

**MECHANISMS OF ANTIFUNGAL RESISTANCE IN PATHOGENIC YEASTS:
EVALUATION OF THE *IN VITRO* AND *IN VIVO* EXPRESSION**

Ana Sofia da Quinta e Costa Neves de Oliveira Morais

-Summary-Resumo-



Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Biomedicina, apresentada
à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Summary

Candida represents the most frequent isolated yeast from fungaemia patients. The economic cost of bloodstream fungal infections and its associated mortality, especially in debilitated patients, remains unacceptably high. Fungi are highly adaptable microorganisms, developing resistance to antifungal drugs whenever under its pressure. There are multiple mechanisms of antifungal resistance: formation of biofilms which diminish the accessibility of the antifungal, selection of spontaneous mutations that increase expression or decreased susceptibility of the target, altered chromosome stoichiometry and overexpression of multidrug efflux pumps. Besides the ability to develop antifungal resistance, the facility to adapt to different environmental niches in the human body contributes to clinical resistance and a poor outcome.

The research plan of this work addressed the source of candidaemia and the factors that contribute to antifungal resistance or tolerance, both *in vitro* and *in vivo* by pathogenic *Candida* spp. Also, the assessment of *in vivo* effect of the non antifungal drug ibuprofen that was previously shown to be able to revert the resistant phenotype *in vitro*, was also pursued.

The genetic relatedness of *C. albicans* isolates from blood and other biological products from fungaemia patients revealed that distinct patients were infected by the same strain at different time periods, and an increase in antifungal resistance was observed over time for some of these strains. These results were suggestive of an hospital-acquired exogenous nature of the infection, by hospital endemic strains.

Fungi represent well characterized eukaryotic model systems for scientific and biomedical research. The ability to develop resistance mechanisms *in vivo* is well documented among patients under azole antifungal therapy. Echinocandins brought new hope for treatment of candidaemia and nowadays are considered first line drugs. However, even with the newly available anidulafungin, structural alterations in the HS1 of *FKS2* molecule due to point mutations can lead to a dramatic decrease in drug efficiency *in vivo*, in a patient with *C. glabrata*. Even though only few reports described echinocandin decreased susceptibility *in*

vivo, ours was the first one addressing anidulafungin. In fact, *Candida* may exploit compensatory cell wall chitin production following exposure to echinocandins in order to overcome the decrease of β -glucan in the cell wall. This paradoxical effect can now be predicted with a new reliable flow cytometric protocol using calcofluor white staining.

Metabolic adaptability mechanisms, including alterations in the respiratory mitochondrial pathway, can also modulate antifungal resistance or tolerance to stress. Although unrelated to intrinsic resistance to fluconazole, the hereby described alternative respiratory pathway in *C. krusei* protects the yeast from oxidative stress.

Critical care patients are often administered multiple medications including life support therapy. This represents risk factors for increased clinical resistance and consequently to a poor outcome. Propofol lipidic infusion, often used for sedation in mechanically ventilated patients, reduced the access and/or permeabilization of antifungal agents into the fungal cell. Vasoactive amines like adrenaline are lifesaving medications, often administered in ICU. In humans, the adrenergic receptors, a class of G protein-coupled receptors (GPCRs), represent catecholamine targets. Several studies have described the existence of G-protein coupled receptors in yeasts, showing an identical GTP binding site to human GPCRs. Considering the many homologies that have already been described between yeasts and human cells, we raised the hypothesis that in *Candida albicans* adrenaline could act through similar adrenergic receptors and influence antifungal resistance. Such studies showed that adrenaline can improve the fitness of fungal cells by stimulating energy production and fungal growth, thus allowing overcoming the stress caused by the antifungal drug by increasing efflux activity.

The knowledge of the antifungal resistance mechanisms can allow the design of alternative therapeutically options in order to modulate or revert the resistance. In a murine model of *C. albicans* systemic infection, ibuprofen acted synergistically with fluconazole, by reducing drastically the fungal burden in mice infected with a resistant *C. albicans* strain. By allying anti-inflammatory and analgesic properties, ibuprofen in combination with fluconazole might play a relevant role in a future therapeutic strategy for severe fungal infections.

This research results in a more comprehensive understanding of the multiple mechanisms that can influence antifungal resistance or tolerance. The deliverables of our studies include a better awareness of the efforts that should be made for the implementation of routine antifungal susceptibility testing and provide new hope for the prevention of azole antifungal resistance.

Sumário

Candida é a levedura mais frequentemente isolada em doentes com fungemia. A mortalidade associada às infecções fúngicas, especialmente em pacientes debilitados, permanece inaceitavelmente alta. Os fungos são microrganismos altamente adaptáveis, capazes de desenvolver resistência a fármacos antifúngicos sempre que estejam sob a sua pressão de seleção. Existem vários mecanismos de resistência antifúngica: formação de biofilmes que diminuem o acesso do antifúngico, aumento da expressão ou diminuição da suscetibilidade do alvo, alteração da estequiometria cromossômica ou sobre-expressão de transportadores de efluxo. Para além desta capacidade para desenvolver resistência antifúngica, a *Candida* tem muita facilidade para se adaptar a diferentes nichos ambientais no corpo humano, contribui para a resistência clínica e o mau prognóstico.

