

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS**

Tese de Doutorado

Avaliação da suscetibilidade de *Rhodotorula mucilaginosa* frente a associações de antifúngicos com fármacos diversos

Tatiana Borba Spader

**PORTO ALEGRE,
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS**

Tese de Doutorado

Avaliação da suscetibilidade de *Rhodotorula mucilaginosa* frente a associações de antifúngicos com fármacos diversos

Tatiana Borba Spader

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Severo

Co-orientador: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para o título de doutor

**PORTO ALEGRE,
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Spader, Tatiana Borba

Avaliação da suscetibilidade de *Rhodotorula mucilaginosa* frente a associações de antifúngicos com fármacos diversos / Tatiana Borba Spader. -- 2017.
89 f.

Orientador: Luiz Carlos Severo.

Coorientador: Sydney Hartz Alves.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. *Rhodotorula mucilaginosa*. 2. suscetibilidade. 3. combinação de fármacos. 4. sinergismo. I. Severo, Luiz Carlos, orient. II. Alves, Sydney Hartz, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que colaboraram, de forma direta ou indireta, para que este trabalho fosse realizado. Agradeço em especial:

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Severo, por acreditar na minha capacidade e pela orientação. Desde o primeiro momento, você abriu as portas do seu laboratório e ofereceu apoio para que esse trabalho pudesse ser concretizado. Tenho muito a agradecer pelos ensinamentos, orientações e paciência.

Ao Prof. Dr. Sydney Hartz Alves, meu orientador desde a dissertação. Agradeço seu apoio, a partilha do saber e as valiosas contribuições para o trabalho. Acima de tudo, obrigada continuar a me acompanhar nesta jornada e por estimular o meu interesse pelo conhecimento e pela vida acadêmica.

Aos funcionários do Laboratório de Micologia pelo apoio, atenção, ajuda e paciência. Obrigada.

À Patricia Valente e Mauricio Ramírez Castrillón pela disponibilidade em realizar a identificação dos fungos por biologia molecular. Obrigada.

Ao secretário do Programa de Pós Graduação, Marco Aurélio Silva, pela ajuda, atenção e apoio dedicado durante todo o período da realização deste projeto.

Sou muito grata a todos os meus familiares e amigos pelo incentivo recebido ao longo destes anos. De vocês recebi amor, apoio, confiança e motivação incondicional.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	6
LISTA DE TABELAS.....	8
RESUMO.	9
ABSTRACT.	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.	13
2.1 <i>Rhodotorula</i> sp.....	13
2.1.1 Epidemiologia.....	13
2.1.2 Manifestações clínicas.....	14
2.1.3 Identificação morfológica.....	15
2.1.4 Suscetibilidade <i>in vitro</i> a antifúngicos e terapêutica antifúngica.	16
2.2 ANTIFÚNGICOS.....	18
2.2.1 Anfotericina B.....	18
2.2.2 Azólicos.....	20
2.2.3 Equinocandinas.....	23
2.3 TERAPIA COMBINADA.....	24
2.3.1 Combinações de Anfotericina B com azólicos.....	24
2.3.2 Combinações de quinolonas com antifúngicos.....	26
2.3.3 Combinações de estatinas com antifúngicos.....	27
2.3.4 Combinações de inibidores da calcineurina com antifúngicos.....	28
2.3.5 Combinações de inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRS) com antifúngicos.....	29
2.3.6 Combinação de inibidores dos canais de cálcio com antifúngicos.....	30
2.3.7 Combinação de antiinflamatórios não esteroidais (AINES) com antifúngicos.....	31
2.3.8 Combinação de anticoagulantes com antifúngicos.....	32
3 JUSTIFICATIVA.....	34
4 OBJETIVO.....	35
4.1. OBJETIVO GERAL.....	35
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
6 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	49

Artigo 1 Atividade <i>in vitro</i> de anfotericina B combinada com agentes não antifúngicos frente a isolados de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>.	49
Artigo 2 Atividade <i>in vitro</i> de voriconazol combinado com agentes não antifúngicos frente a <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>.	68
7 CONCLUSÕES.	85
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
9 ANEXOS	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

5HT – 5-hidroxitriptamina

AINES – antiinflamatórios não esteroidais

AMB – amphotericin B

AML – amlodipine

CAS – caspofungin

CIM – Concentrações Inibitórias Mínimas

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CNS – central nervous system

