, J. Wadula, and M. Zaidi.** 2010. Geographic variation in the frequency of isolation and fluconazole and voriconazole susceptibilities of *Candida glabrata*: an assessment from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* **67**:162-71.
165. **Pfaller, M. A., D. J. Diekema, D. L. Gibbs, V. A. Newell, D. Ellis, V. Tullio, A. Rodloff, W. Fu, and T. A. Ling.** 2010. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol* **48**:1366-77.
166. **Pfaller, M. A., D. J. Diekema, D. L. Gibbs, V. A. Newell, J. F. Meis, I. M. Gould, W. Fu, A. L. Colombo, and E. Rodriguez-Noriega.** 2007. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* **45**:1735-45.
167. **Pfaller, M. A., D. J. Diekema, D. L. Gibbs, V. A. Newell, K. P. Ng, A. Colombo, J. Finkelievich, R. Barnes, and J. Wadula.** 2008. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol* **46**:842-9.
168. **Pfaller, M. A., D. J. Diekema, L. Ostrosky-Zeichner, J. H. Rex, B. D. Alexander, D. Andes, S. D. Brown, V. Chaturvedi, M. A. Ghannoun, C. C. Knapp, D. J. Sheehan, and T. J. Walsh.** 2008. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. *J Clin Microbiol* **46**:2620-9.

169. **Pfaller, M. A., D. J. Diekema, and D. J. Sheehan.** 2006. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* **19**:435-47.
170. **Pfaller, M. A., S. A. Messer, L. Boyken, C. Rice, S. Tendolkar, R. J. Hollis, and D. J. Diekema.** 2003. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. *J Clin Microbiol* **41**:5729-31.
171. **Pfaller, M. A., S. A. Messer, L. Boyken, C. Rice, S. Tendolkar, R. J. Hollis, and D. J. Diekema.** 2007. Use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to voriconazole among 13,338 clinical isolates of *Candida* spp. Tested by clinical and laboratory standards institute-recommended broth microdilution methods. *J Clin Microbiol* **45**:70-5.
172. **Pfaller, M. A., S. A. Messer, R. J. Hollis, and R. N. Jones.** 2002. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1032-7.
173. **Phillips, P., S. Shafran, G. Garber, C. Rotstein, F. Smail, I. Fong, I. Salit, M. Miller, K. Williams, J. M. Conly, J. Singer, and S. Ioannou.** 1997. Multicenter randomized trial of fluconazole versus amphotericin B for treatment of candidemia in non-neutropenic patients. Canadian Candidemia Study Group. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **16**:337-45.
174. **Plaine, A., L. Walker, G. Da Costa, H. M. Mora-Montes, A. McKinnon, N. A. Gow, C. Gaillardin, C. A. Munro, and M. L. Richard.** 2008. Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. *Fungal Genet Biol* **45**:1404-14.
175. **Playford, E. G., P. Eggimann, and T. Calandra.** 2008. Antifungals in the ICU. *Curr Opin Infect Dis* **21**:610-9.
176. **Popolo, L., T. Gualtieri, and E. Ragni.** 2001. The yeast cell-wall salvage pathway. *Med Mycol* **39 Suppl 1**:111-21.
177. **Posteraro, B., M. Sanguinetti, B. Fiori, M. La Sorda, T. Spanu, D. Sanglard, and G. Fadda.** 2006. Caspofungin activity against clinical isolates of azole cross-resistant *Candida glabrata* overexpressing efflux pump genes. *J Antimicrob Chemother* **58**:458-61.
178. **Rangel-Frausto, M. S., T. Wiblin, H. M. Blumberg, L. Saiman, J. Patterson, M. Rinaldi, M. Pfaller, J. E. Edwards, Jr., W. Jarvis, J. Dawson, and R. P. Wenzel.** 1999. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. *Clin Infect Dis* **29**:253-8.
179. **Reboli, A. C., C. Rotstein, P. G. Pappas, S. W. Chapman, D. H. Kett, D. Kumar, R. Betts, M. Wible, B. P. Goldstein, J. Schranz, D. S. Krause, and T. J. Walsh.** 2007. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *N Engl J Med* **356**:2472-82.
180. **Rex, J. H., J. E. Bennett, A. M. Sugar, P. G. Pappas, C. M. van der Horst, J. E. Edwards, R. G. Washburn, W. M. Scheld, A. W. Karchmer, A. P. Dine, and et al.** 1994. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. Candidemia Study Group and the National Institute. *N Engl J Med* **331**:1325-30.
181. **Romero, M., E. Canton, J. Peman, and M. Gobernado.** 2004. [Study of in vitro activity of caspofungin on non-*Candida albicans* yeast strains determined by two methods: M27-A2 and EUCAST]. *Rev Esp Quimioter* **17**:257-62.
182. **Rueping, M. J., J. J. Vehreschild, and O. A. Cornely.** 2009. Invasive candidiasis and candidemia: from current opinions to future perspectives. *Expert Opin Investig Drugs* **18**:735-48.
183. **Ruiz-Herrera, J., M. V. Elorza, E. Valentin, and R. Sentandreu.** 2006. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res* **6**:14-29.
184. **Sabatelli, F., R. Patel, P. A. Mann, C. A. Mendrick, C. C. Norris, R. Hare, D. Loebenberg, T. A. Black, and P. M. McNicholas.** 2006. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2009-15.
185. **Saiman, L., E. Ludington, J. D. Dawson, J. E. Patterson, S. Rangel-Frausto, R. T. Wiblin, H. M. Blumberg, M. Pfaller, M. Rinaldi, J. E. Edwards, R. P. Wenzel, and W. Jarvis.** 2001. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J* **20**:1119-24.

186. **Sandven, P., L. Bevanger, A. Digranes, H. H. Haukland, T. Mannsaker, and P. Gaustad.** 2006. Candidemia in Norway (1991 to 2003): results from a nationwide study. *J Clin Microbiol* **44**:1977-81.
187. **Sanglard, D., A. Coste, and S. Ferrari.** 2009. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res* **9**:1029-50.
188. **Sanglard, D., F. Ischer, and J. Bille.** 2001. Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1174-83.
189. **Sanglard, D., F. Ischer, L. Koymans, and J. Bille.** 1998. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:241-53.
190. **Sanglard, D., F. Ischer, T. Parkinson, D. Falconer, and J. Bille.** 2003. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2404-12.
191. **Sanglard, D., and F. C. Odds.** 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* **2**:73-85.
192. **Schuetzler-Muehlbauer, M., B. Willinger, G. Krapf, S. Enzinger, E. Presterl, and K. Kuchler.** 2003. The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin. *Mol Microbiol* **48**:225-35.
193. **Silva, V., G. Hermosilla, and C. Abarca.** 2007. Nosocomial candiduria in women undergoing urinary catheterization. Clonal relationship between strains isolated from vaginal tract and urine. *Med Mycol* **45**:645-51.
194. **Singh, S. D., N. Robbins, A. K. Zaas, W. A. Schell, J. R. Perfect, and L. E. Cowen.** 2009. Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. *PLoS Pathog* **5**:e1000532.
195. **Skiest, D. J., J. A. Vazquez, G. M. Anstead, J. R. Graybill, J. Reynes, D. Ward, R. Hare, N. Boparai, and R. Isaacs.** 2007. Posaconazole for the treatment of azole-refractory oropharyngeal and esophageal candidiasis in subjects with HIV infection. *Clin Infect Dis* **44**:607-14.
196. **Soczo, G., G. Kardos, I. Varga, B. Kelentey, R. Gesztelyi, and L. Majoros.** 2007. In vitro study of *Candida tropicalis* isolates exhibiting paradoxical growth in the presence of high concentrations of caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:4474-6.
197. **Sokol-Anderson, M., J. E. Sligh, Jr., S. Elberg, J. Brajtburg, G. S. Kobayashi, and G. Medoff.** 1988. Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* **32**:702-5.
198. **Sokol-Anderson, M. L., J. Brajtburg, and G. Medoff.** 1986. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J Infect Dis* **154**:76-83.
199. **Stevens, D. A., M. Espiritu, and R. Parmar.** 2004. Paradoxical effect of caspofungin: reduced activity against *Candida albicans* at high drug concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3407-11.
200. **Stevens, D. A., M. Ichinomiya, Y. Koshi, and H. Horiuchi.** 2006. Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for beta-1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3160-1.
201. **Stevens, D. A., T. C. White, D. S. Perlin, and C. P. Selitrennikoff.** 2005. Studies of the paradoxical effect of caspofungin at high drug concentrations. *Diagn Microbiol Infect Dis* **51**:173-8.
202. **Suarez, A., L. Otero, C. A. Navascues, M. T. Menendez, F. J. Roman, R. Garcia, C. Saro, and A. Rodriguez.** 1994. [Ascitic peritonitis due to *Candida albicans*]. *Rev Esp Enferm Dig* **86**:691-3.
203. **Swinne, D., M. Watelle, C. Suetens, K. Mertens, P. A. Fonteyne, and N. Nolard.** 2004. A one-year survey of candidemia in Belgium in 2002. *Epidemiol Infect* **132**:1175-80.
204. **Taur, Y., N. Cohen, S. Dubnow, A. Paskovaty, and S. K. Seo.** 2010. Effect of antifungal therapy timing on mortality in cancer patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:184-90.
205. **Tavanti, A., A. D. Davidson, N. A. Gow, M. C. Maiden, and F. C. Odds.** 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* **43**:284-92.
206. **Thompson, G. R., 3rd, N. P. Wiederhold, A. C. Vallor, N. C. Villareal, J. S. Lewis, 2nd, and T. F. Patterson.** 2008. Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for

- invasive candidiasis secondary to *Candida glabrata* infection. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:3783-5.
207. **Valdivieso, M. H., L. Ferrario, M. Vai, A. Duran, and L. Popolo.** 2000. Chitin synthesis in a *gas1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **182**:4752-7.
208. **van Hal, S. J., D. J. Marriott, S. C. Chen, Q. Nguyen, T. C. Sorrell, D. H. Ellis, and M. A. Slavin.** 2009. Candidemia following solid organ transplantation in the era of antifungal prophylaxis: the Australian experience. *Transpl Infect Dis* **11**:122-7.
209. **Vandeputte, P., G. Larcher, T. Berges, G. Renier, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2005. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4608-15.
210. **Vandeputte, P., G. Tronchin, T. Berges, C. Hennequin, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2007. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the ERG6 gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:982-90.
211. **Vandeputte, P., G. Tronchin, G. Larcher, E. Ernoult, T. Berges, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2008. A nonsense mutation in the ERG6 gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:3701-9.
212. **Varga, I., G. Soczo, G. Kardos, A. Kemeny-Beke, B. Kelentey, I. Marton, and L. Majoros.** 2009. Difference in killing activity of caspofungin and paradoxical growth between *Candida albicans* and *C. krusei* clinical isolates in different media. *J Chemother* **21**:36-41.
213. **Vazquez, J. A.** 2005. Anidulafungin: a new echinocandin with a novel profile. *Clin Ther* **27**:657-73.
214. **Vazquez, J. A.** 2007. Posaconazole for the management of mucosal candidiasis. *Future Microbiol* **2**:245-56.
215. **Vehreschild, J. J., M. J. Ruping, H. Wisplinghoff, F. Farowski, A. Steinbach, R. Sims, A. Stollorz, K. A. Kreuzer, M. Hallek, C. Bangard, and O. A. Cornely.** 2010. Clinical effectiveness of posaconazole prophylaxis in patients with acute myelogenous leukaemia (AML): a 6 year experience of the Cologne AML cohort. *J Antimicrob Chemother* **65**:1466-71.
216. **Vincent, J. L., E. Anaissie, H. Bruining, W. Demajo, M. el-Ebiary, J. Haber, Y. Hiramatsu, G. Nitenberg, P. O. Nystrom, D. Pittet, T. Rogers, P. Sandven, G. Sganga, M. D. Schaller, and J. Solomkin.** 1998. Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic *Candida* infection in surgical patients under intensive care. *Intensive Care Med* **24**:206-16.
217. **von Mach, M. A., J. Burhenne, and L. S. Weilemann.** 2006. Accumulation of the solvent vehicle sulphobutylether beta cyclodextrin sodium in critically ill patients treated with intravenous voriconazole under renal replacement therapy. *BMC Clin Pharmacol* **6**:6.
218. **Walker, L. A., N. A. Gow, and C. A. Munro.** 2010. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol* **47**:117-26.
219. **Walker, L. A., C. A. Munro, I. de Bruijn, M. D. Lenardon, A. McKinnon, and N. A. Gow.** 2008. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog* **4**:e1000040.
220. **Walsh, T. J., E. J. Anaissie, D. W. Denning, R. Herbrecht, D. P. Kontoyiannis, K. A. Marr, V. A. Morrison, B. H. Segal, W. J. Steinbach, D. A. Stevens, J. A. van Burik, J. R. Wingard, and T. F. Patterson.** 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **46**:327-60.
221. **Walsh, T. J., J. W. Hiemenz, N. L. Seibel, J. R. Perfect, G. Horwith, L. Lee, J. L. Silber, M. J. DiNubile, A. Reboli, E. Bow, J. Lister, and E. J. Anaissie.** 1998. Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of safety and efficacy in 556 cases. *Clin Infect Dis* **26**:1383-96.
222. **Walsh, T. J., P. Pappas, D. J. Winston, H. M. Lazarus, F. Petersen, J. Raffalli, S. Yanovich, P. Stiff, R. Greenberg, G. Donowitz, M. Schuster, A. Reboli, J. Wingard, C. Arndt, J. Reinhardt, S. Hadley, R. Finberg, M. Laverdiere, J. Perfect, G. Garber, G. Fioritoni, E. Anaissie, and J. Lee.** 2002. Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *N Engl J Med* **346**:225-34.
223. **White, T. C.** 1997. Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:1482-7.
224. **White, T. C., S. Holleman, F. Dy, L. F. Mirels, and D. A. Stevens.** 2002. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1704-13.