Este trabalho procurou por um lado esclarecer a origem das estirpes que provocam candidemia e, por outro lado, caracterizar os fatores que podem contribuir para a resistência ou tolerância *in vitro* e *in vivo* de espécies patogénicas de *Candida* aos antifúngicos. Para além disso, avaliou-se o efeito *in vivo* de um fármaco não antifúngico como o ibuprofeno, para o qual se demonstrou que ser capaz de reverter o fenótipo de resistência *in vitro* ao fluconazole.

A identidade genética de *C. albicans* isolada em diferentes doentes a partir de sangue e de outros produtos biológicos de doentes com fungemia revelaram que foram infetados pela mesma estirpe em períodos de tempo distintos, observando-se também um aumento da resistência antifúngica em algumas estirpes. Estes resultados foram sugestivos de uma infeção de natureza exógena adquirida em ambiente hospitalar, por estirpes provavelmente endémicas no hospital.

O desenvolvimento *in vivo* de resistência da *Candida* aos antifúngicos está bem documentado em doentes sob tratamento com azoles antifúngicos. As equinocandinas conduziram a uma nova esperança para o tratamento da candidemia e hoje em dia são considerados fármacos de primeira linha. Contudo, mesmo com a recentemente disponível anidulafungina, podem ocorrer alterações estruturais no HS1 da molécula *FKS2*, devido a

mutações pontuais, que podem levar a uma diminuição abrupta na eficiência do fármaco *in vivo*. Estão descritos casos clínicos de diminuição da suscetibilidade das equinocandinas *in vivo*. No entanto, não estava ainda descrita essa diminuição de suscetibilidade para a anidulafungina. O caso clínico relatado neste trabalho mostra pela primeira vez essa redução da suscetibilidade *in vivo*. Após a exposição às equinocandinas, a *Candida* produz mais quitina, que compensa a diminuição de β -glucano na parede celular. Este efeito paradoxal pode agora ser previsto com um protocolo de citometria de fluxo fiável, usando o calcofluor como marcador.

Os mecanismos de adaptação metabólica, incluindo alterações na via respiratória mitocondrial, podem também modular a resistência antifúngica ou atolerância ao stress. Embora não relacionado com a resistência intrínseca ao fluconazole, a cadeia respiratória alternativa da *C. krusei* protege a levedura do stress oxidativo.

Aos doentes em estado crítico são normalmente administradas variadas medicações de suporte de vida, que podem ser um fator de risco para o desenvolvimento de resistência clínica aos antifúngicos e conseqüentemente para um mau prognóstico. A infusão lipídica de propofol, muitas vezes usada para sedação em doentes ventilados, reduz o acesso e/ou permeabilização dos agentes antifúngicos à célula. As amins vasoativas, tal como a adrenalina, são medicamentos frequentemente administrados nas Unidades de Cuidados Intensivos para estabilizar a função cardiocirculatória. Nos seres humanos, as catecolaminas atuam em recetores adrenérgicos que pertencem à família dos recetores articulados a proteínas G (GPCR). Os fungos são um modelo muito bem caracterizado para a investigação científica e biomédica. Está descrita a existência destes recetores GPCR em leveduras com um local de ligação ao GTP idêntico ao dos GPCR dos seres humanos. Considerando as várias homologias entre leveduras e células humanas, postulámos a hipótese de que a adrenalina poderia atuar na *C. albicans* ligando-se a GPCR semelhantes aos recetores adrenérgicos humanos, influenciando assim a resistência aos antifúngicos. Estes estudos revelaram que a adrenalina aumenta a produção de energia, o crescimento fúngico, e a atividade dos transportadores de efluxo de antifúngicos azólicos.

O conhecimento dos mecanismos de resistência antifúngica permitem desenhar alternativas terapêuticas de forma a reverter a resistência. Num modelo animal de infecção sistêmica por *C. albicans*, o ibuprofeno atuou de forma sinérgica com o fluconazole, reduzindo drasticamente a carga fúngica nos ratos infetados com uma estirpe resistente de *C. albicans*. O ibuprofeno, bem conhecido como medicamento analgésico e anti-inflamatório, poderia ainda desempenhar um papel relevante numa futura estratégia terapêutica para reduzir a resistência ao fluconazole em doentes com infecções fúngicas graves.

Esta dissertação resultou numa compreensão mais abrangente dos múltiplos mecanismos que podem influenciar a resistência ou tolerância aos antifúngicos. Os resultados dos nossos estudos incluem um melhor conhecimento dos esforços que devem ser tomados para a aplicação na rotina dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos e para dar uma nova esperança na prevenção da resistência aos azoles antifúngicos.

