

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

Carine Cristina Tavares de Souza

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE BOMBAS DE EFLUXO NA RESISTÊNCIA A
ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS EM LEVEDURAS AMBIENTAIS**

Porto Alegre

2019

Carine Cristina Tavares de Souza

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE BOMBAS DE EFLUXO NA RESISTÊNCIA A
ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS EM LEVEDURAS AMBIENTAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Patricia Valente da Silva

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Souza, Carine Cristina Tavares de
AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE BOMBAS DE EFLUXO NA
RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS EM LEVEDURAS
AMBIENTAIS / Carine Cristina Tavares de Souza. --
2019.
58 f.
Orientadora: Patricia Valente da Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. ambiente aquático. 2. antifúngicos. 3. bomba de
efluxo. 4. verapamil. I. Valente da Silva, Patricia,
orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por me dar coragem e forças para seguir em frente.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Patrícia da Silva Valente, pela oportunidade, pelo acolhimento, pela dedicação, pelos ensinamentos e, principalmente, pela confiança. Tenho grande consideração, admiração e respeito por essa profissional; se não fosse seu apoio e incentivo, eu teria abandonado a pesquisa no momento em que descobri minha gravidez.

À Prof^ª. Dra. Maria Lúcia Scroferneker, pelo apoio amigo e científico; nada haveria acontecido se ela não estivesse pensando em me ajudar. Agradeço-lhe pela confiança e por todo o carinho despendido a mim e à minha família. Ela estará sempre em meu coração, onde quer que eu esteja.

Às minhas colegas e amigas de laboratório, que sempre estiveram disponíveis a ajudar, a ensinar e a trocar experiências. Agradeço pela compreensão, pelas palavras de apoio e pelo companheirismo. De modo especial, à Danielle Pagani, por ter me acolhido no momento mais difícil da minha vida, pela paciência em me ensinar e disponibilizar trabalho em seu projeto. À Audren Monteiro, por aturar minhas besteiras e por fazer da rotina do laboratório muito mais descontraída e leve. À lasmin Rios, por ser a IC voluntária mais meiga, dedicada e interessada com que já convivi; tenho certeza de que ela terá uma linda trajetória pela frente. À Helenita Klein, pela amizade, pela disponibilidade em ajudar, deixando de lado sua pesquisa e seu descanso. À Alessandra Helwig, por alegrar meus dias com seus *hits* bregas e divertidos, pela ajuda diária e pela amizade. À Priscila Tavares, por compartilhar suas experiências e pela amizade construída. À Amanda Ribeiro e à Daiane Heidrich, por compartilhar seu conhecimento e pelo auxílio na interpretação dos dados. À Carina Timotheo e à Gabriela Boelter, pelos bons momentos compartilhados no laboratório, pela parceria e pelo auxílio na tradução do resumo, independente de onde estejam.

Ao Prof^º. Dr. Alexandre Fuentesfria, por conceder recursos financeiros para o andamento e desenvolvimento deste projeto.

Às integrantes do Laboratório de Micologia Aplicada, Gabriella Machado e Paula Reginatto, pela paciência e pela ajuda sempre imediata. Gabriella, como já tive a oportunidade de lhe dizer em outra ocasião, foi um anjo na minha vida acadêmica.

Agradeço por compartilhar seu conhecimento e por ser uma pessoa simples, humilde e amiga. Fico feliz em saber que, em meio a tantos contratemplos, nossos caminhos cruzam-se com pessoas como você.

Ao Dr. Santin, pois, graças ao seu apoio psiquiátrico e humano, consegui superar problemas pessoais; e aqui estou, rumo a um objetivo maior.

A todos os Professores do Programa de Microbiologia Agrícola e Ambiental por todos os conhecimentos e experiências transmitidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao meu esposo, Vinicius Kolling, por estar ao meu lado, pelo incentivo e pela paciência frente à minha ausência nos últimos meses.

À minha filha, Laís de Souza Kolling, por ser a razão da minha vida. Ela foi minha injeção de ânimo e de determinação diária. Amo-a muito.

Aos meus pais e aos meus irmãos, por estarem ao meu lado, pela educação, pelo amor e pelo zelo que sempre me deram. Essa conquista é nossa; sem o apoio e a ajuda de vocês, nada disso seria possível.

A todos que, diretamente ou indiretamente, estiveram envolvidos com o desenvolvimento desta pesquisa. Muito obrigada.

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE BOMBAS DE EFLUXO NA RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS EM LEVEDURAS AMBIENTAIS

Autor: Carine Cristina Tavares de Souza

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Patrícia Valente da Silva

RESUMO

A presença de leveduras em ambientes aquáticos, associada à contaminação desses ambientes, tem sido evidenciada com maior frequência nas últimas décadas. A Laguna Tramandaí apresenta como característica a movimentação de nutrientes e de sedimentos, devido a sua ligação com o rio Tramandaí e com a Lagoa do Armazém. Isso faz dela uma região modelo para avaliação do impacto antrópico na diversidade de leveduras ambientais e sua suscetibilidade a agentes antifúngicos. Com base nesses aspectos, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a resistência a agentes antifúngicos em leveduras isoladas da Laguna Tramandaí-RS. Foram selecionadas, então, 16 amostras destas, mantidas na coleção de culturas do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFRGS, por apresentarem resistência aos agentes antifúngicos em outros estudos do nosso grupo de pesquisa. Inicialmente, essas amostras foram submetidas ao teste de suscetibilidade frente aos antifúngicos azólicos fluconazol (FLZ), itraconazol (ITZ), voriconazol (VCZ), posaconazol (PSZ) e cetoconazol (CTZ), conforme normas e *breakpoints* estabelecidos pela CLSI (2008 e 2012). Posteriormente, elas foram analisadas na presença de um inibidor de bomba de efluxo, o verapamil (VRP). Cepas M04, M10 e M11 de *Candida* spp. apresentaram concentrações inibitórias mínimas (CIM) acima dos *breakpoints* estabelecidos em todos os antifúngicos testados, com exceção do CTZ, enquanto que os demais isolados deste gênero (LT03, M02, M06 e M09) tiveram suas CIM elevadas apenas para FLZ e ITZ. Todos os isolados do gênero *Rhodotorula* apresentaram altas CIMs frente ao FLZ e ao ITZ, assim como a *Yarrowia lipolytica* M08. *R. taiwanensis* LT15 foi sensível apenas ao CTZ. *Papiliotrema laurentii* LT19, único isolado de *Papiliotrema* que fez parte das análises, apresentou CIM elevada frente a todos os antifúngicos testados. A adição do inibidor VRP reduziu em 50% a CIM de alguns isolados frente a pelo menos um antifúngico (LT03: CTZ; M01: FLZ; M02: ITZ e CTZ; M09: ITZ e PSZ; M10 e M11: VCZ e CTZ). Outros isolados apresentaram redução igual ou menor que 25% (LT28: CTZ; M02: PSZ; M04:CTZ; M10: FLZ e PSZ). Alguns isolados, mesmo na presença do VRP, apresentaram CIM maiores – tal evento pode ter ocorrido em função do fenômeno trailing. Com isso, o presente estudo sugere que o mecanismo de resistência das leveduras isoladas da Laguna Tramandaí é a presença de bombas de efluxo devido à redução das CIMs em presença do inibidor VRP.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (58 p.) Março, 2019.

EVALUATION OF THE INFLUENCE OF EFFLUX PUMPS ON RESISTANCE TO AZOLE ANTIFUNGALS IN ENVIRONMENTAL YEAST

Author: Carine Cristina Tavares de Souza

Advisor: Prof^(a). Dr^(a). Patrícia Valente da Silva

ABSTRACT

In the last decades, the presence of yeasts associated to the contamination of aquatic environments, have been evidenced more frequently. The Tramandaí Lagoon is characterized by the movement of nutrients and sediments, due to its connection with the Tramandaí River and the Armazém Lagoon. It turns the region into a model for the anthropic impact evaluation on the diversity of environmental yeasts and their susceptibility to antifungal agents. Based on these aspects, the main aim of this work was to evaluate the resistance to antifungal agents in isolated yeasts from Tramandaí Lagoon - RS. Sixteen yeast samples isolated from Tramandaí Lagoon were selected, maintained in the cultures collection of UFRGS Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, which have showed resistance to antifungal agents in other studies of our research group. First, these samples were tested for susceptibility to azole antifungals as fluconazole (FLZ), itraconazole (ITZ), voriconazole (VCZ), posaconazole (PSZ) and ketoconazole (CTZ) according to standards and breakpoints established by CLSI (2008 and 2012). Thereafter, they were analyzed in the presence of an efflux pump inhibitor called verapamil (VRP). M04, M10 and M11 strains of *Candida* spp. showed minimal inhibitory concentrations (MICs) above the breakpoints established in all antifungal drugs tested, except for CTZ, while the other isolates belonging to *Candida* species (LT03, M02, M06 and M09) had their high MICs only for FLZ and ITZ. All isolates of the genus *Rhodotorula* presented high MICs in front of FLZ and ITZ, as well as *Yarrowia lipolytica* M08. *R. taiwanensis* LT15 was sensitive only to CTZ. *Papiliotrema laurentii* LT19, the only isolate of *Papiliotrema* that was part of the analysis, presented high MIC compared to all antifungal agents tested. The addition of the VRP inhibitor reduced the MIC of some isolates by 50% against at least one antifungal agent (LT03: CTZ; M01: FLZ; M02: ITZ and CTZ; M09: ITZ and PSZ; M10 and M11: VCZ and CTZ). Other isolates showed a reduction equal to or less than 25% (LT28: CTZ; M02: PSZ; M04: CTZ; M10: FLZ and PSZ). Other samples, even in the presence of VRP, presented higher MICs - this event may have occurred due to the trailing phenomenon. Thus, the present study suggests that the mechanism of resistance of the isolated yeasts of Tramandaí Lagoon is the presence of efflux pumps due to the reduction of MICs in the presence of the VRP inhibitor.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (58 p.) March, 2019.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	2
2.1	Objetivo Geral.....	2
2.2	Objetivos Específicos	2
3.	REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1	Infecções fúngicas	3
3.2	Agentes antifúngicos e seus mecanismos de ação	4
	3.2.1 Derivados Poliênicos	6
	3.2.2 Análogo da Pirimidina	7
	3.2.3 Derivados Azólicos	7
	3.2.4 Equinocandina	9
	3.2.5 Alilaminas	9
3.3	Derivados azólicos e seus mecanismos de resistência.....	9
	3.3.1 Mudanças qualitativas na enzima-alvo	11
	3.3.2 Alteração na biossíntese do ergosterol.....	11
	3.3.3 Ativação de bombas de efluxos	12
3.4	Inibidores de bombas de efluxo.....	15
3.5	Resistência a antifúngicos em leveduras ambientais	18
3.6	Laguna Tramandaí	20
4.	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	Local da realização da pesquisa	22
4.2	Seleção dos microrganismos.....	22
4.3	Meios de cultura e soluções	22
4.4	Preparo do inóculo	24
4.5	Teste de suscetibilidade a agentes antifúngicos	24
4.6	Atividade da Bomba de Efluxo.....	26
5.	RESULTADOS	27
6.	DISCUSSÃO	30
7.	CONCLUSÃO	36
8.	PERSPECTIVAS	37
9.	REFERÊNCIAS	38

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Transportadores ABC em espécies de <i>Candida</i> spp. com função de bomba de efluxo.....	14
Tabela 2. Transportadores MFS em espécies de <i>Candida</i> spp. com função de bomba de efluxo.....	15
Tabela 3. <i>Breakpoints</i> para definição do perfil de suscetibilidade dos isolados para os antifúngicos testados.....	26
Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) do teste de suscetibilidade dos isolados testados frente a diferentes antifúngicos azólicos.....	27
Tabela 5. Concentração inibitória mínima (CIM) no teste de suscetibilidade dos isolados testados frente a diferentes antifúngicos azólicos, na ausência e na presença do inibidor de BEs, verapamil.....	29

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Histórico de desenvolvimento dos principais antifúngicos.....	5
Figura 2. Célula fúngica e os alvos dos agentes antifúngicos.....	6
Figura 3. Estrutura dos derivados azólicos.....	8
Figura 4. Mecanismos de resistência ao fluconazol em <i>Candida</i> spp.	10
Figura 5. Representação de transportadores ABC e MFS em <i>Candida</i> spp.	13
Figura 6. Possíveis formas de superar a resistência a drogas fúngicas mediada por efluxo.....	16
Figura 7. Infográfico de contaminação por compostos químicos em um ambiente aquático.....	19
Figura 8. Localização territorial da Laguna Tramandaí (RS, Brasil) com suas áreas de coleta em destaque.	21
Figura 9. Esquema ilustrativo das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) dos antifúngicos azólicos, utilizadas no experimento, para definir os testes de suscetibilidade pelo método de microdiluição.	23
Figura 10. Esquema ilustrativo do método de microdiluição seriada (CLSI, 2008), considerando o antifúngico na ausência ou na presença do inibidor verapamil.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	alfa
%	Percentual
°C	Grau Celsius
μg	Micrograma
μMol	Micromolar
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
atm	Atmosfera
ATP	Adenosina trifosfato
BEs	Bombas de efluxo
CaMdr1p	<i>Candida albicans Multidrug Resistance Protein</i>
CCCP	Carbonil cianeto 3-cloro-fenil-hidrazona
<i>cdr1, cdr2</i>	<i>Genes de Candida Drug Resistance</i>
Cdr1p	<i>Candida Drug Resistance Protein</i>
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CLZ	Clotrimazol
CTZ	Cetoconazol
D1/D2	Domínios de sequenciamento em leveduras
DMSO	Dimetilsulfóxido
ENZ	Efinaconazol
et al.	E outros
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLU1	<i>Fluconazole resistance gene</i>
FLZ	Fluconazol
g	Gramas
h	Horas
H ⁺	Íons de hidrogênio

ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
IFIs	Infecções fúngicas invasivas
ITS	Região <i>Internal Transcribed Spacer</i>
ITZ	Itraconazol
IVZ	Isavuconazol
MCZ	Miconazol
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
<i>mdr1</i>	<i>Gene multidrug resistance</i>
MFS	<i>Major facilitators superfamily</i>
min	Minutos
mL	Mililitros
NaCl	Cloreto de sódio
NBDs	Domínios de ligação aos nucleotídeos
nm	Nanômetro
P-gp	Glicoproteína P
pH	Potencial hidrogeniônico
PSZ	Posaconazol
R	Resistente
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
RPMI	Caldo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S	Sensível
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SDB	Sabouraud Dextrose Broth
SDD	Sensível dose-dependente
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
spp.	Espécies
TMDs	Domínio transmembranas
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USA	United States of America
VCZ	Voriconazol
VRP	Verapamil

LT03	Sigla de <i>Candida pseudolambica</i> isolada da Laguna Tramandaí
LT04	Sigla de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> isolada da Laguna Tramandaí
LT05	Sigla de <i>R. mucilaginosa</i> isolada da Laguna Tramandaí
LT15	Sigla de <i>R. taiwanensis</i> isolada da Laguna Tramandaí
LT19	Sigla de <i>Papiliotrema laurentii</i> isolada da Laguna Tramandaí
LT28	Sigla de <i>R. mucilaginosa</i> isolada da Laguna Tramandaí
LT34	Sigla de <i>R. taiwanensis</i> isolada da Laguna Tramandaí
M01	Sigla de <i>R. mucilaginosa</i> isolada da membrana de filtração da água da Laguna Tramandaí
M02	Sigla de <i>C. rugopelliculosa</i> isolada da membrana de filtração da água da Laguna Tramandaí
M04	Sigla de <i>C. haemulonii</i> isolada da membrana de filtração da água da Laguna Tramandaí
M05	Sigla de <i>R. mucilaginosa</i> isolada da membrana de filtração da água da Laguna Tramandaí
M06	Sigla de <i>C. blattae</i> isolada da membrana de filtração da água da Laguna Tramandaí
M08	Sigla de <i>Yarrowia lipolytica</i> isolada da membrana de filtração da água da Laguna Tramandaí
M09	Sigla de <i>C. pseudolambica</i> isolada da membrana de filtração da água da Laguna Tramandaí
M10	Sigla de <i>C. intermedia</i> isolada da membrana de filtração da água da Laguna Tramandaí
M11	Sigla de <i>C. haemulonii</i> isolada da membrana de filtração da água da Laguna Tramandaí
<i>erg 11</i>	Ergosterol biosynthesis gene 11
26S	Gene usado para sequenciar as leveduras

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional, aliado à falta de políticas públicas e educacionais, vem desenfreando sérios riscos ao meio ambiente e à saúde humana, pois leva ao crescimento do uso dos recursos naturais e, conseqüentemente, ao aumento da geração de resíduos. Em virtude disso, os ambientes aquáticos que circundam e, em muitos casos, abastecem as comunidades sofrem com a poluição e com o lançamento de efluentes domésticos, agrícolas e até industriais, afetando, direta ou indiretamente, não apenas a flora e a fauna locais, mas também as comunidades microbianas que ali habitam. Leveduras ambientais presentes nesses ecossistemas tendem a sofrer tais impactos e já foram reportadas como bioindicadoras da qualidade ambiental.