225. **Wiederhold, N. P., D. P. Kontoyiannis, R. A. Prince, and R. E. Lewis.** 2005. Attenuation of the activity of caspofungin at high concentrations against candida albicans: possible role of cell wall integrity and calcineurin pathways. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:5146-8.
226. **Wingard, J. R.** 2002. Lipid formulations of amphotericins: are you a lumper or a splitter? *Clin Infect Dis* **35**:891-5.
227. **Wisplinghoff, H., T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel, and M. B. Edmond.** 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **39**:309-17.
228. **Young, L. Y., C. M. Hull, and J. Heitman.** 2003. Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2717-24.
229. **Zaoutis, T. E., E. Foraker, K. L. McGowan, J. Mortensen, J. Campos, T. J. Walsh, and J. D. Klein.** 2005. Antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric patients: a survey of 4 children's hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* **52**:295-8.
230. **Zhao, C., U. S. Jung, P. Garrett-Engele, T. Roe, M. S. Cyert, and D. E. Levin.** 1998. Temperature-induced expression of yeast FKS2 is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol Cell Biol* **18**:1013-22.
231. **Zilberberg, M. D., M. H. Kollef, H. Arnold, A. Labelle, S. T. Micek, S. Kothari, and A. F. Shorr.** 2010. Inappropriate empiric antifungal therapy for candidemia in the ICU and hospital resource utilization: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis* **10**:150.
232. **Zilberberg, M. D., and A. F. Shorr.** 2009. Fungal infections in the ICU. *Infect Dis Clin North Am* **23**:625-42.
233. **Zilberberg, M. D., A. F. Shorr, and M. H. Kollef.** 2008. Growth and geographic variation in hospitalizations with resistant infections, United States, 2000-2005. *Emerg Infect Dis* **14**:1756-8.

8.0 ANEXOS

ANEXO I



São Paulo, 9 de novembro de 2007.

CEP 1788/07

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) FERNANDO CÉSAR BIZERRA

Co-Investigadores: Analy Salles de ^a Melo; Arnaldo Lopes Colombo; Helio K. Takahashi e Edna F. Haapalainen

Disciplina/Departamento: Depto de Medicina / Disc de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “**Estudo do efeito paradoxal das equinocandinas em células planctônicas e de biofilme de candida spp**”.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: EXPERIMENTAL - CATEGORIA A.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: NÃO SE APLICA.

OBJETIVOS: O objetivo do estudo será analisar o comportamento das células planctônicas e de biofilme que apresentarem EP durante teste de susceptibilidade convencional, ensaio de concentração fungicida mínima e curva de tempo de morte..

RESUMO: Inicialmente serão utilizados 20 isolados de Candida albicans, tropicalis, 20 C. parapsilosis e 14 de C. orthopsilosis armazenados no Banco de Microorganismos do Laboratório Especial de Micologia. Os isolados serão submetidos inicialmente ao teste de susceptibilidade às equinocandinas, segundo metodologia do CLSI, técnica de microdiluição em caldo, para verificação de EP. As drogas utilizadas serão fornecidas pelo fabricante. Os mesmos isolados serão submetidos ao teste de susceptibilidade do biofilme às equinocandinas, através do ensaio de redução do XTT, metodologia já padronizada no laboratório onde o estudo será desenvolvido. Após esses testes, serão isolados 2 de cada espécie para aplicação das demais metodologias. Será utilizada técnica de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura para analisar as alterações ultraestruturais das células EP..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo bem fundamentado que contribuirá com a compreensão da relevância biológica do EP durante a exposição de Candida spp às equinocandinas e a possível consequência deste efeito frente as estratégias terapêuticas adotadas..

MATERIAL E MÉTODO: Materiais e métodos adequadamente descritos.

CRONOGRAMA: 36 MESES.

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **8/11/2008 e 8/11/2009.**



O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

CEP 1788/07

ANEXO II

Changes in Cell Wall Synthesis and Ultrastructure during Paradoxical Growth Effect of Caspofungin on Four Different *Candida* Species[▽]

Fernando C. Bizerra,¹ Analy S. A. Melo,¹ Eduardo Katchburian,² Edna Freymüller,³ Anita H. Straus,⁴ Hélio K. Takahashi,⁴ and Arnaldo L. Colombo^{1*}

Division of Infectious Diseases,¹ Department of Morphology,² Electron Microscopy Center,³ and Department of Biochemistry,⁴ Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

Received 7 May 2010/Returned for modification 12 June 2010/Accepted 28 October 2010

Paradoxical growth (PG) has been described for echinocandins and is characterized by cell growth at drug concentrations above the MIC. In this study, two isolates each of *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis*, all of which displaying PG in response to caspofungin, were subjected to MIC, minimal fungicidal concentration (MFC), and time-kill curve assays to evaluate the levels of PG. Cell wall components and ultrastructural modifications of the PG cells were also investigated. The results showed that when cell growth and survival were evaluated by MFC or time-kill curve assays, high concentrations of caspofungin did not show fungicidal activity against PG cells. Furthermore, for *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis*, time-kill curves were more discriminatory than MFCs in detecting the PG effect. The four different *Candida* species studied demonstrated similar alterations in cell wall components and ultrastructure associated with PG. In PG cells, β -1,3-glucan content decreased from 2.7- to 7.8-fold, whereas chitin content increased from 4.0- to 6.6-fold. An electron microscopy study of the PG cells revealed morphological alterations, clumping of cells, enlarged cells, the absence of filamentation, abnormal septa, and accumulation of chitin in the cell wall. Also, PG cells basically exhibited a single dark high-density layer in the cell wall, indicating the loss of the β -1,3-glucan layer. Our results present novel details about the ultrastructural alterations that occur in *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. tropicalis* during PG and show that chitin is the major component of the cell walls of PG cells. Stimulation of chitin synthesis may represent a rescue mechanism against caspofungin activity.

Fn1 Caspofungin (CAS), the first echinocandin to be commercialized worldwide, exerts its antifungal effect by blocking the Fks1 subunit of glucan synthase, the enzyme responsible for β -1,3-glucan biosynthesis (12, 13, 20). *Candida* isolates are generally susceptible, *in vitro* and *in vivo*, to low concentrations of CAS, typically exhibiting MICs of ≤ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (29). An exception is *Candida parapsilosis*, which generally shows MIC₉₀ values ranging from 0.5 to 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (18, 30) when tested by broth microdilution assay, according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (10). CAS is therefore considered to be fungicidal to most *Candida* species, with some exceptions, including *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* strains, as both of which generate higher MIC and minimal fungicidal concentration (MFC) values (3).

Although CAS shows excellent growth-inhibitory activity at low concentrations, paradoxical growth (PG) in the presence of this compound has been observed in *Candida* spp. PG has been described as cell growth in the presence of CAS concentrations that are at least two concentrations above the MIC in broth microdilution susceptibility tests, performed according to CLSI guidelines (7, 22, 34). Unlike trailing growth, in which reduced but persistent cell growth at all drug concentrations above the MIC is observed, PG is defined as a resurgence of

growth in the presence of supra-MICs of a drug; such growth is often close to the levels achieved in the absence of drug (22).

Studies describing PG in *Candida* spp. have demonstrated that there are differences in the frequency of PG *in vitro* that are echinocandin specific and *Candida* species related (7, 15, 37). Despite the fact that PG occurs in the presence of high concentrations of echinocandins, it has been shown that this phenomenon is not due to the selection of a resistant subpopulation but, in part, to compensatory mechanisms of synthesis of cell wall components (35, 38).

The clinical relevance of PG has not yet been fully determined. Data obtained using animal models are still rare and controversial (9). Interestingly, a randomized comparative study of the use of two micafungin dosages to treat patients with candidemia reported that patients with persistently positive blood cultures were more frequently observed in a group treated with 150 mg/day micafungin (23 patients; 11.6%) than those observed in a group treated with 100 mg/day micafungin (11 patients; 5.8%). The average time to register the first negative blood culture for *Candida* was 2 days for the group treated with 100 mg/day micafungin and 3 days for the group treated with 150 mg/day of the compound (28).

The occurrence of PG after exposure to echinocandins has been characterized mostly with *C. albicans* strains (35); thus, it is not clear whether the physiological and morphological adaptations described may be applied to other *Candida* species. The aim of this study is to characterize the morphological and biochemical features related to PG in the following four different *Candida* species: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. tropicalis*.

* Corresponding author. Mailing address: Laboratório Especial de Micologia, Universidade Federal de São Paulo, Rua Dr. Diogo de Faria 822, CEP 04037-002, São Paulo, SP, Brazil. Phone and fax: 55-11-50813240. E-mail: arnaldolcolombo@gmail.com.

[▽] Published ahead of print on ●●●●●●●●.

MATERIALS AND METHODS

Isolates. PG was screened using the broth microdilution method by testing 77 *Candida* bloodstream isolates randomly selected from yeast stock cultures from the Laboratório Especial de Micologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil. After being screened, eight *Candida* strains exhibiting PG at approximately 16 µg/ml of caspofungin were selected. These included two strains of *C. albicans*, two strains of *C. orthopsilosis*, two strains of *C. parapsilosis*, and two strains of *C. tropicalis*.

Antifungal susceptibility. Caspofungin (Merck Sharp & Dohme) MICs were determined by microdilution, as described in the CLSI document M27-A3 (10), using RPMI 1640 medium at pH 7.0 buffered with morpholinepropanesulfonic acid (MOPS). MIC endpoints were determined after 24 h based on a prominent decrease in growth compared to that of the drug-free growth control. Following the recommendations of the CLSI guidelines, *C. krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 were used as control strains and were included in each day of testing. The final CAS concentrations ranged from 0.125 to 64.0 µg/ml. In this assay, PG was defined as growth resurgence in the presence of drug at least two dilutions above the MIC.

MFC. After MIC readings, 100-µl samples above the MIC from each well were withdrawn and plated in triplicate onto 90-mm Sabouraud dextrose agar (SDA) plates. The inoculated plates were incubated at 35°C, and MFC were recorded after 48 h. The MFC was defined as the lowest concentration of drug that reduced the size of the initial inoculum by at least 99%, as adapted from Barchiesi et al. (2).

Time-kill curve (TKC). This methodology was adapted from Barchiesi et al. (3). The isolates were subcultured twice and grown for 24 h at 35°C on SDA plates. Three to five colonies of each strain were suspended in 10 ml of sterile distilled water, and the turbidity was adjusted spectrophotometrically to that of a 0.5 McFarland standard (approximately 1×10^6 to 5×10^6 CFU/ml). One milliliter of adjusted fungal suspension was added to 9 ml of RPMI 1640 medium buffered with MOPS plus an appropriate amount of CAS. For *C. albicans* and *C. tropicalis*, CAS was used at concentrations of 0.25, 0.5, 2.0, 16.0, and 32.0 µg/ml. For *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis*, CAS was used at 0.5, 1.0, 4.0, 16.0, and 32.0 µg/ml. Test solutions were incubated at 35°C, and at predetermined time points (0, 3, 6, 9, 12, 24, and 48 h), 100-µl aliquots were removed from each test solution. After 10-fold serial dilutions, a 100-µl aliquot from each dilution was streaked, in triplicate, onto Sabouraud dextrose agar plates for colony count determination after incubation at 35°C for 48 h. Fungicidal activity was considered to be achieved when the number of CFU/ml was reduced by >99% compared to that of the initial inoculum.

Cell wall isolation and carbohydrate composition analysis. *Candida* cells obtained from 24-h growth in 50 ml of RPMI 1640 medium buffered with MOPS or in the same medium plus 16.0 µg/ml of CAS were used for cell wall component analysis, as described previously (26, 32, 35). The cells were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) and disrupted by >100 cycles of freezing and thawing, followed by agitation with glass beads at 425 to 600 µm in diameter (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MI) until no viable cells could be observed by subculture; disruption was also observed by light microscopy. The cell wall was isolated, dried, lyophilized, and frozen at -80°C. Isolated cell walls were alkali extracted three times for 60 min with 500 µl of 3% NaOH at 75°C. The pellet was washed once with 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) and once more with 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), then digested with 4 mg/ml Zymolyase 100T (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan) in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) overnight at 37°C, and centrifuged for 10 min at 20,000 × g at 4°C. The supernatant was split into two portions. One portion was used for hexose (β-1,3- plus β-1,6-glucan) quantification by the phenol-sulfuric method, as previously described (14, 26, 35), and the other portion was dialyzed against distilled water using a Spectra/Por membrane, with a molecular weight exclusion of 6,000 to 8,000 (Spectrum Medical Industries, Inc., Rancho Dominguez, CA), and its hexose content was measured (β-1,6-glucans, resistant to zymolyase treatment). The β-1,3-glucan value was determined by subtraction of the β-1,6-glucan value from the value representing the combination of β-1,3- plus β-1,6-glucan. Zymolyase-insoluble pellets were washed once with 10 mM Tris-HCl, pH 7.0, and water. The pellets were used for measurement of glucosamine content to determine chitin concentrations (24, 35). The pellets were hydrolyzed with 6 N HCl at 100°C for 6 h, and the hydrolyzates were freed from excess acid by repeated evaporation at reduced pressure. After removal of the acid, the pellets were resuspended in water, and the glucosamine content was measured and compared to a standard curve ranging from 0 to 200 mg of D-glucosamine, as previously described (24).

Microscopic analysis. *Candida* cells obtained from a 24-h culture in RPMI 1640 with 16 µg/ml of CAS or without the drug were used for fluorescent

TABLE 1. Caspofungin MICs and PG patterns of *Candida* strains tested

Species	Strain	CAS MIC (µg/ml)	Drug concn (µg/ml) producing PG
<i>C. albicans</i>	1399	0.5	8.0 and 16.0
	1954	0.25	16.0
<i>C. tropicalis</i>	1507	0.25	8.0 and 16.0
	1490A	0.5	16.0
<i>C. orthopsilosis</i>	1825	1.0	8.0, 16.0, and 32.0
	1238A	1.0	16.0 and 32.0
<i>C. parapsilosis</i>	1856	1.0	16.0 and 32.0
	1529A	1.0	16.0 and 32.0

microscopy, transmission electron microscopy (TEM), and scanning electron microscopy (SEM).