Estudos apontam que micro-organismos que eram considerados comensais e saprófitas passaram a patógenos emergentes. Em função disso, aumentam as possibilidades de esses micro-organismos adquirirem resistência a drogas antimicrobianas porventura lançadas no ambiente. Sabe-se que um dos principais mecanismos para o desenvolvimento de resistência a agentes antifúngicos azólicos consiste no desenvolvimento de bombas de efluxo ativas. Dentro desse contexto, acredita-se que o estudo desse mecanismo possa estar relacionado à desintoxicação celular e à sobrevivência das leveduras que habitam ambientes aquáticos com índices de poluição.

A maioria das análises ambientais enfatiza o monitoramento do perfil de sensibilidade de leveduras isoladas de amostras clínicas humanas, enquanto os trabalhos com leveduras isoladas do ambiente ainda são limitados. Isso demonstra a importância da realização de estudos para a melhor compreensão do fenômeno de resistência em amostras oriundas do ambiente aquático.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Frente ao exposto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a resistência a agentes antifúngicos em leveduras isoladas da Laguna Tramandaí-RS.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Comparar a resistência a antifúngicos em leveduras isoladas da Laguna Tramandaí com a resistência relatada na literatura para leveduras de origem clínica.
- II. Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos testados frente à presença e à ausência de uma substância inibitória de bombas de efluxo.
- III. Avaliar a presença de bombas de efluxo como possível mecanismo de resistência nas leveduras isoladas da Laguna Tramandaí.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Infecções fúngicas

As infecções fúngicas representam uma ameaça contínua e séria aos seres humanos, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Chai et al., 2011). Nas últimas décadas, o aumento dessas infecções ocorreu, significativamente, pela associação ao elevado índice de indivíduos submetidos a cirurgias de transplantes, quimioterapias para câncer e infecções por HIV (Prasad et al., 2016b; Chang et al., 2017).

Os patógenos oportunistas, endógenos (espécies do gênero *Candida*) ou adquiridos do ambiente (espécies dos gêneros *Cryptococcus* e *Aspergillus*), podem ser a causa de muitas infecções fúngicas (Chai et al., 2011). Algumas destas, consideradas superficiais, podem transformar-se em infecções sistêmicas com a incidência prolongada da doença, ameaçando a vida do indivíduo (Cannon et al. 2009; Brown et al., 2012).

Chang et al. (2017) relatam que aproximadamente 1,2 bilhão de pessoas no mundo é acometida por infecções fúngicas. Dentre estas, também chamadas de micoses, destacam-se as candidíases, causadas pelos fungos do gênero *Candida*, com índices elevados na gravidade da doença e pela proporção de casos evidenciados mundialmente. Os gêneros *Aspergillus* (associados à aspergilose) e *Cryptococcus* (associados à meningite criptocócica) também são frequentemente associados às infecções fúngicas invasivas (IFIs) e são considerados fatais (Pfaller e Diekema, 2007). As IFIs podem atingir o sistema nervoso central, órgãos como rins, pulmões e fígado, assim como a corrente sanguínea (Chang et al., 2017).

A terapia antifúngica adota o uso de diferentes classes de drogas para combater tais infecções, os chamados agentes antifúngicos. Grande parte desses agentes é direcionada para atingir o ergosterol da célula fúngica, um lipídeo presente na membrana celular, responsável pela fluidez e pela permeabilidade de sua membrana, atuando com função similar ao colesterol nas células animais (Bhattacharya et al., 2016; Campoy e Adrio, 2017; Chang et al., 2017; Scorzoni et al., 2017).

Prasad et al. (2006) apontam que as infecções fúngicas são tratadas, comumente, com as equinocandinas ou derivados azólicos. Contudo, o uso difundido

e prolongado de fármacos antifúngicos procede no desenvolvimento de tolerância não apenas ao medicamento em uso, mas também resulta em maior resistência colateral a outros medicamentos. Esse desenvolvimento de resistência contra um espectro de drogas que não compartilham nem um alvo comum nem uma estrutura comum é denominado resistência a múltiplas drogas (MDR). A resistência intrínseca e adquirida a agentes antifúngicos é um problema clínico crescente, o que dificulta a terapia antifúngica. O combate à MDR representa um grande desafio para os clínicos, uma vez que é um fenômeno multifatorial, no qual uma combinação de mecanismos poderia colaborar no desenvolvimento da tolerância a drogas (Chai et al., 2011).

3.2 Agentes antifúngicos e seus mecanismos de ação

O método terapêutico antifúngico, em comparação às terapias antibacterianas, é bastante limitado. A disponibilidade limitada de antifúngicos é um grande impedimento para o tratamento efetivo de infecções fúngicas (Vandeputte et al. 2012). Isso se deve ao fato de que a geração de novos antifúngicos ficou para trás em comparação com o ritmo de emergência de infecções fúngicas (Prasad et al., 2016a). A Figura 1 apresenta um histórico de desenvolvimento dos principais antifúngicos.

Campoy e Adrio (2017) destacam cinco principais classes de drogas antifúngicas, utilizadas via oral, tópica ou intravenosa, sendo elas: 1) os derivados poliênicos B; 2) o análogo da pirimidina; 3) os derivados azólicos, como fluconazol, itraconazol e cetoconazol; 4) as equinocandinas; 5) as alilaminas. Na prática clínica, destacam-se os derivados azólicos por serem consideradas as drogas antifúngicas mais usuais no tratamento de micoses.

A terapia antifúngica baseia-se na atuação nos sítio-alvos de cada fármaco, agindo na parede celular, na síntese de DNA e proteínas e, singularmente, na membrana citoplasmática (Odds et al., 2003; Scorzoni et al., 2017). Os alvos dos agentes antifúngicos utilizados são resumidos na Figura 2.

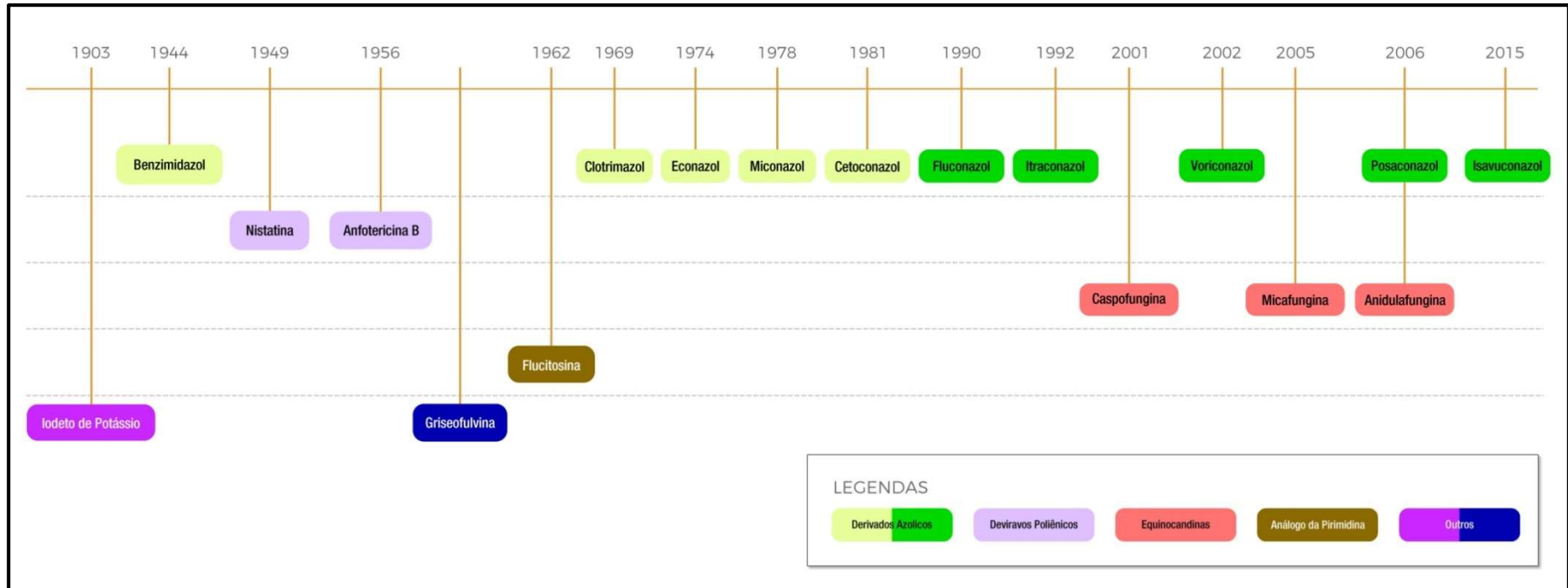


Figura 1. Histórico de desenvolvimento dos principais antifúngicos.

Fonte: Adaptada de Sheehan et al., 1999; Chang et al., 2017.

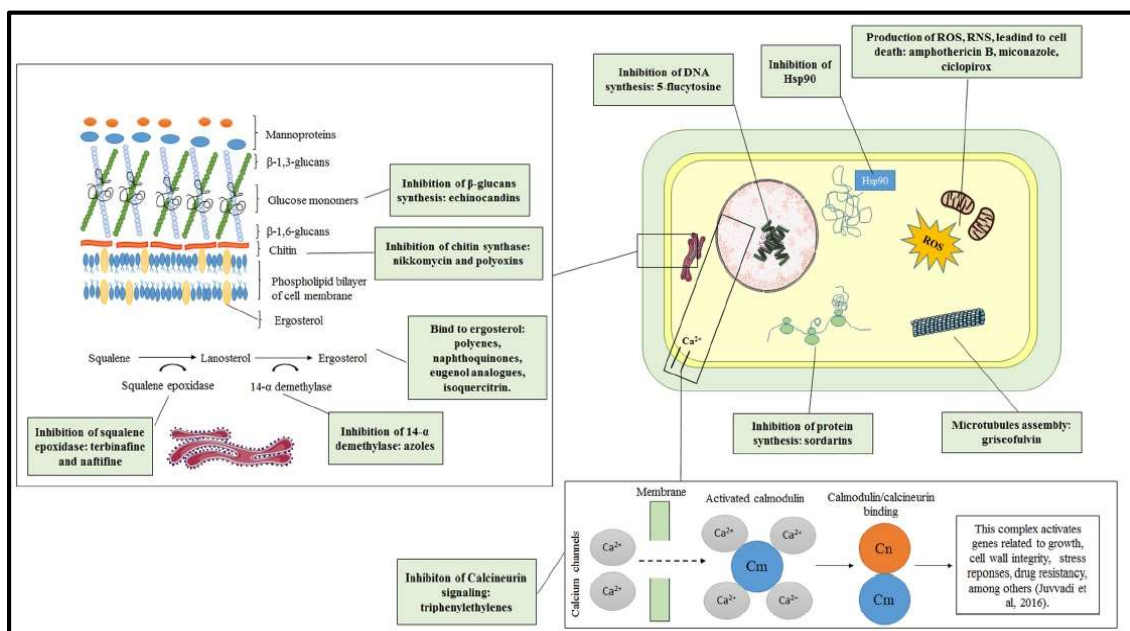


Figura 2. Célula fúngica e os alvos dos agentes antifúngicos.

Fonte: Scorzoni et al., 2017.

Discutir-se-ão, brevemente, os mecanismos de ação de cada uma das classes de antifúngicos citadas neste estudo.

3.2.1 Derivados Poliênicos

Os derivados poliênicos são considerados drogas naturais, pois são produzidos a partir da bactéria do gênero *Streptomyces*. Anfotericina B e nistatina são representantes dessa classe e apresentam seu mecanismo de ação na membrana da célula fúngica, através de sua complexação com o ergosterol, presente nessa membrana, promovendo o aumento na permeabilidade celular com a formação de canais transmembranares, por onde ocorre o extravasamento do conteúdo celular, o que leva à morte do micro-organismo (Flevari et al., 2013).

A anfotericina B, embora tenha sido isolada pela primeira vez em 1956 do *Streptomyces nodosus*, ainda permanece como o principal fármaco fungicida mais efetivo e de amplo espectro para o tratamento de micoses sistêmicas. Há poucos relatos de resistência, seja ela intrínseca, seja adquirida. Na tentativa de aumentar sua eficácia terapêutica e de reduzir a sua toxicidade, a anfotericina B tem sido combinada com outros antifúngicos (Pianalto e Alspaugh, 2016).

3.2.2 Análogo da Pirimidina

Com propriedade fungistática, um análogo da pirimidina é a flucitosina (5-fluorocitosina), responsável por inibir a síntese de DNA e de RNA (Pianalto e Alspaugh, 2016). Considerada um antifúngico sintético, possui efeitos citostáticos e altas taxas de resistência durante a monoterapia, sendo raramente usada como único agente para o tratamento de infecções fúngicas. No entanto, demonstrou ser altamente eficaz em combinação com anfotericina B no tratamento da meningite criptocócica (Dromer et al., 2008).

O transporte da flucitosina ocorre para o interior da célula fúngica, por intermédio da citosina permease, em que então será convertida a 5-fluorouracil pela enzima citosina desaminase. A síntese proteica poderá ser interrompida a partir de fosforilações que a 5-Fluorouracil possa vir a sofrer (Denning e Hope, 2010).

3.2.3 Derivados Azólicos

A terapia antifúngica foi impulsionada com a descoberta do benzimidazol, em 1944. A partir desse momento, muitas pesquisas foram desenvolvidas a fim de descobrir a propriedade antimicótica dos derivados azólicos.

Os derivados azólicos são altamente utilizados no tratamento e na prevenção de micoses devido ao seu amplo espectro de atividade. Agem inibindo a biossíntese do ergosterol a enzima 14- α desmetilase do citocromo P450, codificado pelo gene *erg11*, que converte o lanosterol em ergosterol na membrana celular, de modo a inibir o crescimento fúngico e a replicação (Campoy e Adrio, 2017). Os azólicos afetam a integridade das membranas fúngicas, alterando sua morfologia e inibindo seu crescimento (Kathiravan et al., 2012).

Os azólicos são moléculas orgânicas cíclicas que podem ser classificadas em dois grupos: imidazóis e triazóis (Figura 3). Imidazóis (clotrimazol - CLZ, miconazol - MCZ e cetoconazol - CTZ) foram os primeiros azólicos a serem desenvolvidos e apresentam dois átomos de nitrogênio junto ao anel azólico (Shukla et al., 2016). No entanto, devido à sua alta toxicidade, aos efeitos colaterais graves e às inúmeras interações com outras drogas, foram

substituídos pelos triazóis. A primeira geração dos triazóis, como o fluconazol (FLZ) e o itraconazol (ITZ), exibe uma atividade antifúngica mais ampla em comparação com os imidazóis e tem melhores perfis de segurança. Segundo alguns pesquisadores, a ação fungistática dos azólicos está acarretando no aumento da sua resistência (Denning e Hope, 2010; Campoy e Adrio, 2017).

Para solucionar os problemas apresentados pelos triazóis de primeira geração, foi desenvolvida uma segunda geração. A *Food and Drug Administration* (FDA), sediada nos Estados Unidos, aprovou o voriconazol (VCZ) e o posaconazol (PSZ) em 2002 e 2006, respectivamente. Eles são considerados fungicidas e têm um amplo espectro de atividades (Pianalto e Alspaugh, 2016). Voriconazol tornou-se a droga antifúngica de primeira escolha para o tratamento de aspergilose por *A. fumigatus*, uma vez que sua atividade é superior aos demais antifúngicos para essa infecção. Posaconazol é o azólico com a atividade mais ampla e foi aprovado pelo FDA para profilaxia contra infecções invasivas por *Aspergillus* e *Candida* (Pianalto e Alspaugh, 2016; Campoy e Adrio, 2017).

Efinaconazol (ENZ) é uma solução antifúngica tópica ativa contra dermatófitos e não dermatófitos, para o tratamento de micoses nas unhas, sendo aprovado pelo FDA em 2014. Em 2015, a FDA aprovou o isavuconazol (IVZ), triazol mais recente dessa classe, para o tratamento oral e intravenoso de vírus invasivos (Campoy e Adrio, 2017) e para o tratamento da aspergilose invasiva e da mucormicose invasivas (Chang et al., 2017). O isavuconazol manifesta atividade em espécies de *Candida* spp., *Cryptococcus gattii*, *C. neoformans* e *Aspergillus* spp., principalmente (Chang et al., 2017).

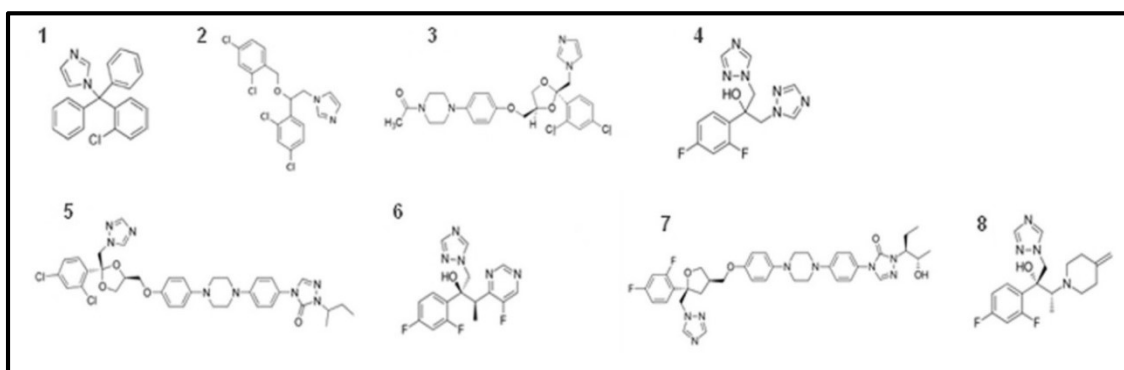


Figura 3. Estrutura dos derivados azólicos

(1: clotrimazol; 2: miconazol; 3: cetoconazol; 4: fluconazol; 5: itraconazol; 6: voriconazol; 7: posaconazol; 8: efinaconazol).

Fonte: Adaptado de Campoy e Adrio (2017).

3.2.4 Equinocandina

Atualmente, três antifúngicos sintéticos são aprovados para uso clínico: caspofungina, micafungina e anidulafungina. As equinocandinas apresentam baixa toxicidade ao hospedeiro e poucas interações medicamentosas. Seu mecanismo de ação tem como alvo a parede celular de fungos pela inibição da enzima β -1,3-D-glicana sintase, conduzindo à lise celular e à variabilidade osmótica (Denning & Hope, 2010; Pianalto e Alspaugh, 2016).

3.2.5 Alilaminas

Os membros importantes dessa classe incluem a terbinafina e a naftifina. Esses agentes fungicidas sintéticos bloqueiam a biossíntese do ergosterol já que são inibidores reversíveis e não competitivos do esqualeno epoxidase (*erg1*). Essa enzima catalisa a conversão do esqualeno em epóxido de 2,3-esqualeno, e a sua inibição leva ao acúmulo de esqualeno, que pode aumentar a permeabilidade da membrana, levando à perturbação da organização celular (Campoy e Adrio, 2017).

3.3 Derivados azólicos e seus mecanismos de resistência

Perlin et al. (2015) definiram resistência como um possível resultado da seleção de cepas inerentemente menos suscetíveis, ou da aquisição por cepas suscetíveis de resistência a drogas durante a terapia. Alguns pesquisadores definem ainda a resistência como primária, quando essa característica é intrínseca à espécie, sem que haja uma primeira exposição à droga – como, por exemplo, a resistência de *Candida krusei* ao FLZ –; ou secundária, quando relacionada com a aquisição de resistência frente à exposição aos agentes antifúngicos durante um tratamento, podendo também ser chamada de resistência adquirida (Pfaller et al., 2010; Shor e Perlin, 2015; Chang et al., 2017). Em função disso, nas últimas décadas, tem sido relatada uma crescente preocupação sobre a resistência adquirida a drogas antifúngicas envolvendo resistência aos azólicos (Medeiros et al., 2008; Silva et al., 2012).

Os derivados azólicos são os antifúngicos mais utilizados devido ao seu alto índice terapêutico; entretanto, são fungistáticos, e não fungicidas contra leveduras patogênicas, o que leva à resistência aos azóis em infecções

prolongadas (Balkis et al., 2002; Bondaryk et al., 2013).

Em leveduras de origem clínica, a resistência aos antifúngicos da classe dos derivados azólicos é causada, principalmente, pelo aparecimento de mudanças qualitativas na enzima-alvo (através da superexpressão e/ou de mutações pontuais no gene *erg11*), pela possibilidade de alterações em outras enzimas da biossíntese do ergosterol (*erg1*, *erg3*), pela alteração na composição da parede externa e pela ativação de bombas de efluxo. Embora esses mecanismos possam ocorrer simultaneamente (Figura 4), no interior ou na membrana das células fúngicas, a maioria dos pesquisadores categoriza-os em grupos (Scorzoni et al., 2017; Revie et al., 2018), os quais serão detalhados a seguir:

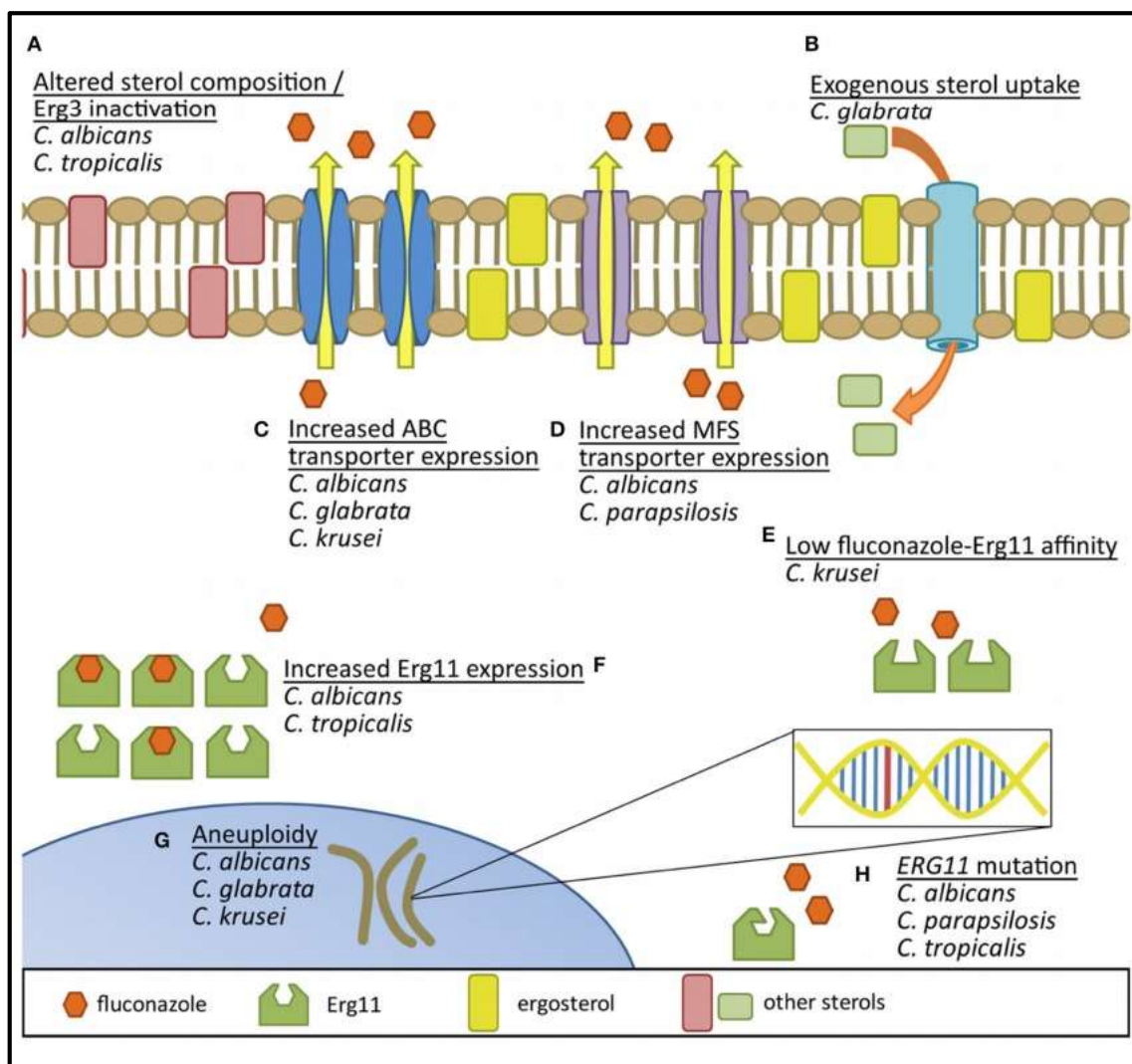


Figura 4. Mecanismos de resistência ao fluconazol em *Candida* spp.

(A) Inativação do Erg3 (B) Absorção de esteróis exógenos (C) Bombas de efluxo ABC (D) Bombas de efluxo MFS (E) Baixa afinidade do fluconazol ao Erg11 (F) Aumento da expressão da proteína Erg11 (G) Aneuploidia (H) Mutações no ERG11.

Fonte: Whaley et al., 2017.

3.3.1 Mudanças qualitativas na enzima-alvo

O gene *erg11* codifica a enzima alvo dos azólicos, a lanosterol 14 α -desmetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica (Bondaryk et al., 2013; Perlin et al., 2015; Scorzoni et al., 2017). A partir disso, mutações pontuais nesse gene alteram o sítio de ligação dos azólicos, resultando em uma diminuição da afinidade ou na incapacidade de ligação entre fármaco-enzima (Pfaller, 2012). É relevante frisar que existem alguns fenótipos de resistência que somente se expressarão quando uma determinada mutação ocorrer simultaneamente à outra, ou de forma combinada a outras, na sequência do gene *erg11*.

O aumento da expressão do gene *erg11* força a necessidade do acúmulo de moléculas alvo da enzima lanosterol 14 α -desmetilase no ambiente intracelular e, conseqüentemente, acarreta a necessidade de quantidades maiores de antifúngico para inibir a atividade da enzima (Pfaller et al., 2012). Com a exposição do FLZ, pode haver um mecanismo de *feedback* em resposta à depleção do ergosterol, ocorrendo uma superexpressão do gene *erg11* (Tobudic et al., 2012).

3.3.2 Alteração na biossíntese do ergosterol

Outro mecanismo descrito na literatura sobre a resistência dos azólicos diz respeito à alteração de outras enzimas da mesma via biossintética, o que resulta em acúmulo de esteróis não tóxicos que podem substituir o ergosterol da célula, assim como ocorre a alteração na enzima lanosterol 14 α -desmetilase (Pfaller, 2012; Perlin et al., 2015). A exposição aos azólicos resulta na diminuição do ergosterol da membrana dos fungos e no acúmulo do produto 14 α -metil-3,6-diol, o qual inibe o crescimento fúngico. A mutação do gene *erg3* impede a formação do produto 14 α -metil-3,6-diol a partir de 14 α -metilfecosterol, acumulando precursores que podem substituir o ergosterol da célula. Esses dois fatores levam a membranas funcionais e contribuem para o desenvolvimento da resistência (Tobudic et al., 2012). Além disso, Scorzoni et al. (2017) relatam que mutações nos genes *erg2*, *erg6* e *erg24* podem estar ligadas à redução da suscetibilidade aos derivados azólicos.

3.3.3 Ativação de bombas de efluxos

Um importante mecanismo de resistência aos derivados azólicos é desencadeado pela redução do fármaco nas células fúngicas, ocasionando a expulsão destes para fora das células através de transportadores de membranas, também chamados de bombas de efluxo (BEs) (Scorzoni et al., 2017; Revie et al., 2018).

Na literatura, destacam-se duas classes principais de proteínas transportadoras de BEs, encontradas em *Candida* spp., responsáveis por modular a resistência aos azólicos: (a) a superfamília das proteínas *ATP binding cassette* (ABC), codificadas pelos genes *cdr1* e *cdr2* (*Candida Drug Resistance*); e (b) a superfamília dos transportadores de membrana *major facilitators superfamily* (MFS), codificadas pelo gene *mdr1* (*Multidrug Resistance*). Quase todos os derivados azólicos conferem resistência em função da regulação positiva de *cdr1* e *cdr2*, já o *mdr1* confere-a apenas ao FLZ (Kanafani e Perfect, 2008; Prasad et al., 2016b).

Cannon et al. (2009) descrevem que as proteínas ABC são transportadores primários, os quais, para obter energia e para bombear substratos da célula, hidrolisam moléculas de ATP (Figura 5), enquanto as bombas MFS são transportadores secundários, que transportam substratos através de uma membrana em troca de íons H^+ (Figura 6) e utilizam a força gerada através da agitação desses íons da membrana plasmática. A especificidade do substrato, nas proteínas ABC, será realizada a partir dos domínios de ligação de nucleotídeos e dos domínios transmembranas, enquanto, para as bombas MFS, a especificidade dar-se-á apenas por conta desses domínios.