(i) **Fluorescence microscopy.** The methodology used was adapted from that used by Walker et al. (36). Cells were collected by centrifugation, washed with PBS buffer at pH 7.2, and fixed in 10% (vol/vol) neutral buffered formalin (Sigma-Aldrich). Cells were stained with 5 µM calcofluor white (CFW) (Invitrogen, Oregon) at 37°C for 10 min. Aliquots of 10 µl were placed on glass slides and examined using a Olympus IX81 motorized microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with fluorescence. Because CFW bind specifically to chitin, this methodology was used to visualize the chitin in the cell wall. Images were digitally recorded using CellP imaging software and a DP-71 microscope digital camera (Olympus, Tokyo, Japan). Mean fluorescence intensities were calculated for at least 20 individual cells for each condition. The exposure time of fluorescence images was fixed to observe intensity differences between PG and control cells. The mean fluorescence intensities of the control cell and PG cells were compared using the Student *t* test (Microsoft Office Excel 2003). The significance level for the *P* value was considered to be <0.05.

(ii) **SEM.** This methodology was adapted from that used by Bizerra et al. (4). The cells were fixed overnight at 4°C in 2.0% formaldehyde plus 2.5% glutaraldehyde buffered at pH 7.2 with 0.1 M sodium cacodylate. After fixation, small drops of the sample were placed on a specimen support coated with poly-L-lysine. Postfixation was carried out with 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer for 1 h. Samples were then treated with 1% tannic acid for 45 min, washed three times with distilled water for 15 min, and treated again with 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer for 1 h. Dehydration was carried out in a graded series of ethanol. The dehydrated samples were critical-point dried in CO₂, coated with gold, and examined in a Jeol JSM-5300 scanning electron microscope. The perimeter of the cell was measured using CellP imaging software (Olympus, Tokyo, Japan). The mean of the cell perimeter was then calculated for at least 20 individual cells from each experimental condition. The perimeter values of control and PG cells were compared using the Student *t* test (Microsoft Office Excel 2003). The significance level for the *P* value was considered to be <0.05.

(iii) **TEM.** Initially, cells were washed in PBS and fixed overnight at 4°C with 2.0% formaldehyde plus 2.5% glutaraldehyde buffered at pH 7.2 with 0.1 M sodium cacodylate. The fixed cells were postfixed in 1% osmium tetroxide for 1 h at room temperature. After dehydration in a graded series of ethanol and treatment with propylene oxide, the cells were embedded in Epon resin. Ultrathin sections (60 nm) were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined using a transmission electron microscope (Jeol JEM-1200EX II).

RESULTS

CAS susceptibility and PG effect. Of the 77 *Candida* bloodstream isolates initially screened, 42 isolates (54.5%) displayed the phenomenon of PG in the susceptibility test using caspofungin. Of the 42 isolates, two from each species (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis*) were selected for additional tests. CAS MICs generated by the broth microdilution assay were <2.0 µg/ml for the eight selected isolates (Table 1). It should be noted that the *C. albicans* and *C.* **TI**

TABLE 2. Growth distribution of *Candida* isolates in MFC tests at different CAS concentrations after 24 h of incubation in RPMI 1640

Isolate	Growth at indicated CAS concn (µg/ml) ^a									
	0.12	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	16	32	64
<i>C. albicans</i> 1399	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>C. albicans</i> 1954	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>C. tropicalis</i> 1490A	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>C. tropicalis</i> 1507	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>C. orthopsilosis</i> 1238A	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>C. orthopsilosis</i> 1825	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis</i> 1529A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis</i> 1856	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

^a +, cell growth; -, growth inhibition (fungicidal activity).

tropicalis strains showed MIC values between 0.25 and 0.5 µg/ml of CAS, whereas *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis* isolates showed MIC values of 1.0 µg/ml of CAS. The appearance of PG was confirmed in all eight selected isolates at CAS concentrations ranging from 8.0 to 32.0 µg/ml. Because all isolates showed PG at 16 µg/ml CAS (Table 1), this concentration was chosen for all subsequent experiments, including electron microscopy, fluorescence microscopy, and cell wall composition analysis.

MFC. The MFC was used to test the fungicidal activity of CAS and to confirm PG in the selected isolates. CAS showed fungicidal activity against the *C. albicans* and *C. tropicalis* strains at lower concentrations than those needed to show fungicidal activity against the other two strains. Table 2 shows that, in *C. albicans* and *C. tropicalis*, PG was detected at CAS concentrations of between 8 and 32 µg/ml; the highest of these concentrations is at least three drug dilutions above the MFC. Against *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis* isolates (with the exception of the *C. orthopsilosis* 1238A isolate) CAS was only fungistatic; MFC was unable to detect PG in these strains (Table 2).

TKCs. TKCs confirmed the occurrence of PG in all eight isolates tested (Fig. 1); however, some differences were observed among the strains tested. *C. albicans* and *C. tropicalis* strains showed similar patterns of TKCs in which the PG effect was characterized by fungicidal activity at low concentrations of CAS (0.25, 0.5, and 2.0 µg/ml) and fungistatic activity at the highest concentration (16.0 µg/ml). On the other hand, CAS at concentrations ranging from 0.25 to 32 µg/ml had only fungistatic activity on *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis* isolates, although an exception worth noting is the *C. orthopsilosis* 1238A isolate, which was killed at lower concentrations of CAS (2.0 and 4.0 µg/ml). In agreement with the MFC assay results, the TKC results showed that the PG effect occurred at concentrations ranging from 16 to 32 µg/ml. At drug concentrations that induced PG, a decrease in the CFU count was observed at early incubation times (3 to 6 h), followed by an increase in the CFU count at later incubation times (9 to 48 h). A concentration of 16 µg/ml CAS proved to be the most effective for producing the PG effect.

Alterations of cell wall components. When cultivated in the presence of 16 µg/ml CAS, all *Candida* species analyzed showed similar cell wall chitin and glucan composition. Cells cultivated under these conditions showed a significant decrease in the total amount of cell wall glucan content (Fig. 2A) and a

sharp decrease in the content of β-1,3-glucans (Fig. 2B). An increase in total chitin content was detected in all *Candida* species (Fig. 2C). Figure 2D shows that treatment of *Candida* species with CAS led to a decrease of 2.9- to 5.0-fold in β-1,3-plus β-1,6-glucan, a decrease of 2.7- to 7.8-fold in β-1,3-glucans alone, and an increase of 4.0- to 6.6-fold in chitin.

Microscopic analysis. (i) Fluorescence microscopy. Figure 3 shows fluorescent micrographs of untreated and PG cells of *C. albicans* strain 1399 after 24 h of incubation. Because CFW binds specifically to chitin, the intensity of CFW fluorescence of cells was comparable to the results of chitin content determined by our assays of cell wall biochemistry. Control cells exhibited particularly intense fluorescence layered between mother cells and buds, with a more homogeneous and less intense fluorescent signal along the remaining surface of the cell. Compared to untreated cells, PG cells showed a more heterogeneous and intense fluorescence around the entire cell surface, with some regions exhibiting excess chitin, as shown by accumulation of fluorescence intensity (Fig. 3).

(ii) SEM. As shown in Fig. 4, PG cells exhibited morphological abnormalities that included (i) budding cells without clear rings around the constrictions between mother and daughter cells, (ii) enlarged yeasts forming clumps, and (iii) the absence of filamentation. These changes were similarly found in the four *Candida* species studied. Control cells showed a normal elliptical shape, budding cells with clear constriction rings, and the presence of filamentation. Determination of the size of the cell perimeter confirmed the differences between control and PG cells of *C. albicans* (10.86 ± 1.41 and 21.21 ± 3.57 µm, respectively), *C. tropicalis* (10.76 ± 1.34 and 15.92 ± 2.28 µm, respectively), *C. orthopsilosis* (8.32 ± 1.32 and 13.21 ± 1.66 µm, respectively), and *C. parapsilosis* (8.59 ± 1.39 and 10.54 ± 1.22 µm, respectively). In all cases, the differences were statistically significant ($P < 0.001$). The average perimeter size of control cells of all *Candida* species was 9.56 ± 1.83 µm, whereas PG cells showed an average perimeter size of 15.22 ± 4.56 µm ($P < 0.001$).

(iii) TEM. The morphological changes observed in PG cells by TEM are related mainly to the cell wall structure and formation of the budding septa (Fig. 5). An abnormal thickness of the septum was observed between mother and daughter cells, with no clear separation between the cells (Fig. 5B and F, black arrows). The cell walls of control and PG cells presented remarkable differences in morphology (Fig. 5). By means of conventional TEM, we observed that control cells exhibited a

T2

F1

F2

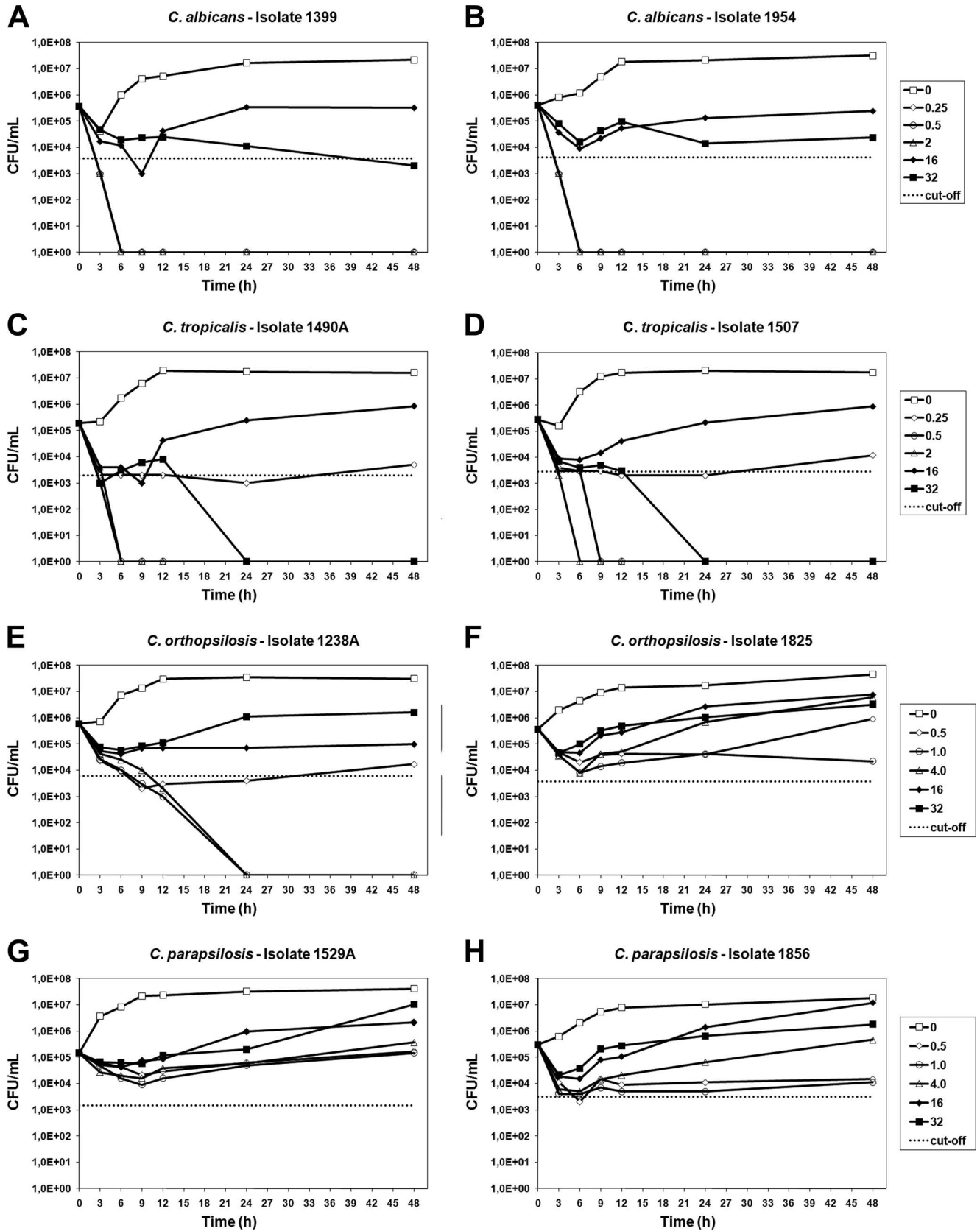


FIG. 1. Time-kill curves of all tested *Candida* isolates: *C. albicans* (A and B), *C. tropicalis* (C and D), *C. orthopsilosis* (E and F), and *C. parapsilosis* (G and H). CAS concentrations used for each species are shown in the respective graphs. The dotted lines represent a >99% growth reduction compared with the initial inoculum sizes (fungicidal activities).