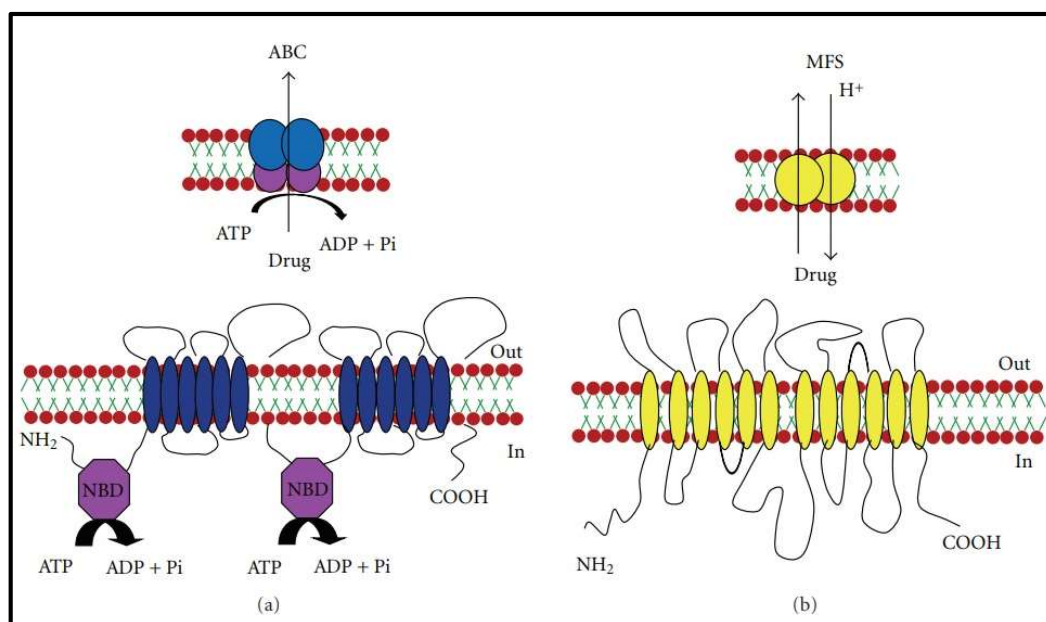


Figura 5. Representação dos transportadores (a) ABC e (b) MFS em *Candida* spp.

Fonte: Prasad et al., 2011.

As proteínas do tipo ABC são encontradas, constantemente, nas membranas plasmáticas das células de todos os organismos, mas também podem estar presentes nas das organelas. Já as proteínas do tipo MFS exibem alto grau de similaridade de sequência entre os diferentes reinos, estando presentes nas células de animais, plantas, fungos e bactérias (Cannon et al., 2009). Ambas as classes de transportadores são proteínas integrantes de membranas com domínios funcionais distintos. Transportadores ABC contêm dois domínios transmembranas (TMDs), responsáveis pela formação de um poro (entre a proteína e a membrana) através do qual o transporte de substratos/drogas ocorre. Possuem também dois domínios de ligação a nucleotídeos (NBDs), responsáveis pelo fornecimento de um compartimento molecular em que a energia será liberada, enquanto os transportadores MFS possuem apenas TMDs (Ponte-Sucre, 2007; Prasad et al., 2016b).

Tanto os transportadores ABC quanto os MFS são capazes de transportar uma grande variedade de elementos que incluem íons, esteroides, açúcares, aminoácidos, vitaminas, peptídeos (Prasad e Rawal, 2014). No entanto, os transportadores ABC pertencentes às subclasses MDR, MRP e PDR estão, frequentemente, associados à resistência antifúngica (Prasad e Goffeau, 2012). Prasad et al. (2016b) apontam que há 28 transportadores do tipo ABC no

genoma de *C. albicans*, sendo a Cdr1p (*Candida Drug Resistance Protein*) a proteína mais importante. A sua superexpressão (devido à superexpressão do gene *cdr1*) está relacionada com a resistência aumentada a drogas e o aumento do efluxo do fármaco, após longo período de tratamento antifúngico (Sanglard et al. 2009). Diversos agentes antifúngicos podem ser substratos para os transportadores MFS, e, assim, sua superexpressão pode levar à resistência cruzada entre diferentes drogas, particularmente as azólicas (Ramage et al., 2012).

Algumas das principais proteínas de bomba de efluxo envolvidas na resistência dos derivados azólicos, pertencentes à subfamília PDR, dos transportadores ABC, estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Transportadores ABC em espécies de *Candida* spp. com função de bomba de efluxo.

Organismo	Subfamília ¹	Nome do gene	Tamanho ²	Local ³	Referência
<i>C. albicans</i>	PDR	<i>cacdr1</i>	1501	MP	Prasad et al. (1995) e Smriti et al. (2002)
		<i>cacdr2</i>	1499	MP	Sanglard et al. (1997) e Smriti et al. (2002)
		<i>cacdr99</i>	683	ND	Gaur et al. (2005)
	MRP	<i>cayor1</i>	1606	MP	Ogawa et al. (1998)
<i>C. glabrata</i>	PDR	<i>cgcdr1</i>	1499	MP	Sanglard et al. (1999)
		<i>pdh1 (cgcdr2)</i>	1542	ND	Miyazaki et al. (1998)
		<i>cgsnq2</i>	1507	ND	Torelli et al. (2008)
<i>C. dubliensis</i>	PDR	<i>cdcdr1</i>	1501	ND	Moran et al. (1998)
		<i>cdcdr2</i>	1500		
<i>C. krusei</i>	ND	<i>ckabc1</i>	ND	ND	Katiyar and Edlind (2001)
		<i>ckabc2</i>			
<i>C. lusitanae</i>	ND	<i>abc9</i>	ND	ND	Reboutier et al. (2009)
		<i>abc12</i>			
		<i>abc15</i>			
		<i>abc16</i>			
<i>C. tropicalis</i>	PDR	<i>ctcdr1</i>	1472	ND	Yong et al. (2006)

¹ nomes baseados conforme similaridade de sequências dos transportadores ABC em humanos

² número residual de aminoácidos

³ MP = membrana plasmática; ND = não definido

Fonte: Adaptado de Prasad et al., 2016b.

Em comparação às proteínas ABC, há 95% de proteínas do tipo MFS no genoma de *C. albicans*, agrupadas em 17 famílias (Gaur et al., 2008). Dentre todas as proteínas MFS, apenas as CaMDR1 e as FLU1 estão envolvidas no efluxo de células de *C. albicans* (Prasad et al., 2016b). Por outro lado, de todas as proteínas MFS que existem no genoma de *C. albicans*, apenas a superexpressão de CaMdr1p tem sido associada à resistência clínica aos azólicos (Braun et al., 2005). Os principais transportadores MFS que atuam no transporte e na resistência às drogas estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Transportadores MFS em espécies de *Candida* spp. com função de bomba de efluxo.

Organismo	Família	Nome do gene	Resistência ao	Referência
<i>C. albicans</i>	DHA1	<i>CaMDR1</i>	Fluconazol	Pasrija et al. (2007)
<i>C. glabrata</i>		<i>CgMDR1</i>	Fluconazol	Sanglard et al. (1999)
		<i>CgQDR2</i>	Miconazol, tioconazol, clotrimazol, cetoconazol	Costa et al. (2013)
<i>C. dublinensis</i>		<i>CdMDR1</i>	Fluconazol	Moran et al. (1998)

Fonte: Adaptado de Prasad et al., 2016b.

3.4 Inibidores de bombas de efluxo

Com a caracterização dos transportadores de proteínas e a identificação da sua importância na resistência frente aos agentes antifúngicos de uso clínico, surgiu o interesse em compostos que atuam como inibidores de bombas de efluxo (BEs) (Figura 6). É possível avaliar fenotipicamente a expressão das BEs através de compostos que agem inibindo as suas funcionalidades (Cannon et al., 2009).

A inibição de BEs por quimiossensibilizadores é uma abordagem promissora para superar a resistência aos medicamentos. Esses moduladores podem inibir os transportadores ABC por interações específicas, diminuindo o nível de ATP intracelular, crucial para o funcionamento da bomba, ou afetando a composição da membrana plasmática (Bartosiewicz e Krasowska, 2009).

Muitos moduladores da resistência a múltiplas drogas foram identificados, tais como: bloqueadores dos canais de cálcio, calmodulina, esteroides, inibidores da proteína quinase C, imunossupressores, fenotiazinas,

alcaloides indólicos, detergentes e surfactantes (Ozben, 2006). A atividade das BEs pode também, ser modulada por outras drogas, como antibacterianas (rifampicina), citotóxicas (doxorrubicina) e antidopaminérgicas (fenotiazinas), (Kolaczowski et al., 2003; Vogel et al., 2008; Kofla et al., 2011). A presença de um inibidor de BEs faz com que a CIM diminua quando a resistência estiver correlacionada a esse mecanismo (Guinea et al., 2006).

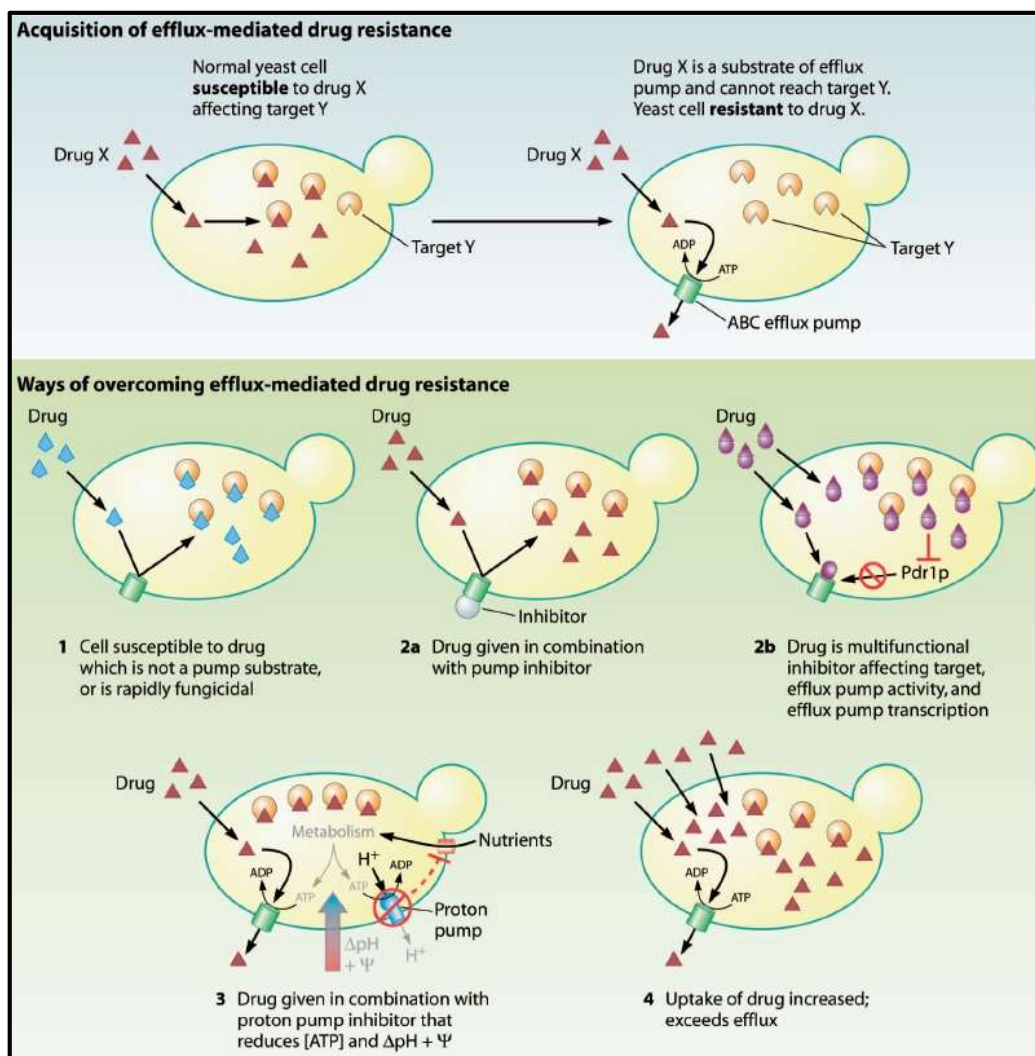


Figura 6. Possíveis formas de superar a resistência a drogas fúngicas mediada por efluxo.

Fonte: Cannon et al., 2009.

Os inibidores dos transportadores ABC são classificados em três gerações. A primeira geração dos inibidores de bomba inclui compostos que já são utilizados para outros tratamentos, mas também capazes de bloquear a glicoproteína P (P-gp), como o verapamil e a ciclosporina A. Esses compostos

têm baixa afinidade para os transportadores ABC e geralmente competem com os medicamentos transportados pelo sítio de ligação, o que requer o uso de doses altamente tóxicas dos moduladores (Piecuch e Oblak, 2014). Os inibidores de segunda geração foram desenvolvidos para diminuir a resistência aos fármacos, sendo menos tóxicos; entretanto, ainda produzem efeitos colaterais. Já os de terceira geração ainda estão em desenvolvimento (Ponte-Sucre, 2007).

Alguns estudos foram realizados com o intuito de investigar o efeito *in vitro* da atividade antifúngica frente a diferentes compostos. A eficácia clínica destes é limitada pela sua toxicidade; por exemplo, o Verapamil (VRP) produz citotoxicidade cardíaca na concentração necessária para inibir a resistência a drogas (Krishna e Mayer, 2000; McKeegan et al., 2004). Para Cannon et al. (2009), a partir da descoberta da P-gp, muitos compostos foram identificados com a capacidade de mediar a resistência ao efluxo de muitas drogas, entre os quais se destacam os moduladores de canais de cálcio, como o VRP. Ponte-Sucre (2007) sugere o uso de inibidores naturais como os flavonoides extraídos de plantas. Essas substâncias são muitas vezes mais ativas do que o inibidor VRP, uma vez que apresentam baixa toxicidade.

Guinea et al. (2006) avaliaram a atividade de BEs utilizando como inibidor o CCCP (carbonil cianeto 3-cloro-fenil-hidrazona). Eles testaram suas cepas antes e depois de adicionarem o CCCP, a uma concentração final de 0,5 mg/mL. Ao todo, foram 32 cepas de *Candida* sp. isoladas da urina, da mucosa, do trato respiratório, do sangue, do cateter, do fluido e da ferida. Entretanto, constataram que apenas uma das 22 cepas analisadas obteve redução significativa da CIM com FLZ após tratamento com o inibidor CCCP.

Bianchin et al. (2019) analisaram o estudo das BEs do tipo ABC, em amostras de *Candida* sp. na presença e na ausência do inibidor VRP, e constataram a redução da CIM em três amostras, correlacionando o mecanismo de resistência com a presença das BEs. Em nosso ensaio, o papel das BEs foi avaliado usando como inibidor o VRP (Fagron), responsável por bloquear os canais de cálcio. Esse inibidor é responsável por diminuir a CIM quando a resistência do isolado está correlacionada com bombas de efluxo ABC e/ou MDR (Guinea et al., 2006; Pippi et al., 2015). Além disso, o VRP tem atividade *in vitro* contra a formação e a manutenção de biofilme por *Candida* spp. e atua

sinergicamente com antifúngicos contra a formação de biofilmes (Yu et al., 2013).

3.5 Resistência a antifúngicos em leveduras ambientais

As leveduras são organismos unicelulares, eucariotos, comuns em diferentes tipos de ambientes aquáticos, incluindo corpos de água marinha, estuarina e rios, livres ou em associação a outros organismos vivos, a sedimentos ou à matéria orgânica (Nagahama, 2006). As comunidades de leveduras em água não poluída são dominadas por populações esparsas de espécies não fermentadoras, enquanto as águas poluídas são dominadas por espécies fermentadoras, incluindo patógenos oportunistas (Hagler e Ahearn, 1987).

Nas últimas décadas, a presença de leveduras em ambientes aquáticos associadas à contaminação tem sido evidenciada com maior frequência (Nagahama, 2006; Medeiros et al., 2008; Brandão et al., 2010; Brilhante et al., 2016; Monpathi, 2017) (Figura 7). No entanto, há pouco interesse nessa questão, uma vez que o consumo de água com leveduras raramente levará a um quadro clínico de risco. Vários trabalhos apontam riscos à saúde de pacientes imunocomprometidos devido ao comportamento patógeno-oportunista de algumas leveduras presentes no ambiente aquático (Pfaller e Diekema, 2007; Monpathi et al., 2017).

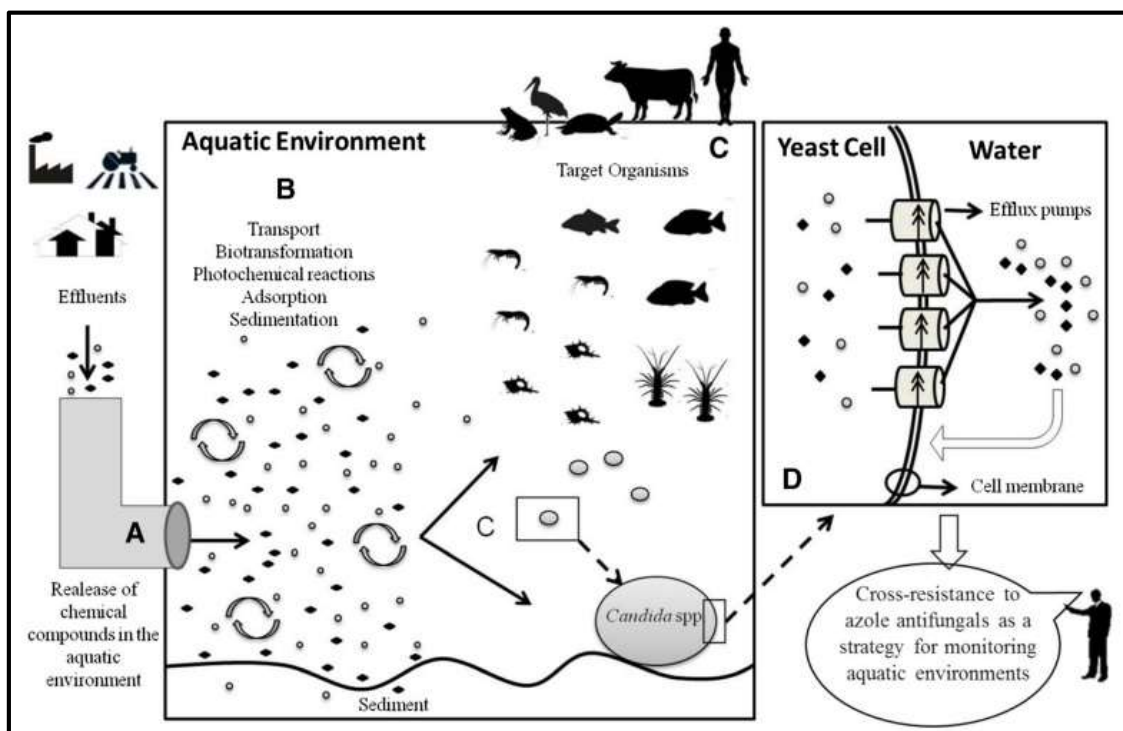


Figura 7. Infográfico de contaminação por compostos químicos (resíduos industriais, agrícolas e residenciais) (A); em um ambiente aquático (B); atingindo diferentes organismos (C); dentre esses, as células de *Candida* spp. (D).

Fonte: Brilhante et al. (2015).

Silva-Bedoya et al. (2014) apontam que as leveduras podem ser potencialmente encontradas em todos os ambientes aquáticos, com predomínio das espécies pertencentes aos gêneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* e *Trichosporon*, com destaque às espécies *C. famata*, *R. mucilaginosa*, *Cryptococcus laurentii* e *T. beigeli* (Brilhante et al., 2015).

Com relação ao perfil de suscetibilidade de leveduras, muitos estudos são realizados a partir de amostras clínicas e servem como parâmetros às análises ambientais (Pfaller et al., 2010; Brilhante et al, 2011; Brilhante et al, 2015; Brilhante et al, 2016). Em contrapartida, alguns estudos demonstraram a alta frequência de isolados de *Candida* spp. resistentes a agentes antifúngicos, principalmente à classe dos derivados azólicos, proveniente de ambientes aquáticos (Medeiros et al., 2008; Brandão et al., 2010; Brilhante et al, 2010; Castelo-Branco et al., 2013; Brilhante et al., 2015).

Há relatos de antifúngicos azólicos utilizados na agricultura, em

materiais de revestimento em construção, em produtos farmacêuticos e em objetos domésticos (Snelders et al., 2009). Azevedo et al. (2015) apontam que, em consequência da estabilidade e do uso indiscriminado dos antifúngicos, estes podem permanecer no meio ambiente, contaminando o solo, o ar e a água. Para Chen e Ying (2015), uma das principais fontes de contaminação da água por antifúngicos azólicos é o esgoto doméstico, pois, mesmo com o tratamento, muitos dos compostos desses agentes não são eliminados.

3.6 Laguna Tramandaí

A Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí, local onde foram realizadas as coletas dos isolados, está inserida na Região Hidrográfica Costeira do Sul, contendo mais de 40 lagoas costeiras e diversos trechos de rio e nascentes. Entre as lagoas, está a Laguna Tramandaí (Figura 8), com 18,5 Km², entre os municípios de Tramandaí e Imbé, no litoral norte do estado do Rio Grande do Sul, com conexão direta ao oceano e com influência do Rio Tramandaí. No estuário desse rio, as águas doces advindas dos subsistemas norte e sul da bacia hidrográfica encontram as águas salgadas do oceano Atlântico, transformando-se em águas salobras. Segundo Castro e Mello (2013), em função da ligação da laguna com o rio Tramandaí e em conjunto com a Lagoa do Armazém, há formação de um complexo chamado lagunar Armazém-Tramandaí. As águas desses sistemas desembocam na laguna e podem movimentar nutrientes e diversos sedimentos, possibilitando ao estuário do Rio Tramandaí a manutenção e o crescimento das mais variadas formas de vida microbiana.

As Áreas de Preservação Permanente no entorno do estuário são impactadas por atividade antrópica, como silvicultura, cultivo de arroz, pecuária, extração de areia e expansão urbana. Como é região de veraneio, sofre influência direta do aumento populacional no verão, com agravamento dos problemas relacionados ao deficiente tratamento de esgoto urbano (Lanzer et al., 2013). Pelas características expostas, a Laguna Tramandaí é uma região modelo para avaliação do impacto antrópico na diversidade e da suscetibilidade a agentes antifúngicos de leveduras ambientais.

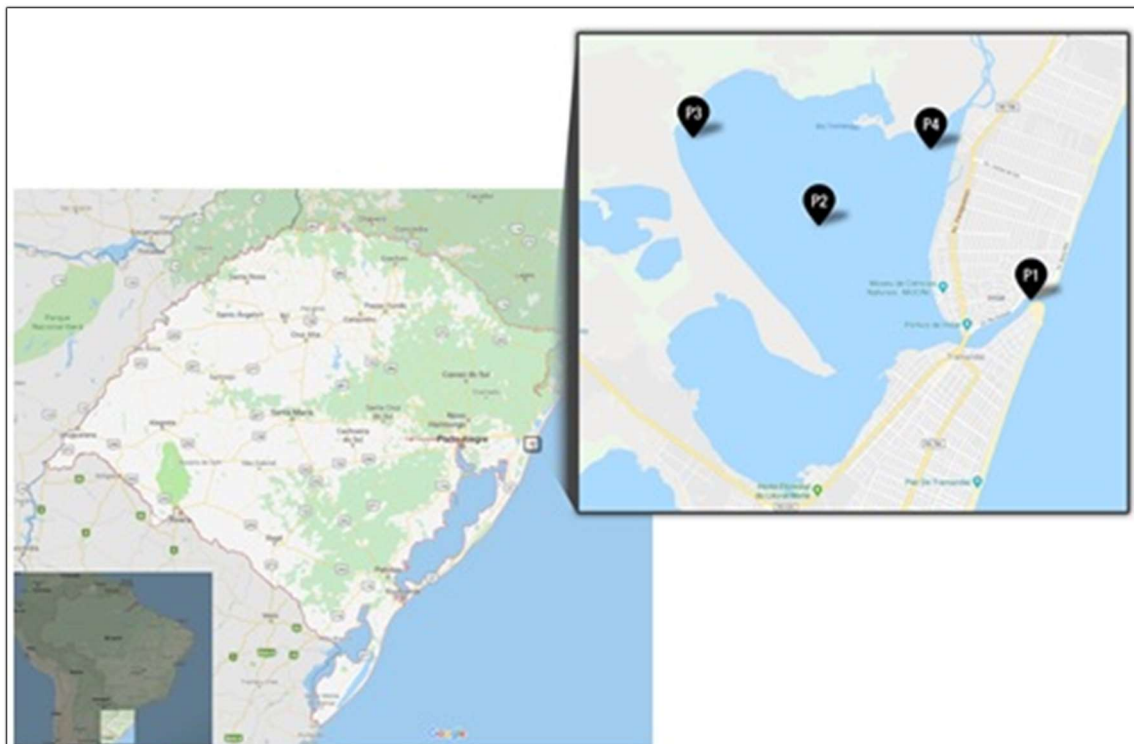


Figura 8. Localização territorial da Laguna Tramandaí (RS, Brasil) com suas áreas de coleta em destaque.

Fonte: Google Earth, 2019.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da realização da pesquisa

Os experimentos do presente estudo foram realizados no Laboratório de Micologia Ambiental do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.2 Seleção dos microrganismos

Os micro-organismos selecionados para uso na pesquisa foram leveduras ambientais, isoladas da Laguna Tramandaí, no período de agosto de 2017 a agosto de 2018, mantidas na coleção de culturas de leveduras do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFRGS (Registro SISGEN n. C09556C) e identificadas por sequenciamento das regiões D1/D2 do 26S rDNA ou ITS. Os isolados foram selecionados por apresentarem resistência aos agentes antifúngicos em outros estudos do nosso grupo de pesquisa (Danielle Pagani, comunicação pessoal). Ao todo, foram testadas 16 leveduras ambientais: *Candida pseudolambica* (LT03 e M09), *C. rugopelliculosa* (M02), *C. intermedia* (M10), *C. haemulonii* (M04 e M11), *C. blattae* (M06), *Rhodotorula mucilaginosa* (LT04, LT05, LT28, M01 e M05), *R. taiwanensis* (LT15 e LT34), *Papiliotrema laurentii* (LT19) e *Yarrowia lipolytica* (M08). Um isolado de *C. glabrata* (CGRL22), da coleção de fungos do laboratório de Micologia Aplicada da UFRGS, foi utilizado como controle do teste com verapamil (Fagron, USA) descrito no item 4.6, além da cepa padrão de *C. krusei* ATCC 6258 como controle do experimento (CLSI, 2008).

4.3 Meios de cultura e soluções

Para reativar as células dos isolados selecionados, uma vez que estas estavam à temperatura de -6°C, foi necessário preparar o Sabouraud Dextrose Broth (SDB) e o Sabouraud Dextrose Agar (SDA) conforme recomendações do fabricante (Kasvi, Brasil).

O caldo RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich) foi preparado conforme as normas de padronização publicadas no documento de M27-A3 do *Clinical*

Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Já a solução salina 0,85% foi preparada com Cloreto de Sódio P.A (NaCl) da Vetec Química Fina. A cada 100 mL de água destilada, pesou-se 0,85 g do NaCl. Essa solução, o ágar e os caldos descritos anteriormente, após preparo, foram autoclavados por 15 min a 121°C em 1 atm.

As soluções-estoque de agentes antifúngicos utilizadas no decorrer da pesquisa foram: FLZ, ITZ, VCZ, PSZ e CTZ – todas da marca Sigma-Aldrich. A solução estoque de FLZ foi preparada com água destilada estéril, na concentração de 4096 µg/mL. As soluções-estoque dos demais antifúngicos foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se uma concentração de 1600 µg/mL. As soluções de uso no experimento foram preparadas a partir de cada solução estoque, diluídas em caldo RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich) em pH 7,0, conforme concentrações descritas na Figura 9.



Figura 9. Esquema ilustrativo das concentrações (µg/mL) dos antifúngicos azólicos, utilizadas no experimento, para definir os testes de suscetibilidade pelo método de microdiluição.

(FLZ: fluconazol; ITZ: itraconazol; VCZ: voriconazol; PSZ: posaconazol; CTZ: cetoconazol; CC: controle de crescimento ou positivo; CE: controle de esterilidade ou negativo; A, B, C e D, E, F: representam que as análises foram realizadas em triplicata; Números de 1 a 10: representam a microdiluição).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Preparo do inóculo

Para a preparação do inóculo, foram realizados subcultivos dos isolados em SDA, incubados a 28°C por 24 h. Decorrido o tempo de incubação, procedeu-se à preparação do inóculo diluindo as células em solução salina 0,85% estéril para obtenção da turbidez pretendida. Para a verificação da turbidez, realizou-se uma leitura em espectrofotômetro a 530 nm, a fim de se obter uma absorbância entre 0,08 a 0,11, equivalente ao tubo 0,5 na escala de McFarland (1 a 5×10^6 células/mL). Com essa suspensão, preparou-se uma diluição 1:50 em solução salina 0,85%, seguida da diluição 1:20 em caldo RPMI-1640 *Medium*, resultando em concentração 0,5 a $2,5 \times 10^3$ células/mL. A última diluição, correspondente a 1:20, foi preparada em dois falcons de 15 mL, sendo que um deles tinha apenas o caldo RPMI-1640 *Medium* (inóculo sem verapamil); e, no outro, junto ao caldo RPMI-1640 *Medium*, adicionou-se o verapamil na concentração de 100 μ Mol (inóculo com verapamil).

4.5 Teste de suscetibilidade a agentes antifúngicos

O perfil de sensibilidade das leveduras testadas foi determinado pela técnica da microdiluição em caldo, conforme as normas de padronização publicadas no documento de M27-A3 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), levando-se em consideração as atualizações do documento M27-S4 (CLSI, 2012).

A técnica de microdiluição em caldo utiliza placas de 96 poços estéreis, com o fundo em formato chato, para permitir a melhor visualização do crescimento fúngico. Inicialmente, adicionaram-se 100 μ L de caldo RPMI-1640 da fileira vertical da placa, dos poços 2 ao 11. Na fileira do poço 12, adicionaram-se 200 μ L de caldo RPMI-1640 (controle de esterilidade ou negativo do ensaio). Nas fileiras dos poços 1 e 2, adicionaram-se 100 μ L do antifúngico, e, a partir do poço 2, foi realizada a diluição seriada até a fileira do poço 10 (Figura 10). Nesta, descartou-se o volume de 100 μ L que foi diluído e homogeneizado desde a fileira do poço 2. Por fim, adicionaram-se 100 μ L do inóculo (conforme preparo descrito no item 4.4) nas fileiras dos poços 1 ao 11 (controle de crescimento ou positivo do ensaio). Os testes foram realizados em triplicata, para cada isolado de levedura testada, comparando-o na ausência e na presença do inibidor

verapamil.