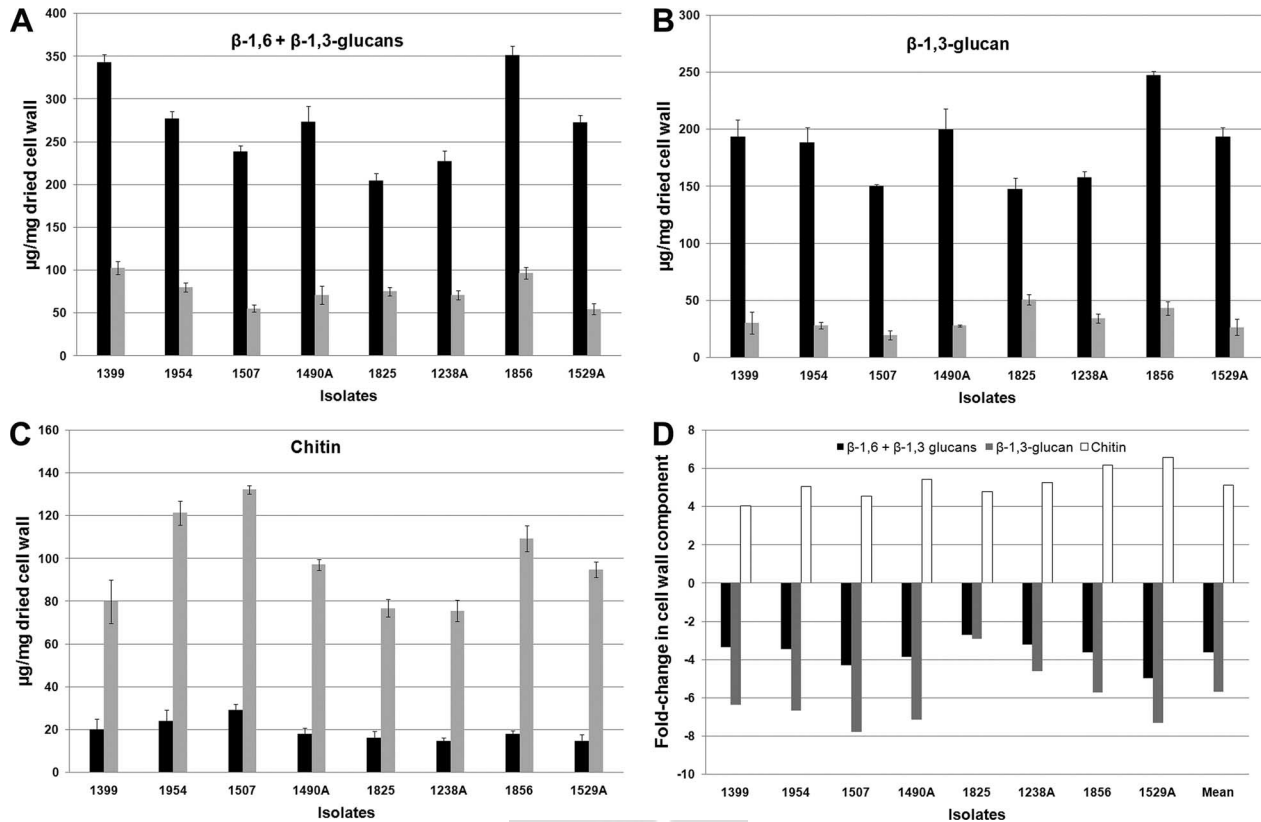


FIG. 2. Cell wall components of control and PG cells. (A to C) The absolute values of β-1,6- plus β-1,3-glucan (A), β-1,3-glucan (B), and chitin (C) of the control and PG cells (black and gray bars, respectively) were expressed as the number of micrograms of carbohydrate per milligram of dried cell wall. (D) The graph represents the fold change in β-1,6- plus β-1,3-glucan (black), β-1,3-glucan (gray), and chitin (white) contents of PG cells compared to those of control cells.

cell wall with two layers: (i) an electron-dense outer layer and (ii) an inner layer of low electron density, continuous with the plasma membrane (Fig. 5I). In PG cells, a decrease in the thickness of the inner layer of the cell wall was observed, with a predominance of the more-electron-dense layer (Fig. 5B, D,

F, H, and J, white arrows). Some PG cells showed what seemed to be multilayered cell walls or a focal enlargement of the cell walls (Fig. 5D and H, black arrowheads, respectively).

DISCUSSION

Echinocandins have remarkable *in vitro* activity against *Candida* spp., including azole-resistant isolates (11, 23, 31). However, the emergence of echinocandin resistance during treatment of *Candida* infections has been reported, and such resistance is mostly due to mutations in the *FKS1* gene (1, 8, 16, 17, 19).

In addition to the possibility that *Candida* may acquire resistance to echinocandins both *in vitro* and *in vivo* by mutation, it has been shown that PG is not an uncommon phenomenon in *Candida* isolates (5, 7, 15, 33). Melo et al. (22) studied the PG of a number of *Candida* species in the presence of CAS, reporting PG frequencies of 83%, 43%, 37.5%, and 25% for *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. albicans*, respectively, in the presence of the drug. Chamilos et al. (7) observed that, when cells were grown in the presence of CAS, the prevalence of PG was 90%, 60%, and 40% for *C. parapsilosis*, *C. albicans*, and *C. tropicalis*, respectively.

PG has been demonstrated by other authors using a variety of assays, particularly broth microdilution tests for detecting MICs and MFCs of echinocandins against *Can-*

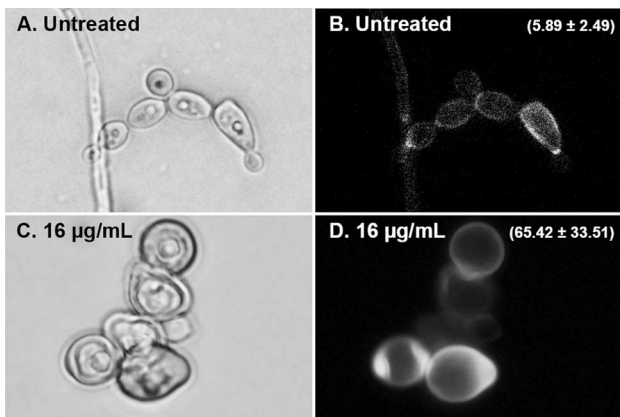


FIG. 3. Fluorescence microscopy of *C. albicans* 1399 control (A and B) and PG (C and D) cells stained with calcofluor white (CFW). The value (mean ± standard deviation) of the CFW fluorescence intensity is related to the chitin content of the cell wall (B and D). PG cells showed regions exhibiting the accumulation of chitin and higher fluorescence intensity values than those of control cells ($P < 0.05$).

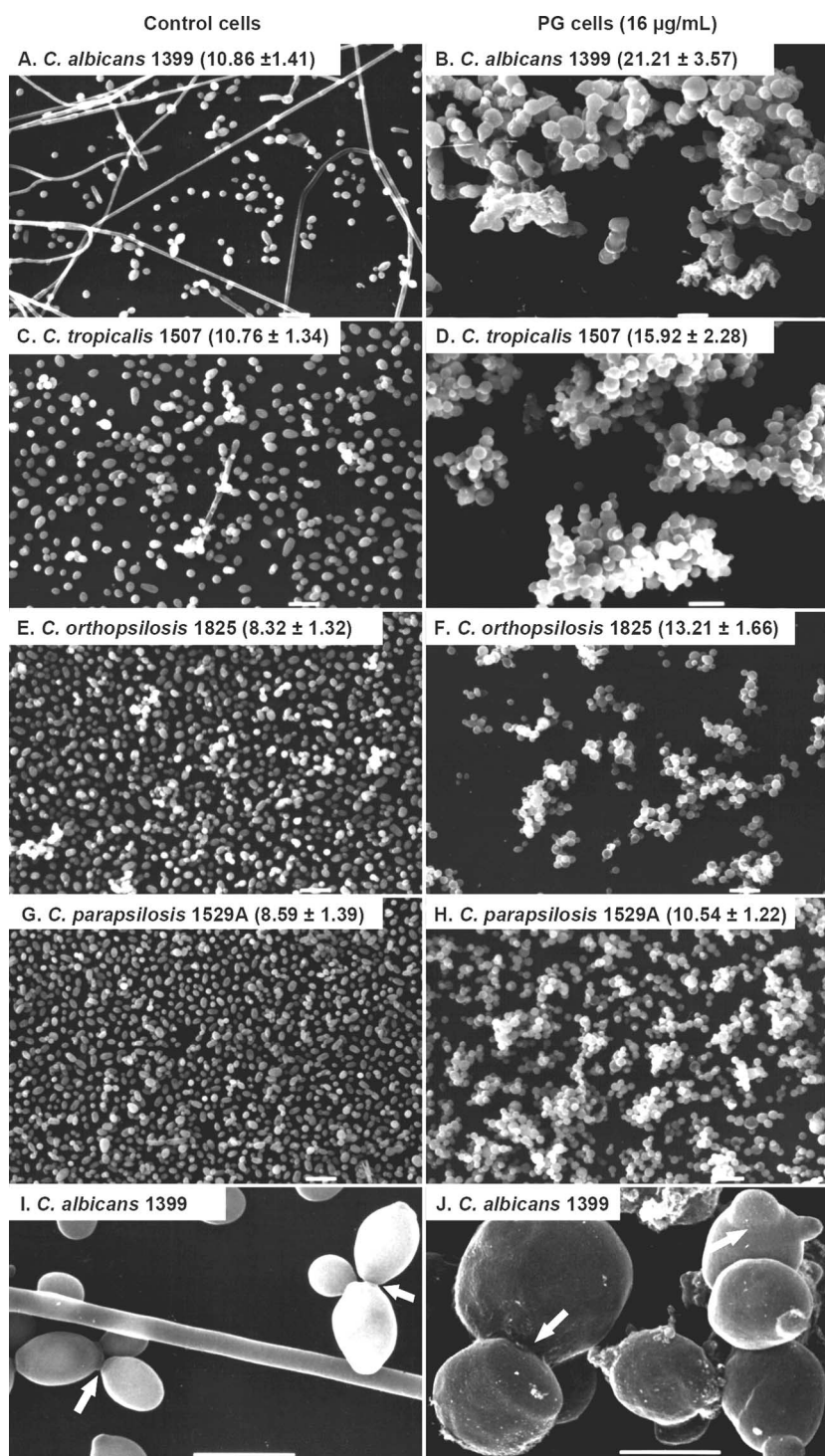


FIG. 4. Scanning electron micrographs of *Candida* strains, comparing control cells and PG cells grown with 16 µg/ml of CAS. The values represent the perimeters of cells (in µm; mean ± standard deviation). PG cells were larger in size than control cells ($P < 0.01$). Panels I and J show higher magnifications of panels A and B, respectively; the ring around the constriction between mother cell and bud was noted only in control cells (arrows). Scale bars, 10 µm (A to H) and 5 µm (I and J).

didia spp. (7, 15, 22). Soczo et al. (33) reported that for *C. tropicalis* isolates, PG in CAS was more frequently observed using MFC assays (93%) than MIC tests (13%). In our study, MFC assays were helpful in identifying PG for only

the *C. albicans* and *C. tropicalis* isolates. Considering that CAS is usually fungistatic against *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis* strains (3), time-kill curves were more appropriate than MFC assays for identifying PG of *Candida*

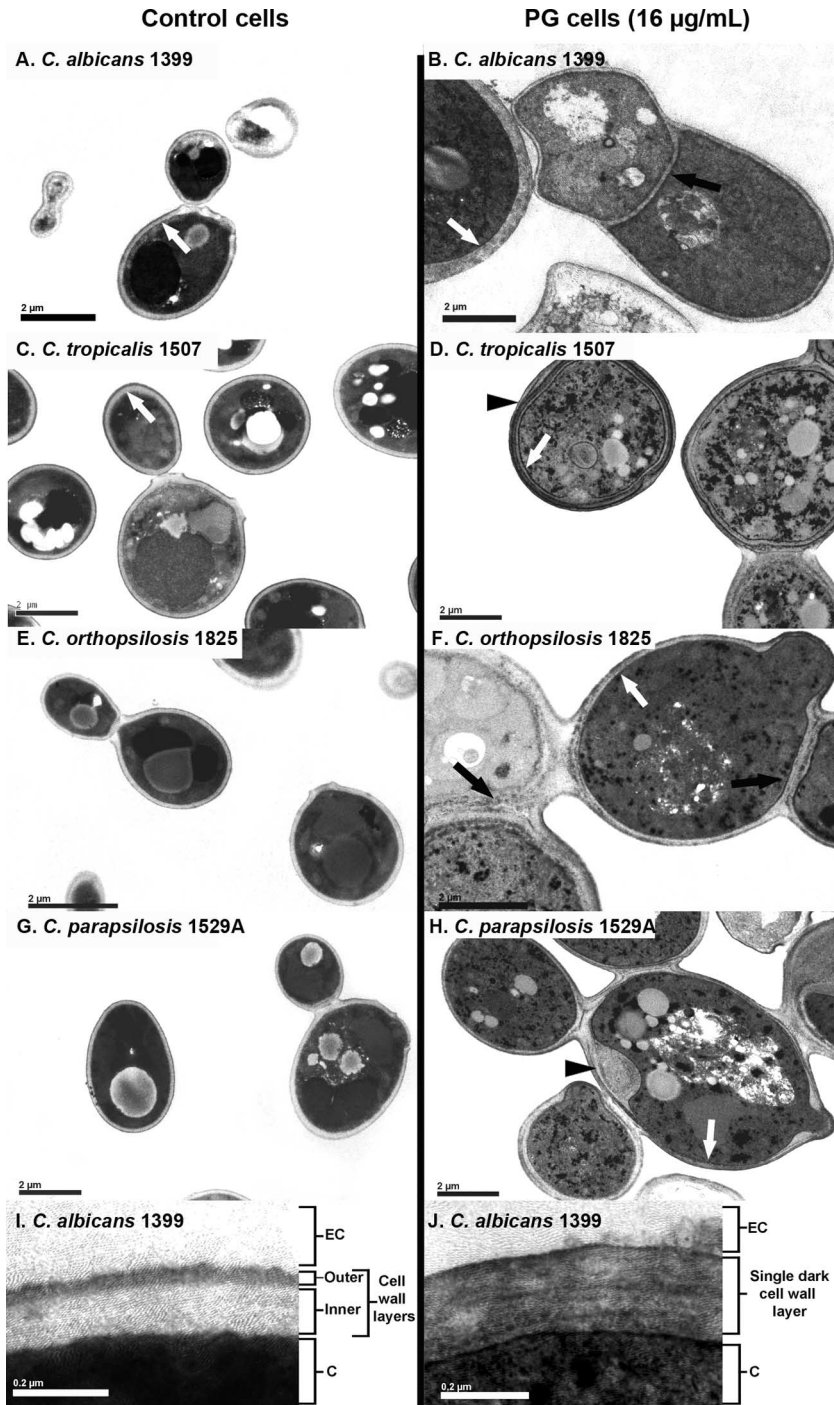


FIG. 5. Transmission electron micrographs of *Candida* strains, comparing control cells and PG cells grown with 16 µg/ml of CAS. Black arrows indicate the abnormal septa in PG cells. White arrows show the cell walls of control cells, which exhibited two layers, with a predominance of the more-electron-dense layer in PG cells. Black arrowheads show a multilayered cell wall (D) and a focal enlargement of the cell wall (H) in PG cells. Panels I and J show higher-magnification electron micrographs of control and PG cells, respectively. (I) As described above, control cells exhibited cell walls with two layers, an electron-dense outer layer and an inner layer of low electron density. (J) In PG cells, a decrease of inner cell wall layers and a predominance of the more-electron-dense layers were observed. EC, extracellular environment; C, cytosol. Scale bars, 2 µm (A to H) and 0.2 µm (I and J).

strains in the presence of high concentrations of CAS, especially for *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis* isolates.