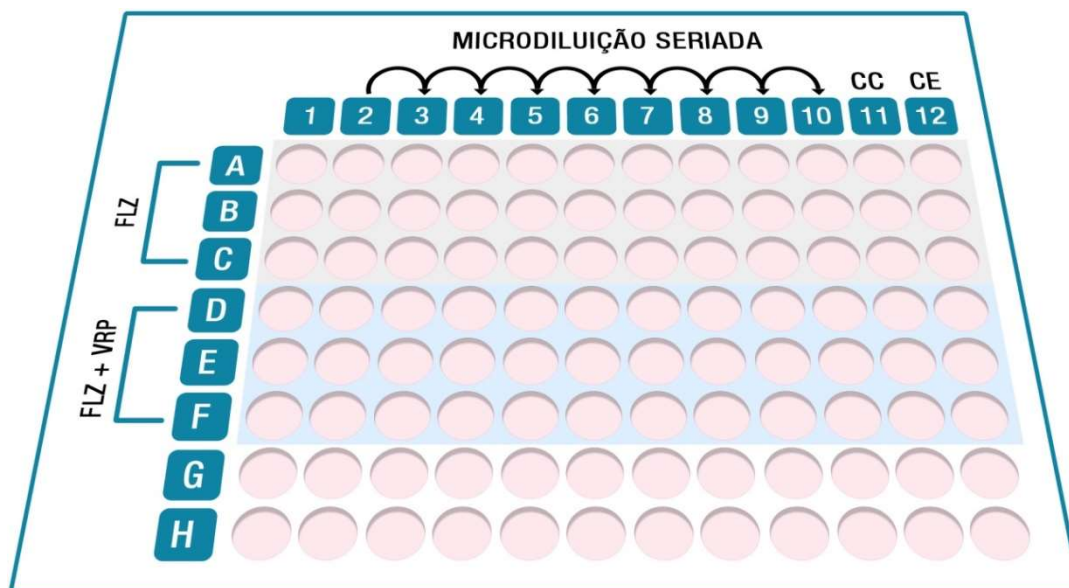


Figura 10. Esquema ilustrativo do método de microdiluição seriada (CLSI, 2008), considerando o antifúngico na ausência ou na presença do inibidor verapamil.

(FLZ: fluconazol; FLZ + VRP: fluconazol + verapamil; CC: controle de crescimento ou positivo; CE: controle de esterilidade ou negativo; A, B, C e D, E, F: representam que as análises foram realizadas em triplicata; Números de 1 a 10: representam a microdiluição).

Fonte: Elaborada pela autora.

As microplacas foram, então, vedadas com parafilm e incubadas a 35°C por 48 h, para, posteriormente, ser determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A leitura da CIM foi realizada de forma visual, determinada pela turbidez de cada poço. A CIM é considerada no poço que contém a mais baixa concentração do antifúngico que causa inibição notável (*endpoint*) do crescimento da levedura.

Após a leitura da CIM, é realizada a Concentração Fungicida Mínima (CFM), definida como a menor concentração capaz de matar a levedura. A CFM será determinada a partir da transferência de 100 µL dos poços a partir da menor concentração que promoveu 100% de inibição (CIM) para tubos de ensaio com SDB. O teste da CFM foi realizado em microplacas contendo 900 µL de SDB, incubadas a 35°C por até 7 dias.

C. krusei ATCC 6258 foi utilizada como controle do ensaio para a atividade antifúngica (CLSI, 2008), e os *breakpoints* utilizados estão definidos na tabela 3.

Tabela 3. *Breakpoints* para definição do perfil de suscetibilidade dos isolados para os antifúngicos testados.

Antifúngico	Espécie	Valores de referência (µg/mL)*			Referência
		S	SDD	R	
FLZ**	CA	≤ 2	-	≥ 8	CLSI, 2012
	CG	-	≤ 32	≥ 64	
	CK	-	-	-	
ITZ	CA				CLSI, 2008
	CG	≤ 0,125	0,25 - 0,5	≥ 1	
	CK				
VCZ	CA	≤ 0,12	0,25 - 0,5	≥ 1	CLSI, 2012
	CG	-	-	-	
	CK	≤ 0,5	1	≥ 2	
PSZ	CA	≤ 0,12	0,25 - 0,5	≥ 1	CLSI, 2012
	CG	-	-	-	
	CK	≤ 0,5	1	≥ 2	
CTZ	CA				CLSI, 2008
	CG	≤ 0,125	0,25 - 0,5	≥ 1	
	CK				

S: sensível; SDD: sensível dose dependente; R: resistente; FLZ: fluconazol; ITZ: itraconazol; VCZ: voriconazol; PSZ: posaconazol; CTZ: cetoconazol; CK: *C. krusei*; CA: *C. albicans*.

**C. krusei* ATCC 6258 é considerada intrinsecamente resistente a fluconazol.

**Adaptada com base na CLSI, 2012.

***Adaptada com base na CLSI, 2008.

4.6 Atividade da Bomba de Efluxo

O inibidor de bomba de efluxo verapamil foi adicionado ao caldo RPMI 1640 com concentração final de 100 µmol/L, e os testes de suscetibilidade foram testados na ausência e na presença desse inibidor. As CIMs de FLZ, ITZ, VCZ, PSZ e CTZ foram determinadas na presença de verapamil no meio de cultura. *C. glabrata* CGRL22 serviu como controle da análise com o FLZ (Bianchin et al. 2019).

5. RESULTADOS

Os valores de CIM obtidos dos testes de suscetibilidade de todos os isolados estão representados na Tabela 4. A classificação em sensível (S), sensível dose dependente (SDD) e resistente (R) foi feita com base nos *breakpoints* para *Candida* preconizados pelo CLSI (2008 e 2012). Com relação às *Candida* spp. M04, M10 e M11, estas apresentaram CIM acima dos *breakpoints* estabelecidos em todos os antifúngicos testados, com exceção do CTZ, enquanto os demais isolados pertencentes a espécies de *Candida* (LT03, M02, M06 e M09) tiveram suas CIM elevadas apenas para FLZ e ITZ. Considerando-se os isolados do gênero *Rhodotorula* (LT04, LT05, LT15, LT28, LT34, M01 e M05), todos apresentaram altas CIMs frente ao FLZ e ao ITZ, assim como a *Yarrowia lipolytica* M08. *R. taiwanensis* LT15 foi sensível apenas ao CTZ. *Papiliotrema laurentii* LT19, único isolado de *Papiliotrema* que fez parte das análises, apresentou CIM elevada frente a todos os antifúngicos testados.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) do teste de suscetibilidade dos isolados testados frente a diferentes antifúngicos azólicos.

Código do Isolado	Espécie	CIM (µg/mL)				
		FLZ*	ITZ**	VCZ**	PSZ**	CTZ**
LT03	<i>C. pseudolambica</i>	64/R	8/R	0,5/S	0,125/S	2/S
LT04	<i>R. mucilaginosa</i>	256/R	16/R	2/R	0,25/S	0,03/S
LT05	<i>R. mucilaginosa</i>	2048/R	>16/R	1/SDD	8/R	0,5/S
LT15	<i>R. taiwanensis</i>	512/R	>16/R	8/R	2/R	0,125/S
LT19	<i>P. laurentii</i>	32/R	>16/R	>16/R	>16/R	16/R
LT28	<i>R. mucilaginosa</i>	256/R	>16/R	1/SDD	0,25/S	0,125/S
LT34	<i>R. taiwanensis</i>	32/R	>16/R	4/R	1/SDD	0,03/S
M01	<i>R. mucilaginosa</i>	1024/R	>16/R	2/R	0,5/S	0,06/S
M02	<i>C. rugopelliculosa</i>	64/R	16/R	0,06/S	1/SDD	0,5/S
M04	<i>C. haemulonii</i>	1024/R	>16/R	8/R	16/R	8/S
M05	<i>R. mucilaginosa</i>	2048/R	>16/R	1/SDD	>16/R	2/S
M06	<i>C. blattae</i>	32/R	>16/R	0,06/S	0,125/S	0,25/S
M08	<i>Y. lipolytica</i>	16/R	>16/R	0,06/S	1/SDD	1/S
M09	<i>C. pseudolambica</i>	64/R	>16/R	0,06/S	2/R	1/S
M10	<i>C. intermedia</i>	128/R	>16/R	2/R	8/R	4/S
M11	<i>C. haemulonii</i>	1024/R	>16/R	8/R	16/R	8/S

S: sensível; SDD: sensível dose dependente; R: resistente; FLZ: fluconazol; ITZ: itraconazol; VCZ: voriconazol; PSZ: posaconazol; CTZ: cetoconazol. *CIM FLZ: 2048 – 4 µg/mL. **CIM ITZ, VCZ, PSZ e CTZ: 16 – 0,03 µg/mL.

A partir do momento em que foram identificados isolados com CIM maiores que os *breakpoints*, há possibilidade de estas serem resistentes frente aos antifúngicos testados. Com base nessa hipótese, foi realizado o experimento com a presença e a ausência de um inibidor de BEs, o verapamil. Se a CIM diminuir com a presença do inibidor, pode-se considerar que o isolado apresenta resistência em função da BEs (Tabela 5). *C. glabrata* CGRL22 serviu como controle da análise com o FLZ e o VRP (Bianchin et al. 2019).

Alguns isolados reduziram cerca de 50% sua CIM na presença do inibidor VRP em, pelo menos, um antifúngico (LT03: CTZ + VRP, M01: FLZ + VRP, M02: ITZ e CTZ + VRP, M09: ITZ e PSZ + VRP, M10 e M11: VCZ e CTZ + VRP), enquanto que outros isolados obtiveram redução igual ou menor que 25% (LT28: CTZ + VRP, M02: PSZ + VRP, M04: CTZ + VRP, M10: FLZ e PSZ + VRP) (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração inibitória mínima (CIM) no teste de suscetibilidade dos isolados testados frente a diferentes antifúngicos azólicos, na ausência e na presença do inibidor de BEs, verapamil.

Código do Isolado	Espécie	CIM									
		FLZ	FLZ + VRP	ITZ	ITZ + VRP	VCZ	VCZ + VRP	PSZ	PSZ + VRP	CTZ	CTZ + VRP
LT03	<i>C. pseudolambica</i>	64	128	8	8	0,5	1	0,125	0,25	2	1
LT04	<i>R. mucilaginosa</i>	256	512	16	>16	2	4	0,25	0,5	0,03	0,125
LT05	<i>R. mucilaginosa</i>	2048	>2048	>16	>16	1	4	8	8	0,5	4
LT15	<i>R. taiwanensis</i>	512	1024	>16	>16	8	8	2	2	0,125	0,5
LT19	<i>P. laurentii</i>	32	1024	>16	>16	>16	>16	>16	>16	16	>16
LT28	<i>R. mucilaginosa</i>	256	256	16	16	1	1	0,25	0,25	0,125	0,03
LT34	<i>R. taiwanensis</i>	32	256	>16	>16	4	8	1	4	0,03	0,06
M01	<i>R. mucilaginosa</i>	1024	512	>16	>16	2	2	0,5	1	0,06	0,06
M02	<i>C. rugopelliculosa</i>	64	128	16	8	0,06	0,06	1	0,25	0,5	0,25
M04	<i>C. haemulonii</i>	1024	1024	>16	>16	8	8	16	16	8	2
M05	<i>R. mucilaginosa</i>	2048	>2048	>16	>16	1	2	>16	>16	2	2
M06	<i>C. blattae</i>	32	64	>16	>16	0,06	0,125	0,125	1	0,25	2
M08	<i>Y. lipolytica</i>	16	16	>16	>16	0,06	0,06	1	2	1	1
M09	<i>C. pseudolambica</i>	64	128	>16	8	0,06	0,06	2	1	1	1
M10	<i>C. intermedia</i>	128	32	>16	>16	2	1	8	0,5	4	2
M11	<i>C. haemulonii</i>	1024	1024	>16	>16	8	4	16	16	8	4

FLZ: fluconazol; FLZ+VRP: fluconazol + verapamil; ITZ: itraconazol; ITZ+VRP: itraconazol + verapamil; VCZ: voriconazol; VCZ+VRP: voriconazol + verapamil; PSZ: posaconazol; PSZ+VRP: posaconazol + verapamil; CTZ: cetoconazol; CTZ+VRP: cetoconazol + verapamil.

*CIM FLZ: 2048 – 4 µg/mL. **CIM ITZ, VCZ, PSZ e CTZ: 16 – 0,03 µg/mL.

6. DISCUSSÃO

O surgimento de patógenos emergentes tem causado muita preocupação na comunidade médica, com infecções sendo causadas por micro-organismos anteriormente considerados comensais e saprófitas. Junto com o aparecimento das infecções, cresceu a preocupação com novos mecanismos de resistência a antifúngicos que possam ser apresentados por esses patógenos emergentes e disseminados para outros fungos, apesar dos raros relatos de transferência gênica entre esses (Fitzpatrick, 2012). As leveduras patogênicas e/ou oportunistas possuem vários genes e proteínas associadas à virulência. Capacidade de crescer a 37°C, componentes da parede celular, presença de cápsula polissacarídica, de moléculas de adesão e produção de enzimas extracelulares são exemplos de fatores de virulência detectados nas leveduras. Um limitado número de espécies de leveduras pode crescer a 37°C, geralmente as espécies associadas aos animais de sangue quente, como *Candida albicans* e várias outras leveduras patogênicas oportunistas (Hagler, 2006; Monopathi et al., 2017).

Em ambientes aquáticos, leveduras foram utilizadas como indicadores de contaminação fecal, afetando a qualidade da água de consumo (Monopathi et al., 2017). Bem como, há relatos de acúmulo de compostos químicos por esses micro-organismos e, conseqüentemente, aumento da taxa de resistência aos antifúngicos azólicos (Brilhante et al., 2015). A água potável também pode ser considerada uma possível rota de transmissão para leveduras patogênicas, e constituir um risco potencial à saúde de indivíduos imunocomprometidos (Arvanitidou et al., 1999).

Azevedo et al. (2015) relatam o uso de antifúngicos azólicos na agricultura e destacam que seu uso indiscriminado pode permanecer no ambiente, contaminando o solo, o ar e a água. Dentre nossos isolados, as amostras de *Candida* spp. são apontadas frequentemente em diferentes estudos sobre a resistência dos antifúngicos azólicos em ambientes aquáticos (Medeiros et al., 2008; Brandão et al., 2010; Brilhante et al., 2010; Castelo-Branco et al., 2013; Brilhante et al., 2015). Isso ocorre em função de essas leveduras servirem como ferramentas para avaliar a qualidade ambiental (Hagler, 2006; Chen et al., 2009; Coelho et al., 2010). *R. mucilaginosa*, também isolada na Laguna Tramandaí, já foi considerada como bioindicadora de poluição em ambientes aquáticos (Hagler, 2006). Monopathi et al. (2017) apontam que grande dosagem das drogas antifúngicas excretadas pela urina, encontram seu

caminho para as estações de tratamento de águas e esgotos. E isso sugere que o esgoto mal-tratado pode também conter grandes quantidades de agentes antifúngicos.

No Brasil, Brandão et al. (2010), ao avaliarem a diversidade de leveduras em três lagos do Sudeste do país, constataram uma alta taxa de resistência à anfotericina B, itraconazol e fluconazol entre *Candida* spp. Medeiros et al. (2008) reportaram a presença de leveduras oportunistas, como *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis*, associadas a rios poluídos da Bacia do Rio Doce, MG. Cerca de 50% dos isolados capazes de crescer a 37°C foram resistentes a itraconazol; e sete, a todos os antifúngicos testados (fluconazol, cetoconazol, terbinafina e anfotericina B). Além de leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, foram encontrados isolados de *Cryptococcus* e de *Rhodotorula* capazes de crescer a 37°C e resistentes a antifúngicos (três isolados de *R. mucilaginosa* foram resistentes a todos os antifúngicos, com exceção de anfotericina B). Segundo esses pesquisadores, a presença de leveduras resistentes às principais drogas antifúngicas nesse ambiente pode ser considerada um risco para as pessoas que usam essas águas para fins recreacionais.

Monapathi et al. (2017) avaliaram a qualidade das águas de dois rios da África do Sul e identificaram 118 isolados, sendo *Saccharomyces cerevisiae* e *C. glabrata* as espécies mais frequentes. Representantes de *Candida* spp. corresponderam a 41%, em que 4% dessas representavam *C. pseudolambica*, espécie também isolada e analisada no presente estudo. Um grande número de isolados foi resistente aos antifúngicos azólicos, especialmente fluconazol. Espécies de *Candida* foram resistentes para quase todas as classes antifúngicas, fator bem preocupante, uma vez que essas fontes de água são usadas para recreação, para produção agrícola e também para práticas religiosas.