Previous reports on the PG effect in the presence of echinocandins have focused on differences among *C. albicans*

strains. In this study, we have described the ultrastructural and cell wall biochemical changes that occur in isolates representative of four clinically relevant *Candida* species, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis*, during PG in-

duced by high concentrations of CAS. Our results allow us to conclude that PG of non-*albicans* *Candida* strains induces the same ultrastructural and biochemical pattern of cell wall changes as that in *C. albicans* isolates. PG cells exhibited a significant decrease in β -1,3-glucan content (from 2.7-fold to 7.8-fold) and a substantial increase in chitin content (from 4.0-fold to 6.6-fold) of the cell wall, regardless of the type of *Candida* species considered.

With respect to the ultrastructure of PG cells, non-*albicans* *Candida* species and *C. albicans* strains displayed similar morphology, including enlarged blastospores, clumping of cells, the absence of filamentation, and abnormalities in constriction rings between mother and daughter cells. In the cell wall, untreated cells clearly exhibited two different layers, an outer cell wall layer with high electron density and an inner layer that is less electron dense. PG cells showed a decrease in the inner cell wall layer, which according to Chaffin et al. (6), is composed of β -1,3-glucan. Similar results were described by Nishiyama et al. (27) when testing micafungin against *C. albicans* strains. It is therefore reasonable to suppose that the observed reduction in the inner cell wall layer is related to the inhibition of β -1,3-glucan synthesis caused by exposition to echinocandins. Our conclusions are supported by fluorescence microscopy analysis of cell walls stained with CFW, in which control cells presented less intense fluorescence and PG cells showed a strong fluorescence with CFW. These data clearly indicate that β -1,3-glucan is replaced by chitin in PG cells.

Munro et al. (25) demonstrated that chitin synthesis is up-regulated under conditions in which the integrity of the cell wall is compromised by antifungal treatments. Walker et al. (36) showed that low levels of echinocandins stimulated chitin synthase (CHS) gene expression. Thus, the production of high levels of chitin seems to reduce the efficacy of echinocandins. It is therefore suggested that an increase in chitin synthesis during CAS treatment may play a key role in mediating resistance to echinocandins.

It is not yet fully understood whether the morphological and biochemical modifications exhibited by PG cells confer a fitness disadvantage or contribute to antifungal therapy failure during treatment with high doses of echinocandin. It is well known that β -1,3-glucan plays a critical role in the maintenance of cell shape, mechanical rigidity, and resistance to osmotic pressure (6). The reduction in β -1,3-glucan observed in PG cells suggests that PG cells are osmotically fragile, resulting in morphological alteration; this could possibly lead to a fitness disadvantage for these cells. Moreover, it is known that in yeast, virulence factors are expressed mainly during filamentous growth stages. Because PG cells do not present a filamentous form, this could justify a decrease in virulence factor expression and a consequent loss of infectivity in these cells.

The clinical significance of the occurrence of PG during echinocandin therapy is not well understood. Although animal models have failed to demonstrate PG in murine models of systemic *Candida* infection (9, 21), these data require further detailed analysis. It is worth mentioning that a randomized comparative study of two different micafungin dosages conducted by Pappas et al. (28) clearly demonstrated that candidemic patients treated with high doses of micafungin (150 mg/day) did not show any improvement compared to patients treated with a regular dosage (100 mg/day). Those authors

reported that 14 of 30 patients (47%) with deep-seated infections treated with 150 mg/day micafungin had treatment failure compared to only 6 of 28 patients (21%) in the 100 mg/day micafungin group and suggested that the lower rate of success among patients treated with 150 mg/day micafungin could possibly be explained by the PG effect. Further studies using non-candidemic models will be needed to determine whether PG contributes to human disease *in vivo*.

Although the clinical significance of PG remains unclear, the elucidation of the morphological, biochemical, and molecular pathways underlying this phenomenon is likely to contribute to a better understanding of novel cellular mechanisms that may be involved in rescue against echinocandin antifungal activity.

ACKNOWLEDGMENTS

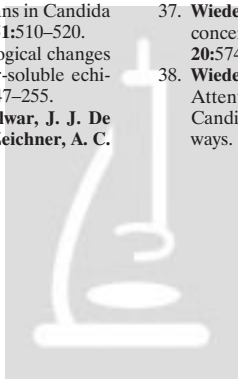
This study was sponsored by the FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil; grant 2007/04925-8). A.L.C. received a grant from CNPq (304802/2007-7).

Casopfungin was kindly provided by Merck Sharp & Dohme.

REFERENCES

- Balashov, S. V., S. Park, and D. S. Perlin. 2006. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug casopfungin in *Candida albicans* by profiling mutations in FKS1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2058–2063.
- Barchiesi, F., E. Spreghini, S. Tomassetti, D. Arzeni, D. Giannini, and G. Scalise. 2005. Comparison of the fungicidal activities of casopfungin and amphotericin B against *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4989–4992.
- Barchiesi, F., E. Spreghini, S. Tomassetti, A. Della Vittoria, D. Arzeni, E. Manso, and G. Scalise. 2006. Effects of casopfungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2719–2727.
- Bizerra, F. C., C. V. Nakamura, C. de Poersch, T. I. Estivalet Svidzinski, R. M. Borsato Quesada, S. Goldenberg, M. A. Krieger, and S. F. Yamada-Ogatta. 2008. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res.* **8**:442–450.
- Canton, E., J. Peman, M. Romero, A. Valentin, and M. Gobernado. 2007. The fungicidal activity and paradoxical effect of casopfungin against yeast. Influence of culture medium and incubation time. *Rev. Esp. Quimioter.* **20**:433–441. (In Spanish.)
- Chaffin, W. L., J. L. Lopez-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo, and J. P. Martinez. 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:130–180.
- Chamilos, G., R. E. Lewis, N. Albert, and D. P. Kontoyiannis. 2007. Paradoxical effect of echinocandins across *Candida* species *in vitro*: evidence for echinocandin-specific and *Candida* species-related differences. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2257–2259.
- Cleary, J. D., G. Garcia-Effron, S. W. Chapman, and D. S. Perlin. 2008. Reduced *Candida glabrata* susceptibility secondary to an FKS1 mutation developed during candidemia treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:2263–2265.
- Clemons, K. V., M. Espiritu, R. Parmar, and D. A. Stevens. 2006. Assessment of the paradoxical effect of casopfungin in therapy of candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1293–1297.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, third ed. Approved standard, M27-A3. CLSI, Wayne, PA.
- da Matta, D. A., L. P. de Almeida, A. M. Machado, A. C. Azevedo, E. J. Kusano, N. F. Travassos, R. Salomao, and A. L. Colombo. 2007. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in Sao Paulo, Brazil, 1995–2003. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **57**:399–404.
- Denning, D. W. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* **362**:1142–1151.
- Douglas, C. M. 2001. Fungal beta(1,3)-D-glucan synthesis. *Med. Mycol.* **39**(Suppl. 1):55–66.
- Dubois, M., K. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1951. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* **168**:167.
- Fleischhacker, M., C. Radecke, B. Schulz, and M. Ruhnke. 2008. Paradoxical growth effects of the echinocandins casopfungin and micafungin, but not of anidulafungin, on clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**:127–131.
- Garcia-Effron, G., D. P. Kontoyiannis, R. E. Lewis, and D. S. Perlin. 2008. Casopfungin-resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematologic malignancies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:4181–4183.

17. **Garcia-Effron, G., S. Park, and D. S. Perlin.** 2009. Correlating echinocandin MIC and kinetic inhibition of fks1 mutant glucan synthases for *Candida albicans*: implications for interpretive breakpoints. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:112–122.
18. **Goncalves, S. S., C. S. Amorim, M. Nucci, A. C. Padovan, M. R. Briones, A. S. Melo, and A. L. Colombo.** 2010. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**:885–887.
19. **Kahn, J. N., G. Garcia-Effron, M. J. Hsu, S. Park, K. A. Marr, and D. S. Perlin.** 2007. Acquired echinocandin resistance in a *Candida krusei* isolate due to modification of glucan synthase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1876–1878.
20. **Letscher-Bru, V., and R. Herbrecht.** 2003. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:513–521.
21. **Marine, M., F. J. Pastor, I. H. Sahand, J. Ponton, G. Quindos, and J. Guarro.** 2009. Paradoxical growth of *Candida dubliniensis* does not preclude in vivo response to echinocandin therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:5297–5299.
22. **Melo, A. S., A. L. Colombo, and B. A. Arthington-Skaggs.** 2007. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:3081–3088.
23. **Messer, S. A., D. J. Diekema, L. Boyken, S. Tendolkar, R. J. Hollis, and M. A. Pfaller.** 2006. Activities of micafungin against 315 invasive clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida* spp. *J. Clin. Microbiol.* **44**:324–326.
24. **Morgan, W. T., and L. A. Elson.** 1934. A colorimetric method for the determination of *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylchondrosamine. *Biochem. J.* **28**:988–995.
25. **Munro, C. A., S. Selvaggini, I. de Bruijn, L. Walker, M. D. Lenardon, B. Gerssen, S. Milne, A. J. Brown, and N. A. Gow.** 2007. The PKC, HOG and Ca²⁺ signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **63**:1399–1413.
26. **Nett, J., L. Lincoln, K. Marchillo, R. Massey, K. Holoyda, B. Hoff, M. VanHandel, and D. Andes.** 2007. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:510–520.
27. **Nishiyama, Y., K. Uchida, and H. Yamaguchi.** 2002. Morphological changes of *Candida albicans* induced by micafungin (FK463), a water-soluble echinocandin-like lipopeptide. *J. Electron Microscop.* (Tokyo) **51**:247–255.
28. **Pappas, P. G., C. M. Rotstein, R. F. Betts, M. Nucci, D. Talwar, J. J. De Waele, J. A. Vazquez, B. F. Dupont, D. L. Horn, L. Ostrosky-Zeichner, A. C. Reboli, B. Suh, R. Digumarti, C. Wu, L. L. Kovanda, L. J. Arnold, and D. N. Buell.** 2007. Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* **45**:883–893.
29. **Pfaller, M. A., L. Boyken, R. J. Hollis, J. Kroeger, S. A. Messer, S. Tendolkar, and D. J. Diekema.** 2008. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J. Clin. Microbiol.* **46**:150–156.
30. **Pfaller, M. A., D. J. Diekema, D. L. Gibbs, V. A. Newell, K. P. Ng, A. Colombo, J. Finkelievich, R. Barnes, and J. Wadula.** 2008. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J. Clin. Microbiol.* **46**:842–849.
31. **Pfaller, M. A., S. A. Messer, L. Boyken, C. Rice, S. Tendolkar, R. J. Hollis, and D. J. Diekema.** 2003. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. *J. Clin. Microbiol.* **41**:5729–5731.
32. **Popolo, L., D. Gilardelli, P. Bonfante, and M. Vai.** 1997. Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggp1delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**:463–469.
33. **Soczko, G., G. Kardos, I. Varga, B. Kelentey, R. Gesztelyi, and L. Majoros.** 2007. In vitro study of *Candida tropicalis* isolates exhibiting paradoxical growth in the presence of high concentrations of caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:4474–4476.
34. **Stevens, D. A., M. Espiritu, and R. Parmar.** 2004. Paradoxical effect of caspofungin: reduced activity against *Candida albicans* at high drug concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3407–3411.
35. **Stevens, D. A., M. Ichinomiya, Y. Koshi, and H. Horiuchi.** 2006. Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for beta-1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:3160–3161.
36. **Walker, L. A., C. A. Munro, I. de Bruijn, M. D. Lenardon, A. McKinnon, and N. A. Gow.** 2008. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog.* **4**:e1000040.
37. **Wiederhold, N. P.** 2007. Attenuation of echinocandin activity at elevated concentrations: a review of the paradoxical effect. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **20**:574–578.
38. **Wiederhold, N. P., D. P. Kontoyiannis, R. A. Prince, and R. E. Lewis.** 2005. Attenuation of the activity of caspofungin at high concentrations against *Candida albicans*: possible role of cell wall integrity and calcineurin pathways. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:5146–5148.



ANEXO III

Original Article

Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex

ANALY S. MELO*, FERNANDO C. BIZERRA*, EDNA FREYMÜLLER†, BETH A. ARTHINGTON-SKAGGS‡ & ARNALDO L. COLOMBO*

*Division of Infectious Diseases, †Electron Microscopy Center, Universidade Federal de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, and ‡Mycotic Diseases Branch, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA

Candida cells can form biofilms that frequently are sources of infections and are less susceptible to antifungal drugs. Some authors have reported that *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* isolates are not able to produce biofilms *in vitro* and there are no studies available on biofilm susceptibility for these species to antifungals. The aims of this study were to (i) quantify *Candida* spp. biofilms *in vitro*, and (ii) test the *in vitro* susceptibilities of *Candida* spp. biofilms to fluconazole (FLC) and amphotericin B (AMB). Isolates studied included four *Candida albicans*, six *C. tropicalis*, seven *C. parapsilosis*, eight *C. orthopsilosis*, and five *C. metapsilosis*. We compared two different methods to evaluate biofilm production, i.e., crystal violet (CV) staining and XTT-reduction assays (XTT). Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe high, medium and low biofilm producing isolates screened by these two methods. To determine the minimum biofilm eradication concentration (MBEC) for FLC and AMB, XTT-reduction assay was used to measure cell metabolic activity. Biofilm quantification by CV and XTT showed that *C. tropicalis* isolates were the highest biofilm producer, followed by *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. Examination of SEM images revealed that the extent of biofilms formed by high, medium, and low producers was highly correlated to the results generated by CV assay. Biofilm of all the isolates evaluated were resistant to FLC (MBEC₈₀ ≥ 256 ug/ml) but, in general, susceptible to AMB, except for six *C. parapsilosis* strains (MBEC₈₀ ≥ 8 ug/ml).

Keywords *Candida* spp., biofilm production and susceptibility, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis*

Introduction

Biofilms represent the most prevalent type of microbial growth in nature and are frequently associated with clinical infections [1–3]. Biofilms are aggregates of microorganisms

that adhere to surfaces and are embedded in exopolymeric matrices [4,5]. Different *Candida* species are able to produce biofilms [6] and these biofilms have markedly enhanced resistance to host defense mechanisms and antifungal drugs currently used to treat candidemia [7–10].

Candidemia is a concern in tertiary care hospitals worldwide due to its high prevalence and associated morbidity, mortality and costs [11,12]. It is estimated that a significant number of episodes of candidemia are related to invasive medical procedures where *Candida* biofilm production is a cornerstone of its pathogenesis [10,13,14]. *Candida* cells can adhere to biomaterials or biological surfaces such as

Received 18 May 2010; Received in final revised form 20 August 2010; Accepted 4 October 2010

Correspondence: Arnaldo L. Colombo, Laboratório Especial de Micologia, Disciplina de Infectologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo-SP, Rua Botucatu, 740, CEP 04023-062 - São Paulo, Brazil. Tel: +55 11 5081 3240; Fax: +55 11 5083 0806; E-mail: arnaldolcolombo@gmail.com

indwelling medical devices and host tissues, to form biofilms that frequently serve as foci for persistent infections [5,13].

While *C. albicans* is the most frequently isolated fungal species from bloodstream infections, other *Candida* species are commonly recovered [15–17]. *Candida parapsilosis* has become the second or third most frequently reported fungus in several studies and has been associated with indwelling catheters and parenteral nutrition as the source of infection [11,15,18,19]. Recently, Tavanti *et al.* [20] used different molecular methods including MLST, ITS sequencing, PCR-RFLP and RAPD, to re-classify the *C. parapsilosis* complex into three distinct species, i.e., *C. parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. Some authors have reported that *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* isolates are not able to produce biofilms *in vitro* [21,22] and as a result, there are no studies available on the susceptibility of biofilms for these species to anti-fungal agents.

A variety of methods have been developed to quantify biofilm formation, including crystal violet (CV) staining and XTT reduction assay (XTT) [23,24]. In the former, biofilms are stained with CV and destained with a decolorization solution that can be measured spectrophotometrically. CV stains all the cells present in biofilms, irrespective of their viability [23]. In contrast, XTT reduction assay measures only viable cells as XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide) is reduced to formazan only by metabolic active cells. This colorimetric reaction can also be measured spectrophotometrically [25,26]. Although previous studies have reported that fluconazole has decreased activity against *Candida* in biofilms, the great majority of planktonic isolates of the *C. parapsilosis* complex are susceptible to this drug [14,27]. To date, the susceptibility of these new species in biofilms to fluconazole has not been specifically tested. Of note, amphotericin B lipid formulation and echinocandins have been shown to be active against *Candida* in biofilms [27–30]. In addition, biofilms of some *C. albicans* isolates have been shown to be susceptible to amphotericin B deoxicolate as well [14,24,31].

In this study we used two different methods to quantify *Candida* biofilms of five different species and compared the *in vitro* susceptibility of clinical bloodstream isolates, grown as planktonic cells and biofilms, against fluconazole (FLC) and amphotericin B deoxicolate (AMB).

Materials and methods

Isolates

We tested a total of 30 clinical *Candida* spp. strains, including four *C. albicans*, six *C. tropicalis*, seven *Candida parapsilosis*, eight *Candida orthopsilosis*, and five *Candida metapsilosis* isolates. The isolates were recovered

from different patients and isolated from a variety of clinical specimens, i.e., blood, urine, skin, oropharyngeal, vaginal, and nail specimens (Table 1). The cultures were maintained at -70°C for different periods of time in the collection of the Special Mycology Laboratory (LEMI), Universidade Federal de São Paulo. Two quality control strains, *C. krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019, were also included in the studies.

All isolates were identified on the basis of their micro-morphology and results of biochemical tests using the commercial system ID32C (bioMérieux Marcy l’Etoile, France). The *C. parapsilosis* complex was further differentiated into *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* or *C. parapsilosis* by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region as previously described [20].

Growth conditions and biofilm formation

The growth conditions and biofilm formation for CV staining and XTT reduction assays were adapted according to the methodology described elsewhere [23]. For biofilm formation, strains were initially grown on Sabouraud dextrose agar at 30°C for 24 h and then one colony of each strain was further subcultured in RPMI 1640 broth medium containing L-glutamine, but without bicarbonate (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, USA), buffered to pH 7.0 with 3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS, 0.165 M; Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, USA) overnight (18 h), on a rotating shaker at 120–200 rpm at 35°C . The cell cultures were harvested, washed twice with PBS and adjusted to a concentration of approximately 1×10^7 cells/ml in RPMI 1640 medium. Biofilms were produced by transferring 100 μl of the cell suspension into each well of a sterilized, polystyrene, flat-bottomed, 96-well microtiter plate (Costar, Corning Incorporated, NY, USA).

The plates were incubated at 37°C for 1.5 h at 75 rpm so that the cells could attach to the surface of the wells. Following the attachment phase, unattached cells were removed by washing the wells with 150 μl of PBS and 100 μl of fresh RPMI 1640 medium were added to each well. The plate was incubated at 37°C for 72 h with shaking at 75 rpm to allow for the growth of the biofilms. Test medium without cells was added to the final well of each plate as the negative control.

Biofilm quantification by crystal violet staining

We used CV staining to quantify bulk biofilm production. Briefly, after biofilm formation, each well was washed twice with 200 μl PBS and the plate was dried for 20 min at 35°C . The washed biofilms were stained with 110 μl of 0.4% aqueous CV solution for 45 min. Afterwards, the wells were washed three times with 200 μl Milli-Q sterile

Table 1 Strains used in this study.

Isolates	LEMI Bank number	Clinical specimens	Source (city-state)*	Species
BR-A1	296	Blood	Rio de Janeiro-RJ	<i>C. albicans</i>
BR-A2	291	Blood	São Paulo-SP	<i>C. albicans</i>
BR-A3	15R	Oropharyngeal	ND	<i>C. albicans</i>
BR-A4	18R	Urina	ND	<i>C. albicans</i>
BR-A5	40R	Vaginal	ND	<i>C. albicans</i>
BR-A6	53R	Oropharyngeal	ND	<i>C. albicans</i>
BR-A7	58R	Oropharyngeal	Uberlândia-SP	<i>C. albicans</i>
BR-A8	2483A	Blood	Vitória-ES	<i>C.tropicalis</i>
BR-A9	2041A	Blood	Brasília-DF	<i>C.tropicalis</i>
BR-A10	118	Blood	ND	<i>C.tropicalis</i>
BR-A11	253	Blood	São Paulo-SP	<i>C.tropicalis</i>
BR-A12	670	Blood	São Paulo-SP	<i>C.tropicalis</i>
BR-A13	957	Blood	São Paulo-SP	<i>C.tropicalis</i>
BR-A14	651	Blood	São Paulo-SP	<i>C.tropicalis</i>
BR-A15	707	Blood	São Paulo-SP	<i>C.tropicalis</i>
BR-A16	953	Blood	São Paulo-SP	<i>C.tropicalis</i>
BR-A17	1040	Blood	São Paulo-SP	<i>C.tropicalis</i>
BR-A18	1083A	Blood	São Paulo-SP	<i>C.tropicalis</i>
BR-A19	1067A	Blood	São Paulo-SP	<i>C.tropicalis</i>
BR-A20	1293	Blood	São Paulo-SP	<i>C.tropicalis</i>
BR-A21	300	Blood	São Paulo-SP	<i>C.tropicalis</i>
BR-A22	294	Blood	São Paulo-SP	<i>C.tropicalis</i>
BR-A23	260	Blood	São Paulo-SP	<i>C.tropicalis</i>
BR-A24	279	Blood	São Paulo-SP	<i>C.tropicalis</i>
BR-A25	2248	Blood	Curitiba-PR	<i>C. parapsilosis</i>
BR-A26	1430	Blood	Brasília-DF	<i>C. parapsilosis</i>
BR-A27	1620	Blood	São Paulo-SP	<i>C. parapsilosis</i>
BR-A28	1403	Blood	Rio de Janeiro-RJ	<i>C. parapsilosis</i>
BR-A29	2099	Blood	São Paulo-SP	<i>C. parapsilosis</i>
BR-A30	2399	Blood	São Paulo-SP	<i>C. parapsilosis</i>
BR-A31	2218	Blood	Ribeirão Preto- SP	<i>C. parapsilosis</i>
BR-A32	1971	Blood	Curitiba-PR	<i>C.orthopsilosis</i>
BR-A33	17 Vitória	Vaginal	Vitória-ES	<i>C.orthopsilosis</i>
BR-A34	31P	Skin	São Paulo-SP	<i>C.orthopsilosis</i>
BR-A35	1497	Blood	Rio de Janeiro-RJ	<i>C.orthopsilosis</i>
BR-A36	1803	Blood	Campinas-SP	<i>C.orthopsilosis</i>
BR-A37	1502	Blood	Rio de Janeiro-RJ	<i>C.orthopsilosis</i>
BR-A38	16UM	Nail	São Paulo-SP	<i>C. orthopsilosis</i>
BR-A39	1868	Blood	São Paulo-SP	<i>C.orthopsilosis</i>
BR-A40	1799	Blood	Campinas-SP	<i>C. metapsilosis</i>
BR-A41	1256	Blood	São Paulo-SP	<i>C. metapsilosis</i>
BR-A42	26M	Skin	São Paulo-SP	<i>C. metapsilosis</i>
BR-A43	2219	Blood	Ribeirão Preto-SP	<i>C. metapsilosis</i>
BR-A44	1815	Blood	Vitória-ES	<i>C. metapsilosis</i>
	ATCC 22019			<i>C. parapsilosis</i>
	ATCC 6258			<i>C. krusei</i>

ND, not determined.

*All the strains used in this study are from Brazil.

water and distained with 200 µl of 95% ethanol. After 45 min, 100 µl of distaining solution from each sample was transferred to a new plate and measured with a spectrophotometer plate reader at 595 nm. The samples exhibiting very intense blue color, yielding 'offscale' absorbance values, were diluted 1:4 with sterile water before performing a second absorbance reading. The absorbance values of the negative controls (containing no cells) were subtracted from the values of the test wells to minimize background interference. Each strain was tested five times and biofilm

production quantities are reported as the arithmetic mean of absorbance values of the five replicate tests.

Biofilm quantification by XTT reduction assay

Biofilm metabolic activity was measured by the XTT (tetrazolium salt 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-(phenylamino)-carbonyl-2H-tetrazoliumhydroxide) (Sigma, St Louis, MO, USA) reduction assay. After biofilm formation, the wells were washed two times with 200 µl

PBS, then 200 μ l of PBS and 12 μ l of the XTT-menadione solution was added to each well. The XTT-menadione solution was prepared fresh on each day of testing by adding 1.5 ml of XTT (1 mg/ml in sterile saline; Sigma Chemicals, St. Louis, MO) to 300 μ l menadione solution (0.4 mM in acetone; Sigma Chemicals). A pilot study was performed to assess three different XTT-menadione solution incubation times, i.e., plates were incubated for 1, 3 or 5 h in the dark at 35°C. Afterwards, 100 μ l of the reaction solution was transferred to a new flat-bottomed microtiter plate and the absorbance was measured with a spectrophotometer plate reader at 490 nm. The experiments were performed five times for each strain and we reported the arithmetic mean of absorbance values. The absorbance values of the negative control wells (containing no cells) were subtracted from the values of the test wells to account for any background absorbance.

Planktonic cell MICs (PMICs)

The FLC susceptibility of planktonic cells was determined by the M27-A2 microbroth method [32] and endpoints were assessed after 48 h on the basis of prominent decreases in growth compared to that of the drug-free growth controls. The MICs of amphotericin B were determined by the E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden) after 24 h incubation on RPMI 1640 medium supplemented with 2% glucose and 2% agar [33,34]. E-test MIC values were read as the lowest drug concentration at which the zone of complete growth inhibition intersected the scale on the antifungal test strip. Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) recommended quality control strains (*C. krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019) were included on each day of testing.

Minimum Biofilm Eradication Concentrations (MBECs)

Biofilms were formed in RPMI 1640 medium as described above. After 24 h of biofilm growth, they were washed twice with PBS and the plates were inverted onto absorbent paper to remove residual buffer prior to challenge with FLC (Pfizer Incorporated, New York, NJ, USA) and AMB (Sigma, St Louis, MO, USA). The drug stock solutions were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma, St Louis, MO, USA) and then diluted in RPMI 1640 medium. The final concentrations of drug dilutions were 128–2048 μ g/ml for FLC and 1–16 μ g/ml for AMB. Two hundred microliters of each drug concentration were added to the respective wells of the microtiter plate which was incubated for 48 h at 35°C while shaking at 75 rpm. Wells containing biofilms, but no drug, served as positive controls for each strain tested. Following drug exposure, biofilms were washed three times with sterile PBS and metabolic activity was determined using the XTT reduction assay. Two hundred microliters of XTT/menadione/PBS working solution were added to each well

and the plates were incubated at 35°C in the dark for 1 h. Before reading, 100 μ l of reaction mixture was transferred to a clean flat-bottomed microtiter plate and read in a spectrophotometer at 490 nm. MBECs for both FLC and AMB were defined as the lowest drug concentration which inhibited metabolic activity by 50% (MBEC₅₀) and 80% (MBEC₈₀), relative to the drug-free growth control well. Two replicate tests were conducted with each of the isolates.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Biofilms were formed on sterile 13 mm diameter Thermanox plastic coverslips discs (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) placed in 24-well microtiter plates (Costar; Corning Incorporated, Corning, NY). For the attachment phase, 1 ml of the adjusted cell suspension was transferred to each well and the plate was incubated at 37°C for 1.5 h with shaking at 75 rpm so that the cells could attach to the surfaces of the wells. Then unattached cells were removed, the wells washed with 1.5 ml of PBS, and 1.0 ml of fresh RPMI 1640 medium was added. The plate was incubated at 37°C for 72 h with shaking at 75 rpm to allow biofilm growth. The SEM methodology was adapted from Bizerra *et al.* which included fixing the discs with 4.0% formaldehyde plus 2.0% glutaraldehyde buffered at pH 7.2 with 0.1 M sodium cacodylate for 24 h at 4°C. Post-fixation was carried out with 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer for 1 h. Subsequently, the samples were treated with 1% tannic acid for 45 min. After post-fixation, the cells were treated again with 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer for 1 h. The samples were dehydrated with a series of ethanol washes, critical-point dried in CO₂, coated with gold and examined on a JOEL-JSM 5300 scanning electron microscope.