Na pesquisa clínica, estudos que analisam o perfil de suscetibilidade de leveduras têm como objetivo avaliar se há sensibilidade ou especificidade na terapia antifúngica. A definição desses perfis ocorre com a de *breakpoints* a partir de normas elaboradas por órgãos competentes, como os emitidos pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2008 e 2012). Em nosso estudo, foram analisadas amostras de um ambiente aquático; e, na ausência de *breakpoints* estabelecidos das espécies isoladas, seguiu-se o preconizado pela área clínica (CLSI, 2008 e 2012) e sugerido por Pfaller et al. (2010).

A partir do teste de suscetibilidade realizado em cada amostra, foi possível analisar quais isolados apresentaram perfil de resistência aos antifúngicos azólicos testados (FLZ, ITZ, VCZ, PSZ e CTZ), para, assim, descobrir-se qual mecanismo permitia-lhes tal fator de virulência. Inicialmente, foi realizada a coloração de cápsula, com tinta nanquim, em todas as amostras a fim de avaliar se a formação de cápsula polissacarídica era a causa da sua resistência. No entanto, não foram evidenciadas cápsulas polissacarídicas como o controle *C. neoformans* ATCC 32045 (dados não mostrados). Posteriormente, foi avaliado se a resistência das leveduras isoladas da Laguna Tramandaí ocorria em função da presença de bombas de efluxo. Para essa análise, foi seguido o protocolo descrito em Pippi et al. (2015).

Alguns pesquisadores sugerem que o mecanismo envolvido na resistência aos azólicos em *Candida* spp. isoladas de animais de vida livre, sem qualquer contato com terapia antifúngica, ocorre pela superexpressão de bombas de efluxo (Brilhante et al., 2011; Brilhante et al., 2012; Castelo-Branco et al., 2013). Nas últimas décadas, tem crescido o interesse pelo estudo na avaliação da resistência a agentes antifúngicos; mas, em ambientes aquáticos, ainda há um número limitado de trabalhos (Medeiros et al., 2008; Brandão et al., 2010; Brilhante et al., 2011; Brilhante et al., 2016; Monpathi et al., 2017).

Um dos mecanismos mais comuns de resistência aos azólicos em *Candida* spp. está associado à superexpressão de bombas de efluxo, que impedem que a droga acumule-se dentro da célula, resultando em uma diminuição da concentração no local de ação (Kanafani e Perfect, 2008; Prasad et al., 2016b). Diferentes estudos investigaram os mecanismos de resistência aos azólicos entre *Candida* spp. de casos clínicos humanos, destacando o papel das bombas de efluxo (Schuetzer-Muehlbauer et al., 2003).

Dada et al. (2013) alegam que pouca atenção tem sido dada ao mecanismo de resistência das bombas de efluxo em amostras ambientais; o enfoque principal, na maioria dos casos, ocorre com isolados clínicos, visto que estes representam maiores ameaças à saúde pública. A partir disso, Monpathi et al. (2018) estudaram se havia relação dos genes das bombas de efluxo de origem clínica de *C. albicans*, resistentes ao fluconazol, com isolados ambientais provenientes de amostras de água. Como resultado dessa pesquisa, os autores constataram que os genes transportadores ABC (*cdr1* e *cdr2*) e os facilitadores (*flu1* e *mdr1*) estavam presentes em todos os isolados resistentes ao fluconazol, e a análise filogenética revelou alta similaridade genética

entre as sequências clínicas do GenBank e as do ambiente isoladas neste estudo.

Bianchin et al. (2019) analisaram o estudo das bombas de efluxo do tipo ABC, em amostras de *Candida* sp. na presença e na ausência do inibidor verapamil (VRP), e constataram a redução da CIM em três amostras, correlacionando o mecanismo de resistência com a presença das BEs, evento esse que foi objeto da presente pesquisa. Neste ensaio, o papel das BEs foi avaliado utilizando-se como inibidor o VRP (Fagron), responsável por bloquear os canais de cálcio (Cannon et al., 2009; Piecuch e Oblak, 2014). Esse inibidor é responsável por diminuir a CIM quando a resistência do isolado está correlacionada com bombas de efluxo ABC e/ou MDR (Pippi et al., 2015). Dentre os isolados que obtiveram redução da CIM, após adição do verapamil, nota-se que a resistência diminuiu, e que esta pode ser ocasionada devido à presença de bombas de efluxo nessas espécies.

O inibidor VRP, um composto orgânico, bloqueador de canais de cálcio da classe das fenilalquilaminas, já apresentou efeitos inibitórios no desenvolvimento de hifas, de aderência, de colonização gastrointestinal e na formação de biofilmes em *C. albicans* (Yu et al., 2013; Yu et al., 2014a; Yu et al., 2014b; Li et al., 2015). Dentre os compostos orgânicos, Afeltra e Verweij (2003) testaram cinarizina, nifedipina, nimodipina e verapamil, isoladamente ou em combinação ao cetoconazol, contra isolados clínicos de *C. albicans*. Sozinhas, essas drogas apresentaram altas concentrações de atividade antifúngica *in vitro*, sendo o VRP o composto mais ativo com CIM de 55 – 1,050 µg/mL (concentração acima do limite adotado nos experimentos desta pesquisa); por outro lado, em combinação ao cetoconazol, a atividade desse antifúngico foi potencializada. Além desses, há relatos do uso de prometazina como inibidor de bombas de efluxo em derivados azólicos (Kolaczowski et al., 2003; Castelo-Branco et al., 2013; Brilhante et al., 2016).

O verapamil, além de sua ação inibitória junto às bombas de efluxo, também pode ser utilizado como medida na terapia antifúngica contra colonização e infecção por *C. albicans*, conforme estudos de Yu et al. (2014a) e contra o biofilme de *Aspergillus fumigatus* (Nazik et al., 2017).

Brilhante et al. (2016), levando em consideração que os mecanismos de resistência antifúngica podem ajudar a entender melhor a relação entre o desenvolvimento da resistência antifúngica e a poluição ambiental, avaliaram a resistência aos azólicos mediada por bombas de efluxo em *Candida* spp. isoladas de um lago. Os autores utilizaram como inibidores das BEs a prometazina (atua nas

bombas de efluxo ABC e MFS) e o haloperidol (atua apenas em MFS), o que resultou na redução da CIM de 8-256 vezes e de 8-62,5 vezes para o fluconazol e o itraconazol, respectivamente (em adição da prometazina), e na redução de 32 a 125 vezes das CIMs para o fluconazol, em adição ao haloperidol. Com a diminuição das CIMs na presença de um composto inibidor de BEs, os autores sugerem que a resistência das amostras pode ser causada por bombas de efluxo.

Neste trabalho, nas amostras em que a CIM aumentou, mesmo na presença do inibidor VRP, pode-se sugerir que o fenômeno *trailing* fez-se presente. E a presença desse fenômeno é alta em testes de sensibilidade com antifúngicos fungistáticos, como os azólicos (Marr et al., 1999), e pode induzir a erros de leitura das CIMs. Para Lee et al. (2004), o fenômeno *trailing* é usado para descrever o crescimento reduzido, mas persistente, que alguns isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* exibem em concentrações de fármaco acima da CIM em testes com agentes antifúngicos azólicos, como fluconazol e itraconazol. Alguns autores consideram que a temperatura de incubação seja uma das razões para o surgimento do *trailing*, e que essa possa ser alterada para 25°C ou 42°C (Agrawal et al., 2007), ou, até mesmo, seja realizada a leitura do teste em 24h, diferentemente do que é preconizado pela CLSI (Revankar et al., 1998; Arthington-Skaggs et al., 2002; Espinel-Ingroff et al., 2009). Essa alteração de temperatura de 25°C ou 42°C é sugerida pelos autores porque nelas ocorre a eliminação do crescimento de arraste, que nada mais é que a inibição parcial do crescimento fúngico ao longo de uma concentração antifúngica. Outros, como Marr et al. (1999), sugeriram que o pH ácido pode reduzir o efeito *trailing* e testaram dois meios de cultura diferentes (RPMI 1640 como definido pelo CLSI e um meio mínimo, Yeast Nitrogen Base ou caldo de carne com extrato de levedura) em pH 7,0 e 4,5. Nessa análise, observaram que o pH 7,0 apresenta o fenômeno *trailing*, enquanto, com o pH 4,5, o mesmo fator não foi observado.

Além dessas variáveis, alguns autores sugerem que a concentração de glicose no meio, o tamanho do inóculo, o tipo de placa de reação e a forma da leitura do *endpoint* (seja por espectrofotometria, seja a “olho nu”) também podem alterar significativamente os resultados dos testes de suscetibilidade (Revankar et al., 1998; Arthington-Skaggs et al., 2002; Coenye et al., 2008). Neste trabalho, foi realizada a leitura a “olho nu”, conforme preconizado pelo CLSI (CLSI, 2008).

Apesar da forte evidência fenotípica do envolvimento de bombas de efluxo no mecanismo de resistência dos antifúngicos azólicos em no presente trabalho,

outros ensaios de efluxo e análises moleculares de expressão poderiam ser realizadas para corroborar com nossas descobertas, como a avaliação da expressão gênica por qPCR. Além disso, embora a adição de verapamil tenha diminuído as CIMs de alguns isolados, não foi suficiente para alterar seus fenótipos de resistência; no entanto, também é importante destacar que mais de um mecanismo poderia estar envolvido nesta, como a superexpressão de bombas MFS, mutações no gene *erg11* (Kanafani e Perfect, 2008) e alterações na expressão gênica (Brilhante et al., 2016).

7. CONCLUSÃO

- I. Com base nas análises realizadas, algumas amostras isoladas da Laguna Tramandaí apresentaram resistência levando em consideração os *breakpoints* reportados na literatura para amostras de leveduras da área clínica.
- II. Houve diferenças entre as CIMs das leveduras ambientais analisadas frente aos diferentes antifúngicos azólicos testados. Alguns isolados diminuíram sua CIM na presença do inibidor verapamil, enquanto outros aumentaram, provavelmente devido ao efeito *trailing*.
- III. A partir da diminuição das CIMs em alguns isolados, é possível considerar que esse evento ocorra em função da presença de bombas de efluxo.

8. PERSPECTIVAS

- Testar o potencial antifúngico do verapamil;
- Avaliar se o aumento da CIM, na presença do verapamil, é realmente em função do efeito *trailing*;
- Investigar os genes envolvidos nas bombas de efluxo por qPCR.

9. REFERÊNCIAS

- Afeltra J, Verweij PE. 2003. Antifungal activity of nonantifungal drugs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 22(7):397-407.
- Agrawal D, Patterson TF, Rinaldi MG, Revankar SG. 2007. Trailing end-point phenotype of *Candida* spp. in antifungal susceptibility testing to fluconazole is eliminated by altering incubation temperature. *Journal of Medical Microbiology.* 56(7):1003-1004.
- Arthington-Skaggs BA, Lee-Young W, Ciblak MA, Frade JP, Brandt ME, Hajjeh RA, Harrison LH, Sofair NA, Warnock DW. 2002. Comparison of Visual and Spectrophotometric Methods of Broth Microdilution MIC End Point Determination and Evaluation of a Sterol Quantitation Method for In Vitro Susceptibility Testing of Fluconazole and Itraconazole against Trailing and Nontrailing *Candida* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 46 (8): 2477-2481.
- Arvanitidou M, Kanellou K, Constantinides, TC, Katsouyannopoulos, V. 1999. The occurrence of fungi in hospital and community potable waters. *Letters in Applied Microbiology.* 29:81–84.
- Azevedo MM, Faria-Ramos I, Cruz LC, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. 2015. Genesis of Azole Antifungal Resistance from Agriculture to Clinical Settings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 63(34):7463-7468.
- Balkis MM, Leidich SD, Mukherjee PK, Ghannoum MA. 2002. Mechanisms of Fungal Resistance. *Drugs.* 62(7):1025-1040.
- Bartosiewicz D, Krasowska A. 2009. Inhibitors of ABC Transporters and Biophysical Methods to Study their Activity. *Z Naturforsch C.* 64(5-6):454-458.
- Bhattacharya S, Sobel JD, White TC. 2016. A Combination Fluorescence Assay Demonstrates Increased Efflux Pump Activity as a Resistance Mechanism in Azole-Resistant Vaginal *Candida albicans* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 60(10):5858-5866.
- Bianchin MD, Borowicz SM, Machado GRM, Pippi B, Guterres SS, Pohlmann AR, Fuentefria AM, Kulkamp-Guerreiro IC. 2019. Lipid core nanoparticles as a broad strategy to reverse fluconazole resistance in multiple *Candida* species. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 175:523–529.
- Bondaryk M, Kurzątkowski W, Staniszevska M. 2013. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. *Postępy Dermatologii i Alergologii.* 5(2013):293-301.
- Brandão LR, Medeiros AO, Duarte MC, Barbosa AC, Rosa CA. 2010. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts isolated by multiple-tube fermentation from three freshwater lakes in Brazil. *Journal of Water and Health.* 8(2):279–289.
- Braun BR, Vanhet HM, d'Enfert C, Martchenko M, Dungan J, Kuo A, Inglis DO, Uhl MA, Hogues H, Berriman M, Lorenz M, Levitin A, Oberholzer U, Bachewich C, Marcus D, Marcil A, Dignard D, Iouk T, Zito R, Frangeul L, Tekaiia F, Rutherford K, Wang E, Munro CA, Bates S, Gow NA, Hoyer LL, Köhler G, Morschhäuser J, Newport G, Znaidi S, Raymond M, Turcotte B, Sherlock G, Costanzo M, Ihmels J, Berman J, Sanglard D, Agabian N, Mitchell AP, Johnson AD, Whiteway M, Nantel A. 2005. A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet* 1(1):36–57.

- Brilhante RSN, Castelo-Branco DSCM, Soares GD, Astete-Medrano DJ, Monteiro AJ, Cordeiro RA, Sidrim JJ, Rocha MF. 2010. Characterization of the gastrointestinal yeast microbiota of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): a potential hazard to human health. *Journal of Medical Microbiology*. 59:718-723.
- Brilhante RSN, Paiva MAN, Sampaio CMS, Teixeira CEC, Castelo-Branco DSCM, Leite JJG, Moreira CA, Silva LP, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MFG. 2011. Yeasts from *Macrobrachium amazonicum*: a focus on antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. *FEMS Microbiology Ecology*. 76(2):268–277.
- Brilhante RSN, Castelo-Branco DSCM, Duarte GPS, Paiva MAN, Teixeira CEC, Zeferino JPO, Monteiro AJ, Cordeiro RA, Sidrim JJC, Rocha MFG. 2012. Yeast microbiota of raptors: a possible tool for environmental monitoring. *Environmental Microbiology Reports*. 4(2):189–193.
- Brilhante RSN, Paiva MAN, Sampaio CMS, Castelo-Branco DSCM, Alencar LP, Bandeira TJPG, Cordeiro RA, Pereira-Neto WA, Moreira JLB, Sidrim JJC, Rocha MFG. 2015. Surveillance of Azole Resistance Among *Candida* spp. as a Strategy for the Indirect Monitoring of Freshwater Environments. *Water Air Soil Pollut*. 226(52):1-9.
- Brilhante RSN, Paiva MAN, Sampaio CMS, Castelo-Branco DSCM, Teixeira CEC, Alencar LP, Bandeira TJPG, Monteiro AJ, Cordeiro RA, Pereira-Neto WA, Sidrim JJC, Moreira JLB, Rocha MFG. 2016. Azole resistance in *Candida* spp. isolated from Catú Lake, Ceará, Brazil: an efflux-pump-mediated mechanism. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47(1):33-38.
- Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. 2012. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Science Translational Medicine*. 4(165):165rv113-165rv113.
- Campoy S, Adrio JL. 2017. Antifungals. *Biochemical Pharmacology* 133:86–96.
- Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, Monk BC. 2009. Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. *Clinic Microbiol Rev*. 22(2):291–321.
- Castelo-Branco DSCM, Brilhante RSN, Paiva MAN, Teixeira CEC, Caetano EP, Ribeiro JF, Cordeiro RA, Sidrim JJC, Monteiro AJ, Rocha MFG. 2013. Azole-resistant *Candida albicans* from a wild Brazilian porcupine (*Coendou prehensilis*): a sign of an environmental imbalance? *Medical Mycology*. 51(5):555–560.
- Castro D, Mello RSP. *Atlas Ambiental da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí*. 2013. Porto Alegre: Via Sapiens; Maquiné/RS: ANAMA. Disponível em:<http://www.onganama.org.br/pesquisas/Livros/Atlas_Tramandai_2013_web_2014.pdf> Acesso em: 05 mar. 2019.
- Chai X, Zhang J, Cao Y, Zou Y, Wua Q, Zhang D, Jiang Y, Sun Q. 2011. New azoles with antifungal activity: Design, synthesis, and molecular docking. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 21:686–689.
- Chang Y, Yu S, Heitman J, Wellington M, Chen Y. 2017. New facets of antifungal therapy. *Virulence*. 8(2):222–236.
- Chen YS, Yanagida F, Chen LY. 2009. Isolation of marine yeasts from coastal waters of northeastern Taiwan. *Aquatic Biology*. 8:55–60.
- Chen ZF, Ying GG. 2015. Occurrence, fate and ecological risk of five typical azole fungicides as therapeutic and personal care products in the environment: A review. *Environment International* 84: 142-153.

- CLSI. 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- CLSI. 2012. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts - Fourth Informational Supplement, CLSI document M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- Coelho MA, Almeida JMF, Martins IM, Silva AJ, Sampaio JP. 2010. The dynamics of the yeast community of the Tagus river estuary: testing the hypothesis of the multiple origins of estuarine yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*. 98:331–342.
- Coenye T, De Vos M, Vandenbosch D, Nelis H. 2008. Factors influencing the trailing endpoint observed in *Candida albicans* susceptibility testing using the CLSI procedure. *Clinical Microbiology and Infection*. 14(5):495-513.
- Costa C, Pires C, Cabrito TR, Renaudin A, Ohno M, Chibana H, Sa-Correia I, Teixeira MC. 2013. *Candida glabrata* drug: HC antiporter CgQdr2 confers imidazole drug resistance, being activated by transcription factor CgPdr1. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3159–3167.
- Dada AC, Ahmad A, Usup G, Heng LY, Hamid R. 2013. High-level aminoglycoside resistance and virulence characteristics among enterococci isolated from recreational beaches in Malaysia. *Environ. Monit. Assess*. 185 (9):7427–7443.
- Denning DW, Hope WW. 2010. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends in Microbiology*. 18(5):195-204.
- Dromer F, Bernede-Bauduin C, Guillemot D, Lortholary O. 2008. Major Role for Amphotericin B–Flucytosine Combination in Severe Cryptococcosis. *PLoS ONE*. 3(8):e2870.
- Espinel-Ingroff A, Canton E, Peman J, Rinaldi MG, Fothergill AW. 2009. Comparison of 24-Hour and 48-Hour Voriconazole MICs as Determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Method (M27-A3 Document) in Three Laboratories: Results Obtained with 2,162 Clinical Isolates of *Candida* spp. and Other Yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*. 47(9):2766–2771.
- Fitzpatrick DA. 2012. Horizontal gene transfer in fungi. *FEMS Microbiol Lett*. 329:1–8.
- Flevari A, Theodorakopoulou M, Velegaki A, Armaganidis A, Dimopoulos G. 2013. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. *Clinical Interventions in Aging*. 2013(8):1199-1208.
- Gaur M, Choudhury D, Prasad R. 2005. Complete inventory of ABC proteins in human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 9:3–15.
- Gaur M, Puri N, Manoharlal R, Rai V, Mukhopadhyay G, Choudhury D, Prasad R. 2008. MFS transportome of the human pathogenic yeast *Candida albicans*. *BMC Genomics*. 9(579):1-12.
- Guinea J, Sanchez-Somolinos M, Cuevas O, Pelaez T, Bouza E. 2006. Fluconazole resistance mechanisms in *Candida krusei*: The contribution of efflux-pumps. *Medical Mycology*. 44:575-578.
- Hagler AN, Ahearn DG. 1987. Ecology of aquatic yeasts. In: Rose, A. H; Harison, J.S. (2ed). *The yeasts: Biology of yeasts*, London: Academic Press. 181-205
- Hagler AN. 2006. Yeast as indicators of environmental quality. In C. Rosa & P. Gábor (eds.), *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. *The Yeast Handbook*. Springer, Berlin, Heidelberg. 514–532.
- Kanafani ZA, Perfect J R. 2008. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin. Infect. Dis*. 46(1):120-128.

- Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, Gadhwe S. 2012. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 20(2012):5678–5698.
- Katiyar SK, Edlind TD. 2001. Identification and expression of multidrug resistance-related ABC transporter gene in *Candida krusei*. *Med Mycol* 39:109–116.
- Kofla G, Turner V, Schulz B, Storch U, Froelich D, Rognon B, Coste AT, Sanglard D, Ruhnke M. 2011. Doxorubicin induces drug efflux pumps in *Candida albicans*. *Medical Mycology*. 49:132–142.
- Kolaczowski M, Michalak K, Motohashi N. 2003. Phenothiazines as potent modulators of yeast multidrug resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 22(2003):279-283.
- Krishna R, Mayer LD. 2000. Multidrug resistance (MDR) in cancer mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 11(4):265-283.
- Lanzer RM, Ramos BVC, Marchett CA. 2013. Impactos ambientais do turismo em lagoas costeiras do Rio Grande do Sul. *Caderno Virtual de Turismo*. 13(1):134-149.
- Lee MK, Williams LE, Warnock DW, Beth A, Arthington-Skaggs BA. 2004. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53(2):217–224.
- Li X, Hou Y, Yue L, Liu S, Du J, Sun S. 2015. Potential targets for antifungal drug Discovery based on growth and virulence in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 59(10):5885–5891.
- Marr KA, Rustad TR, Rex JH, White TC. 1999. The Trailing End Point Phenotype in Antifungal Susceptibility Testing Is pH Dependent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43(6):1383–1386.
- McKeegan KS, Borges-Walmsley MI, Walmsley AR. 2004. Structural understanding of efflux-mediated drug resistance: potential routes to efflux inhibition. *Curr Opin Pharmacol*. 4:479–486.
- Medeiros AO, Kohler LM, Hamdan JS, Missagia BS, Barbosa FAR, Rosa CA. 2008. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. *Water Research*. 42(2008):3921-3929.
- Miyazaki H, Miyazaki Y, Geber A, Parkinson T, Hitchcock CA, Falconer DJ, Ward DJ, Marsden K, Bennett JE. 1998. Fluconazole resistance associated with drug efflux and increased transcription of a drug transporter gene, PDH1, in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1695–1701.
- Monapathi ME, Bezuidenhout CC, Rhode OHJ. 2017. Water quality and antifungal susceptibility of opportunistic yeast pathogens from rivers. *Water Sci Technol*. 75(6):1319-1331.
- Monapathi ME, Bezuidenhout CC, Rhode OHJ. 2018. Efflux pumps genes of clinical origin are related to those from fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from environmental water. *Water Sci Technol*. 77(4):899-908.
- Moran GP, Sanglard D, Donnelly SM, Shanley DB, Sullivan DJ, Coleman DC. 1998. Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1819–1830.
- Nagahama T. 2006. Yeast Biodiversity in Freshwater, Marine and Deep-Sea Environments. In: Péter G., Rosa C. (eds) *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. The Yeast Handbook. Springer, Berlin, Heidelberg. 241-262.

- Nazik H, Choudhary V, Stevens DA. 2017. Verapamil Inhibits *Aspergillus* Biofilm, but Antagonizes Voriconazole. *J. Fungi*. 3(50):1-7.
- Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology*. 11(6):272-279.
- Ogawa A, Hashida Okado T, Endo M, Yoshioka H, Tsuruo T, Takesako K, Kato I. 1998. Role of ABC transporters in aureobasidin A resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 42:755–761.
- Ozben T. 2006. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Letters*. 580(2006):2903–2909.
- Perlin DS, Shor E, Zhao Y. 2015. Update on Antifungal Drug Resistance. *Curr Clin Microbiol Rep*. 2(2):84–95.
- Pfaller MA, Diekema DJ. 2007. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev*. 20(1):133-163.
- Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D. 2010. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resistance Updates*. 13(2010):180–195.
- Pfaller MA. 2012. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *The American Journal of Medicine*. 125(1):S3-S13.
- Pianalto KM, Alspaugh JA. 2016. New Horizons in Antifungal Therapy. *J. Fungi* 2016(2):1-26.
- Piecuch A, Oblak E. 2014. Yeast ABC Proteins Involved in Multidrug Resistance. *Cell Mol Biol Lett*. 19(1):1-22.
- Pippi B, Lana AJD, Moraes RC, Guez CM, Machado M, Oliveira LFS, Lino von Poser G, Fuentefria AM. 2015. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red própolis with antifungal drugs on *Candida* spp. *Journal of Applied Microbiology*. 118:839-850.
- Ponte-Sucre A. 2007. Availability and applications of ATP-binding cassette (ABC) transporter blockers. *Appl Microbiol Biotechnol*. 76:279–286.
- Prasad R, Worgifosse PD, Goffeau A, Balzi E. 1995. Molecular cloning and characterisation of a novel gene of *C. albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet* 27:320–329.
- Prasad R, Gaur NA, Gaur M, Komath SS. 2006. Efflux Pumps in Drug Resistance of *Candida*. *Infect Disord Drug Targets*. 6(2):69-83.
- Prasad R, Goffeau A. 2012. Yeast ATP binding cassette transporters conferring multidrug resistance. *Annu Rev Microbiol*. 66:39–63.
- Prasad R, Rawal MK. 2014. Efflux pump proteins in antifungal resistance. *Front Pharmacol* 5(202):1-13.
- Prasad R, Shah AH, Rawal MK. 2016a. Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance. In: Ramos J, Sychrová H, Kschischo M. (eds) *Yeast Membrane Transport. Advances in Experimental Medicine and Biology*. 892:327-349.
- Prasad R, Rawal MK, Shah AH. 2016b. *Candida* Efflux ATPases and Antiporters in Clinical Drug Resistance. I In: Ramos J, Sychrová H, Kschischo M. (eds) *Yeast Membrane Transport. Advances in Experimental Medicine and Biology*. 892:351-376.
- Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. 2012. Fungal Biofilm Resistance. *International Journal of Microbiology*. 2012(ID 528521):1-14.

- Reboutier D, Piednoel M, Boissard S, Conti A, Chevalier V, Florent M, Gibot-Leclerc S, Da Silva B, Chastin C, Fallague K, Favel A, Noël T, Ruprich-Robert G, Chapeland-Leclerc F, Papon N. 2009. Combination of different molecular mechanisms leading to fluconazole resistance in a *Candida lusitanae* clinical isolate. *Diagn Microbiol Infect Dis* 63:188–193.
- Revankar SG, Kirkpatrick WR, Mcatee RK, Fothergill AW, Redding SW, Rinaldi MG, Patterson TF. 1998. Interpretation of Trailing Endpoints in Antifungal Susceptibility Testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards Method. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(1):153-156.
- Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. 2018. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Cur Opin Microb*. 45:70-76.
- Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. 1997. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterisation of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* 143:405–416.
- Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, Majcherczyk PA, Bille J. 1999. The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2753–2765.
- Sanglard D, Coste A, Ferrari S. 2009. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res*. 9(2009):1029–1050.
- Schuetzer-Muehlbauer M, Willinger B, Egnér R, Ecker G, Kuchler K. 2003. Reversal of antifungal resistance mediated by ABC efflux pumps from *Candida albicans* functionally expressed in yeast. *Int J Antimicrob*. 22:291-300.
- Scorzoni L, Silva ACAP, Marcos CM, Assato PA, Melo WCMA, Oliveira HC, Costa-Orlandi CB, Mendes-Giannini MJS, Fusco-Almeida AM. 2017. Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. *Front Microbiol*. 8:36.
- Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. 1999. Current and Emerging Azole Antifungal Agents. *Clin Microbiol Rev*. 12(1):40-79.
- Shor E, Perlin DS. 2015. Coping with Stress and the Emergence of Multidrug Resistance in Fungi. *PLoS Pathog* 11(3):e1004668.
- Shukla PK, Singh P, Yadav RK, Pandey S, Bhunia SS. 2016. Past, Present, and Future of Antifungal Drug Development. In: Saxena A. (eds) *Communicable Diseases of the Developing World. Topics in Medicinal Chemistry*, 29:125-167.
- Silva-Bedoya LM, Ramírez-Castrillón M, E. Osorio-Cadauid E. 2014. Yeast diversity associated to sediments and water from two Colombian artificial lakes. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45(1):135-142.
- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 36:288–305.
- Smriti, Krishnamurthy S, Dixit BL, Gupta CM, Milewski S, Prasad R. 2002. ABC transporters Cdr1p, Cdr2p and Cdr3p of a human pathogen *Candida albicans* are general phospholipid translocators. *Yeast* 19:303–318.
- Snelders E, in 't Veld RAGH, Rijs AJMM, Kema GHJ, Melchers WJG, Verweij PE. 2009. Possible Environmental Origin of Resistance of *Aspergillus fumigatus* to Medical Triazoles. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(12):4053-4057.
- Tobudic S, Kratzer C, Presterl E. 2012. Azole-resistant *Candida* spp. -emerging pathogens? *Mycoses*. 55(Suppl.1):24–32.

- Torelli R, Posteraro B, Ferrari S, La Sorda M, Fadda G, Sanglard D, Sanguinetti M. 2008. The ATP-binding cassette transporter-encoding gene CgSNQ2 is contributing to the CgPDR1-dependent azole resistance of *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* 68:186–201.
- Vandeputte P, Ferrari S, Coste A.T. 2012. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. *International Journal of Microbiology*. 2012(ID 713687):1–26.
- Vogel M, Hartmann T, Koberle M, Treiber M, Autenrieth IB, Schumacher UK. 2008. Rifampicin induces MDR1 expression in *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 61:541–547.
- Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. 2017. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-albicans Candida Species. *Frontiers in Microbiology*. 7(2173):1-12.
- Yong VC, Chew LM, Kwan CL, Ng KP, Seow HF, Chong PP. 2006. Transcriptional and sequencing analysis of CtCDR1, CtMDR1 and CtERG11 genes in fluconazole-resistant *Candida tropicalis* isolates from Candidemia patients. *J Med Sci* 6:713–723.
- Yu Q, Ding X, Xu N, Cheng X, Qian K, Zhang B, Xing L, Li M. 2013. In Vitro Activity of Verapamil Alone and in Combination with Fluconazole or Tunicamycin Against *Candida albicans* Biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 41:179-182.
- Yu Q, Ding X, Zhang B, Xu N, Jia C, Mao J, Zhang B, Xing L, Li M. 2014a. Inhibitory effect of verapamil on *Candida albicans* hyphal development, adhesion and gastrointestinal colonization. *FEMS Yeast Res.* 14(4):633-41.
- Yu Q, Xiao C, Zhang K, Jia C, Ding X, Zhang B, Wang Y, Li M. 2014b. The Calcium Channel Blocker Verapamil Inhibits Oxidative Stress Response in *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 177:167–177.