Statistical analysis

The different biofilm growth conditions and quantification were tested in five replicates and the standard deviation (SD) for each set of data was determined. The biofilm susceptibility tests for AMB and FLC were performed in two replicates. Means were compared by using the Student *t* test (Microsoft Office Excel 2003). The significance level for *P* values was considered as <0.05.

Results

Biofilm quantification by CV staining

The biofilms were stained using the CV staining method to quantify bulk biofilm production. Since a total of 10 out of 31 strains showed off-scale absorbance values (A₅₉₅), further dilutions were made to obtain the actual absorbance value. Figure 1A shows biofilm quantification by crystal violet staining for five *Candida* species, i.e., four isolate of

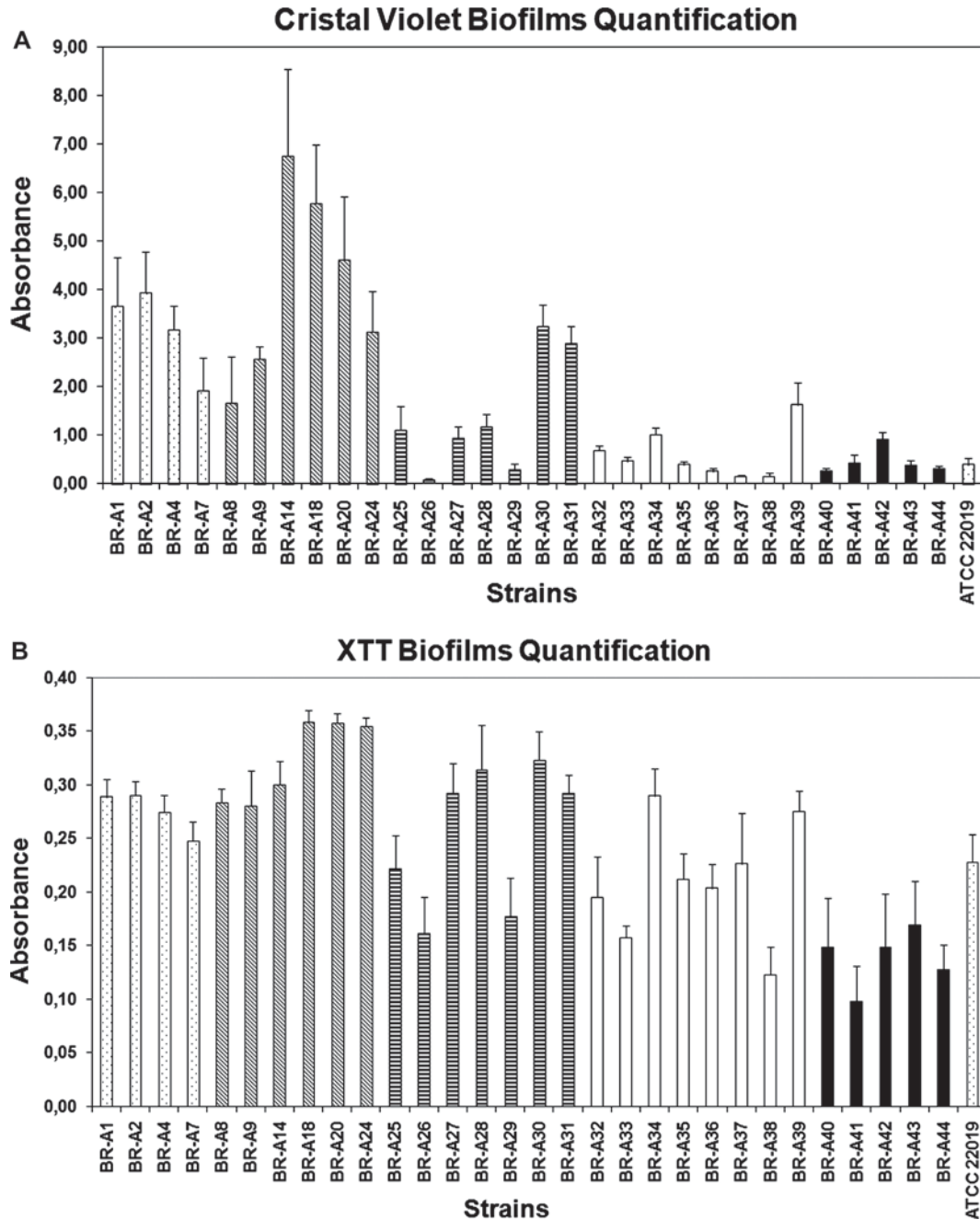


Fig. 1 Biofilm quantification of five different *Candida* spp. using two distinct methods: Crystal Violet staining (A) and XTT reduction assay (B). Strains: *Candida albicans* BR-A1 to BR-A7; *Candida tropicalis* BR-A8 to BR-A24, *Candida parapsilosis* BR-A25 to BR-A31, *Candida orthopsilosis* BR-A32 to BR-A39, *Candida metapsilosis* BR-A40 to BR-A44 and *C. parapsilosis* ATCC 22019.

C. albicans, six *C. tropicalis*, seven *C. parapsilosis*, eight *C. orthopsilosis* and five *C. metapsilosis*. In this assay, the mean A_{595} value for 31 strains was 1.761 (SD \pm 0.412) with a range of 0.090–6.760, that corresponds to 74.78 fold difference between the highest and the lowest biofilm producing strains. The rank scale for biofilm production

as determined through crystal violet staining was *C. tropicalis* > *C. albicans* >>> *C. parapsilosis* > *C. orthopsilosis* > *C. metapsilosis*. *C. tropicalis* strains produced significantly greater amount of biofilm when compared to *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* strains ($P < 0.05$).

Biofilm quantification by XTT reduction assay

The XTT reduction assay was used to specifically quantify biofilm metabolic activity as a measure of biofilm production. We tested three different XTT-menadione incubation times (1, 3 or 5 h) to determine which produced superior results for comparison of biofilm activity among different isolates. We obtained the absorbance values of 0.143 (1 h), 0.287 (3 h) and 0.288 (5 h) for *C. albicans*, and 0.045 (1 h), 0.149 (3 h) and 0.202 (5 h) for *C. parapsilosis*. The absorbance differences demonstrated were 3.1 times for 1 h, 1.9 for 3 h and 1.4 for 5 h. We noted that at 1 h incubation time we could detect the greatest difference in biofilm production between any two strains tested. Therefore, we adopted 1 h incubation time for all the tests in this study. Figure 1B shows biofilm metabolic activity results for all 30 clinical isolates tested and one quality control strain. In this assay, the mean A_{490} value for 31 strains was 0.239 (SD \pm 0.025) with a range of 0.123–0.358 that corresponds to a 2.9 fold difference between the strains with the highest and the lowest biofilm production. The rank scale for biofilm production was *C. tropicalis* > *C. albicans* > *C. parapsilosis* > *C. orthopsilosis* > *C. metapsilosis*, although *P* values were not significant. The difference in biofilm production among the species, when quantified by XTT assay, was not as prominent as when quantified by the CV staining method. A possible explanation is based on the differences between the two quantification methods, i.e., CV measures bulk biofilm while XTT measures specifically metabolically-active biofilm cells. The experiments were performed with five replicates for each strain and we reported the absorbance arithmetic mean.

Biofilm Scanning Electron Microscopy (SEM)

SEM images of the biofilms were examined to check the efficiency of the CV and XTT methods currently used to quantify biofilms. As illustrated in Fig. 2, *C. tropicalis* BR-A14 (A) presented large amount of biofilm consisting of abundant filamentous and yeast forms. *C. parapsilosis* BR-A30 (B) produced biofilms composed by yeast cells and few pseudohyphae. The same morphology was observed for *C. orthopsilosis* BR-A39 strain (C), but with a lower number of cells. *C. metapsilosis* BR-A40 strain (D) had biofilms with microcolonies of yeasts. The following results are shown in Fig. 1: *C. tropicalis* BR-A14 was found to have an absorbance of 6.760 for CV and 0.300 for XTT; absorbance of *C. parapsilosis* BR-A30 was 3.252 for CV and 0.326 for XTT; *C. orthopsilosis* BR-A39 had an absorbance of 1.624 for CV and 0.275 for XTT; and *C. metapsilosis* BR-A40 presented absorbance of 0.293 for CV and 0.148 for XTT. Based on the morphology of the biofilm illustrated in Fig. 2, it is possible to say that only

C. tropicalis BR-A14 strain exhibited a large concentration of hyphae and yeasts. A large number of yeasts but a limited number of pseudohyphae were found with *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis*. Finally, *C. metapsilosis* clearly produced limited biofilms composed of a restricted number of yeast cells. The micromorphological data generated by SEM are consistent with results of biofilm production obtained with CV assays (Fig. 2E).

Standardization of drug concentration used in biofilm susceptibility testing

To determine MBECs, biofilms were grown for 24 h and then exposed to an antifungal drug for 48 h. Drug-induced decreases in metabolic activity were determined by XTT reduction assay. AMB concentrations ranged from 1–16 $\mu\text{g/ml}$ and the MBEC₅₀ for all the strains tested was < 2 $\mu\text{g/ml}$ (Table 2). FLC concentrations ranged from 128–2048 $\mu\text{g/ml}$ and for most of the isolates tested, not even the highest drug concentration produced a detectable decrease in biofilm metabolic activity (Table 2).

Planktonic and biofilm susceptibility testing

Table 2 shows AMB PMICs and MBECs for all isolates tested in this study. Although interpretive breakpoints for AMB have not been established, PMICs for AMB indicated that the isolates were generally susceptible, with values ranging from 0.014–0.29 $\mu\text{g/ml}$. Among the species tested, *C. tropicalis* yielded the highest median AMB PMIC (0.25 $\mu\text{g/ml}$) and thus the lowest *in vitro* susceptibility. As expected, MBECs, regardless of species, were systematically several-fold higher than PMICs for the same strains. However, when MBECs were compared across all species tested, it was found that *C. parapsilosis* strains exhibited lower susceptibility to AMB. AMB MBEC₅₀ values were similar among all species tested (< 2 $\mu\text{g/ml}$). However, when AMB MBEC₈₀ were analyzed, *C. parapsilosis* strains exhibited higher values as compared to the other species, ranging from 1 to \geq 16 $\mu\text{g/ml}$ (Table 2). Despite the fact that some isolates were classified as low biofilm producers, the XTT readings were sufficiently sensitive to determine MBEC₅₀ and MBEC₈₀ for all isolates in the antifungal susceptibility tests. The biofilm controls for all strains analyzed (grown with no drug) showed OD values for XTT assay ranging from 0.0976–0.3586. Surprisingly, MBEC_{80s} were not significantly different from MBEC_{50s} for most of the strains tested. Indeed, except for *C. parapsilosis*, the difference between the MBEC₅₀ and the MBEC₈₀ was \leq 2 doubling dilutions. Six of the seven *C. parapsilosis* strains had MBEC₈₀ that were \geq 3 doubling dilutions higher than the corresponding MBEC₅₀ results. Considering all the species and the testing methods

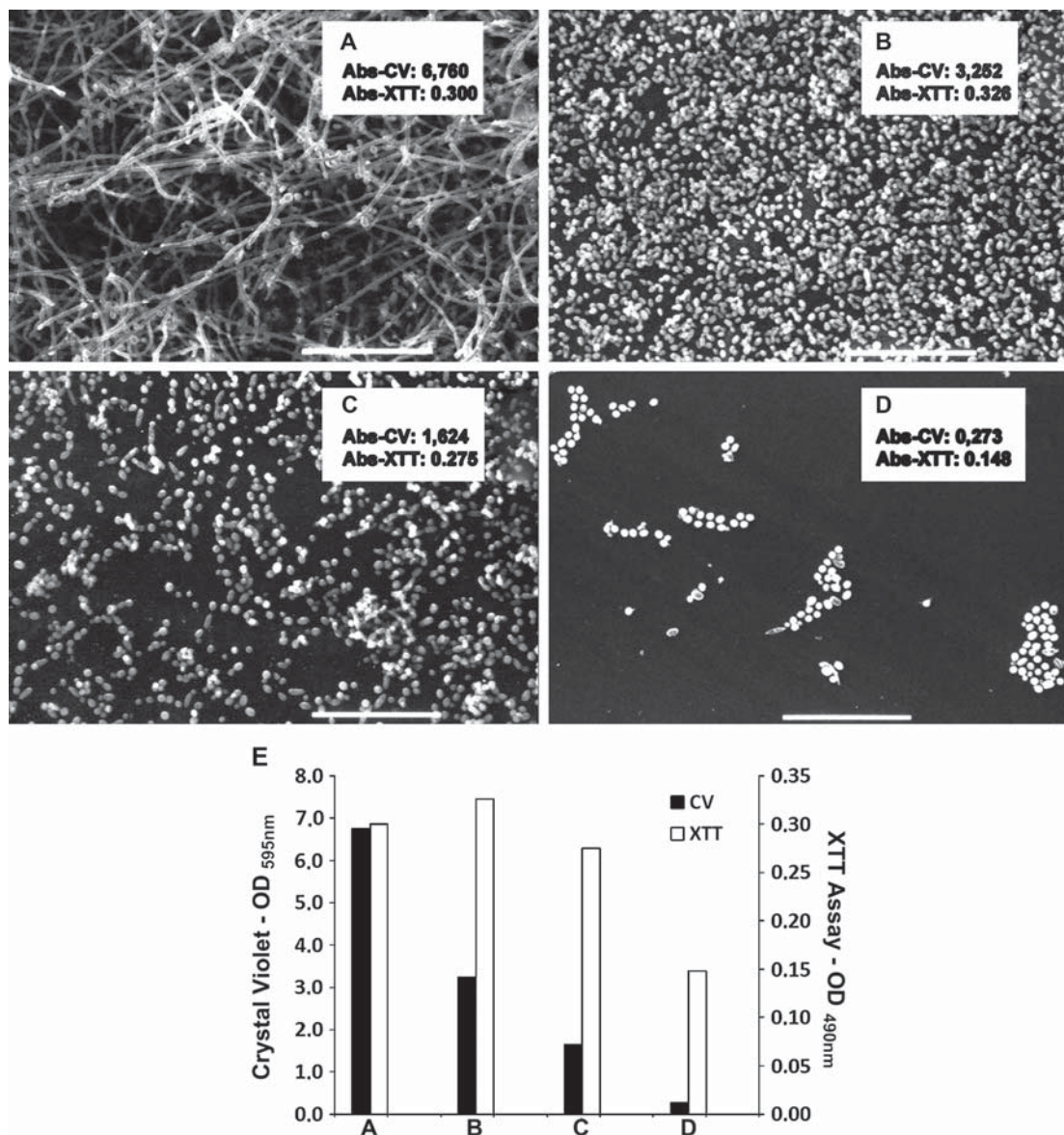


Fig. 2 SEM images of (A) *Candida tropicalis* (BR-A14), (B) *Candida parapsilosis* (BR-A30), (C) *Candida orthopsilosis* (BR-A39) and (D) *Candida metapsilosis* (BR-A40) biofilms. The numbers on each image represent the absorbance values obtained by CV (crystal violet) staining and XTT quantification methods for each strain, respectively. Scale bars: 50 μ m. (E) Correlation between CV and XTT assay of the four strains analyzed by SEM.

used, the *C. parapsilosis* biofilm was the least susceptible to AMB.

Table 2 shows FLC PMICs and MBECs for all tested isolates. FLC PMICs ranged from 0.25–64 μ g/ml with a median PMIC = 1 μ g/ml. With the exception of *C. albicans* isolate (BR-A1) and *C. tropicalis* isolates (BR-A8, BR-A9 and BR-A14), previously known to be FLC-resistant, all other strains tested were susceptible to this drug (PMIC < 4 μ g/ml). As expected, FLC MBECs (determined at both 50% and 80% inhibition endpoints) were

significantly higher than the PMICs for all strains and ranged from 256–>2,048 μ g/ml with a median MBEC of \geq 2,048 μ g/ml for both endpoints. MBEC₅₀ and MBEC₈₀ for the same strain were identical except for two cases where the MBEC₈₀ was higher than the MBEC₅₀.

Discussion

Candida species are recognized as the major fungal agents of nosocomial infections [15,35,36], where medical devices

Table 2 AMB and FLC MICs for 30 clinical isolates in planktonic and biofilm mode.

Strains	Species	AMB PMICs* ug/ml	AMB MBEC ₅₀ ug/ml	AMB MBEC ₈₀ ug/ml	FLC PMICs** ug/ml	FLCMBEC ₅₀ ug/ml	FLC MBEC ₈₀ ug/ml
BR-A1	<i>C. alb</i>	0.125	1	1	>64	>2048	>2048
BR-A2	<i>C. alb</i>	0.125	1	1	0.25	>2049	>2049
BR-A4	<i>C. alb</i>	0.25	1	1	0.25	>2048	>2048
BR-A7	<i>C. alb</i>	0.25	1	1	2	>2048	>2048
BR-A8	<i>C. trop</i>	0.5	1	1	32	>2048	>2048
BR-A9	<i>C. trop</i>	0.38	1	1	64	>2048	>2048
BR-A14	<i>C. trop</i>	0.75	2	2	>64	>2048	>2048
BR-A18	<i>C. trop</i>	0.38	2	2	0.5	>2048	>2048
BR-A20	<i>C. trop</i>	0.38	1	1	0.5	>2048	>2048
BR-A24	<i>C. trop</i>	0.5	2	2	1	>2048	>2048
BR-A25	<i>C. parap</i>	0.75	1	>16	0.5	>2048	>2048
BR-A26	<i>C. parap</i>	0.75	1	1	0.5	>2048	>2048
BR-A27	<i>C. parap</i>	1	1	>16	1	>2048	>2048
BR-A28	<i>C. parap</i>	0.38	1	>16	0.5	>2048	>2048
BR-A29	<i>C. parap</i>	0.75	1	>16	0.5	>2048	>2048
BR-A30	<i>C. parap</i>	1	1	8	0.5	>2048	>2048
BR-A31	<i>C. parap</i>	0.38	1	>16	0.5	>2048	>2048
BR-A32	<i>C. orthop</i>	0.38	1	1	1	>2048	>2048
BR-A33	<i>C. orthop</i>	0.38	1	1	1	>2048	>2048
BR-A34	<i>C. orthop</i>	1.5	1	2	2	>2048	>2048
BR-A35	<i>C. orthop</i>	1.5	1	1	1	2048	>2048
BR-A36	<i>C. orthop</i>	0.25	1	1	1	>2048	>2048
BR-A37	<i>C. orthop</i>	0.38	1	1	1	256	2048
BR-A38	<i>C. orthop</i>	0.38	1	4	4	256	256
BR-A39	<i>C. orthop</i>	0.5	1	4	1	>2048	>2048
BR-A40	<i>C. metap</i>	0.19	1	1	1		>2048
BR-A41	<i>C. metap</i>	0.25	1	1	2	1024	>2048
BR-A42	<i>C. metap</i>	0.38	1	1	2	>2048	>2048
BR-A43	<i>C. metap</i>	0.25	1	1	1	>2048	>2048
BR-A44	<i>C. metap</i>	0.38	1	1	1	>2048	>2048
ATCC22019	<i>C. parap</i>	0.75	1	1	1	>2048	>2048

*PMICs were determined by Etest and read after 48 h incubation time. Endpoint based of visual determination of lowest drug concentration producing total inhibition in growth relative to the drug free growth control well.

**PMICs end point of visual determination of lowest concentration producing a prominent decrease in growth relative to the drug free control well.

MBEC₅₀ endpoint based on lowest drug concentration producing a 50% reduction in metabolic activity relative to drug free growth control as measured by the XTT-reduction assay.

MBEC₈₀ endpoint based on lowest drug concentration producing a 80% reduction in metabolic activity relative to drug free growth control as measured by the XTT-reduction assay.

and biofilm production may play a relevant role for establishing bloodstream infections [37,38]. Different methods for assessing *Candida* biofilm production have been reported in the literature [13,27].

In this study, we compared two different procedures to quantify biofilm production that are frequently described in the literature, i.e., CV staining and XTT reduction assay [14,23,30,39]. Since CV stains the metabolically active and inactive cells in mature biofilms, it is probably the most appropriate and reliable test for determining bulk biofilm formation [24,25]. In contrast, XTT is reduced by mitochondrial dehydrogenases of metabolically-active cells, and likely represents the best approach to test the effect of drug exposure on the biofilm viability [3,14,28]. This method has been widely used by fungal biofilm researchers

to quantify *Candida* biofilms *in vitro* [14,24,39,40]. Furthermore, different incubation times of biofilms with XTT, ranging from 1–5 h, have been described [3,14,30]. We could note that the XTT reduction is a very sensitive and quick reaction. Consequently, the differences between the isolates tested tended to decrease with longer incubation times. Therefore, we used a 1 h incubation time in this study to maximize the discriminatory power between two individual strains.

Different isolates of five distinct *Candida* species were tested using these two methods (Fig. 1A & B). Both methods showed consistent results, even though the degree of difference in biofilm production among the species, as determined by XTT reduction assay, was less dramatic than that obtained with CV staining. Therefore, these

results indicate that CV is more appropriate to discriminate high, medium and low biofilm producing strains.

We consistently found through the use of the more sensitive CV staining method, that all *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* strains tested were able to produce biofilm. In two previous reports, the authors failed to demonstrate any biofilm production by these two species [21,22]. However, as different from our study, these authors cultivated biofilms for 24 h without agitation, and measured transmittance or absorbance without staining.

The images obtained by SEM demonstrated that the amount of biofilm formed by high, medium, and low producers was highly correlated to the results generated by CV staining assay. In contrast, these three groups did not show high OD differences when analyzed by XTT assays.

Standardized antifungal susceptibility testing methods are not available for *Candida* biofilms [24] as they are for planktonic cells. As suggested by several authors, we used XTT reduction assay to evaluate the *in vitro* activity of antifungal drugs against 24 h old biofilm using most of the same parameters recommended by CLSI for planktonic cells [14,30].

Candida biofilm resistance is a phenomenon widely observed and is of great clinical relevance [26,27,41]. Such resistance may explain the persistence of many infections, such as those related to the use of catheters, despite appropriate antimicrobial therapy [42]. Therefore, any evidence of drug activity against *Candida* biofilms represents an important new finding.

We found high FLC MBECs (MBEC₅₀ and MBEC₈₀ >2,048 µg/ml) for almost all of the strains tested, indicating that the biofilm of all the isolates were resistant to this drug. Our results agree with different studies that have demonstrated that FLC and other triazoles (posaconazole and voriconazole) are not active against *C. albicans* biofilms [14,43,44]. The fungistatic activity of FLC may be strongly involved in these findings.

In contrast to triazoles, we found that AMB exhibited some antifungal activity against biofilm cells depending on the species tested, as well as the assay threshold adopted. It is noteworthy that the susceptibility to AMB of *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* is higher than for *C. parapsilosis*, despite the observation that this species produced a lower biofilm mass than *C. albicans* and *C. tropicalis*. Six of seven *C. parapsilosis* isolates presented high AMB MBEC₈₀ values, but due to the low number of strains tested, we cannot say that the biofilm formed by this species is less susceptible to AMB than the other species studied. As opposed to the data generated by Kuhn *et al.* [27], our findings suggest that the conventional AMB and not just its lipid formulation are able to interfere with *Candida* biofilm production.

In conclusion, we could verify biofilm production for all the strains tested, including *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* isolates. Biofilm quantification showed that *C. tropicalis* was the highest biofilm producer followed by *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. Biofilms of all the isolates evaluated were resistant to FLC but in general, AMB presented activity against *Candida* biofilm.

Acknowledgements

This work was supported by CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil, grant 2005/50778-1). ALC received grant from CNPq (304802/2007-7).

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors are responsible for the content and writing of the paper.

References

- 1 Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York)* 1999; **284**: 1318–1322.
- 2 Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; **64**: 847–867.
- 3 O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Ann Rev Microbiol* 2000; **54**: 49–79.
- 4 Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 2001; **33**: 1387–1392.
- 5 Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol* 2002; **19**: 139–143.
- 6 Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Inf Immun* 2002; **70**: 878–888.
- 7 Colombo AL, Guimaraes T, Silva LR, *et al.* Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Cont Hosp Epidemiol* 2007; **28**: 570–576.
- 8 Kuhn DM, Mukherjee PK, Clark TA, *et al.* *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg Inf Dis* 2004; **10**: 1074–1081.
- 9 Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2002; **5**: 608–611.
- 10 Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukary Cell* 2005; **4**: 633–638.
- 11 Brito LR, Guimaraes T, Nucci M, *et al.* Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol* 2006; **44**: 261–266.
- 12 Nucci M, Anaissie E. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin Infect Dis* 2001; **33**: 1959–1967.
- 13 Shin JH, Kee SJ, Shin MG, *et al.* Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 1244–1248.

- 14 Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res* 2008; **8**: 442–450.
- 15 Colombo AL, Nucci M, Park BJ, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 2816–2823.
- 16 Krcmery V, Jr., Mrazova M, Kunova A, et al. Nosocomial candidaemias due to species other than *Candida albicans* in cancer patients. Aetiology, risk factors, and outcome of 45 episodes within 10 years in a single cancer institution. *Support Care Cancer* 1999; **7**: 428–431.
- 17 Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, et al. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997–1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 747–751.
- 18 Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 452–456.
- 19 Krcmery V, Jr., Kovacicova G. Longitudinal 10-year prospective survey of fungaemia in Slovak Republic: trends in etiology in 310 episodes. Slovak Fungaemia study group. *Diagnos Microbiol Inf Dis* 2000; **36**: 7–11.
- 20 Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 284–292.
- 21 Song JW, Shin JH, Shint DH, et al. Differences in biofilm production by three genotypes of *Candida parapsilosis* from clinical sources. *Med Mycol* 2005; **43**: 657–661.
- 22 Tavanti A, Hensgens LA, Ghelardi E, Campa M, Senesi S. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 1455–1462.
- 23 Jin Y, Yip HK, Samaranyake YH, Yau JY, Samaranyake LP. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 2961–2967.
- 24 Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2475–2479.
- 25 Hawser SP, Norris H, Jessup CJ, Ghannoum MA. Comparison of a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-t etrazolium hydroxide (XTT) colorimetric method with the standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 1450–1452.
- 26 Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2002; **49**: 973–980.
- 27 Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 1773–1780.
- 28 Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. *Emerg Inf Dis* 2004; **10**: 14–19.
- 29 Jain N, Kohli R, Cook E, et al. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. *Appl Environ Microbiol* 2007; **73**: 1697–1703.
- 30 Melo AS, Colombo AL, Arthington-Skaggs BA. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 3081–3088.
- 31 Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 2001; **18**: 163–170.
- 32 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard*. 2 edn. Document M27-A2. Wayne, PA: NCSI.
- 33 Colombo AL, Barchiesi F, McGough DA, Rinaldi MG. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 535–540.
- 34 Wanger A, Mills K, Nelson PW, Rex JH. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 2520–2522.
- 35 Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 1829–1835.
- 36 Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; **39**: 309–317.
- 37 Adair CG, Gorman SP, Feron BM, et al. Implications of endotracheal tube biofilm for ventilator-associated pneumonia. *Int Care Med* 1999; **25**: 1072–1076.
- 38 Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 2003; **11**: 30–36.
- 39 Kuhn DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 506–508.
- 40 Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001; **183**: 5385–5394.
- 41 Ramage G, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents. *Am Clin Lab* 2001; **20**: 42–44.
- 42 Mah TF, O’Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; **9**: 34–39.
- 43 Choi HW, Shin JH, Jung SI, et al. Species-specific differences in the susceptibilities of biofilms formed by *Candida* bloodstream isolates to echinocandin antifungals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1520–1523.
- 44 Katragkou A, Chatzimoschou A, Simitsopoulou M, et al. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 357–360.

This paper was first published online on Early Online on 4 November 2010.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)