CPX – ciprofloxacin

CVC – cateter venoso central

CVV – candidíase vulvovaginal

CYP – ciclosporina A

CYP 450 – cytochrome P450

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – deoxyribonucleic acid

FICI – fractional inhibitory concentration index

FIC – fractional inhibitory concentration

FLC – fluconazole

FLX – fluoxetine

IBR – ibuprofen

ISRS – inibidores seletivos da recaptação da serotonina

ITS – internal transcribed sequence

LVX – levofloxacin

MIC – minimal inhibitory concentration

MS – Microsoft

PCR – The polymerase chain reaction

RNs – Recém-nascidos

SDA – Sabouraud glucose agar

SDB - Sabouraud glucose broth

SERT – proteína transportadora 5HT

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SNC – sistema nervoso central

SSRI – selective serotonin reuptake inhibitor

SVT – simvastatin

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VRC – voriconazole

WFR – warfarin

LISTA DE TABELAS

Table 1. Comparison of the susceptibilities of <i>R. mucilaginosa</i> Groups I and II to antifungal agents.....	66
Table 2 Percentages of synergism, indifference and antagonism that resulted from the combinations of AMB with ciprofloxacin (CPX), levofloxacin (LFX), amlodipine (AML), cyclosporin A (CYP), ibuprofen (IBP), fluoxetine (FXT), simvastatin (SVT) and warfarin (WRF).....	67
Table 1. Checkerboard FICI (median and range) of VCR in combination with AMB and non-antifungals agents against 35 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> susceptible and resistant strains.....	83
Table 2. Interactions among VRC combined with non-antifungal agents against <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strains.....	84

RESUMO

Novas formas terapêuticas e o progresso da medicina proporcionaram a emergência de infecções por *Rhodotorula mucilaginosa* em pacientes imunocomprometidos. Este estudo tem o objetivo de avaliar a suscetibilidade dos isolados de *R. mucilaginosa* aos antifúngicos convencionais, verificar a habilidade destes em modificar seu perfil de suscetibilidade após exposição a crescentes concentrações de anfotericina B (AMB) e comparar a atividade antifúngica de AMB ou voriconazol (VCR) em combinação com fármacos diversos frente aos dois grupos de *R. mucilaginosa*. Trinta e cinco isolados de *R. mucilaginosa* proveniente de pacientes foram estudados. Os isolados foram identificados baseado em métodos microbiológicos e moleculares. Definimos como grupo I os isolados fúngicos originais e grupo II como estes mesmos isolados após serem submetidos a crescentes concentrações de AMB. A exposição à AMB foi realizada segundo Fekete-Forgács *et al.*, com algumas modificações. Os testes de susceptibilidade foram realizados de acordo com a técnica de microdiluição em caldo (CLSI M27-A3). AMB, caspofungina, fluconazol e VRC foram testadas isoladamente e ciprofloxacino, levofloxacino, anlodipino, ciclosporina A, fluoxetina, ibuprofeno, sinvastatina e varfarina foram testadas em combinação com AMB ou VRC, utilizando a técnica de microdiluição em caldo “checkerboard”. Os isolados do grupo I foram suscetíveis a baixas concentrações de AMB. A suscetibilidade ao VCR foi muito reduzida. Fluconazol e caspofungina não exibiram atividade frente a *R. mucilaginosa*. A exposição prolongada à AMB modificou a suscetibilidade dos isolados. Os testes de suscetibilidade com os isolados do grupo II mostraram elevadas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) para AMB e a inibição pelo VCR requisiu CIMs mais elevadas. No grupo I, a combinação de AMB + ibuprofeno mostrou o maior número de interações sinérgicas. No grupo II, a combinação com o maior número de interações sinérgicas foi AMB + sinvastatina. No grupo I, quando VCR foi combinado com levofloxacino, um potente sinergismo foi observado frente a isolados de *R. mucilaginosa*. No grupo II, combinação de VRC + ciclosporina A mostrou um potente sinergismo. Os tratamentos para infecção por *R. mucilaginosa* são restritos e a terapia combinada pode ser uma alternativa quando novos fármacos são combinados com aqueles já disponíveis no mercado.

ABSTRACT

New therapies and medical progress have led to emerging fungal infections by *Rhodotorula mucilaginosa* in immunocompromised patients. The objectives of this study were to evaluate the susceptibility profile of *Rhodotorula mucilaginosa*, verify the ability of this species to change its susceptibility profile after exposure to high concentrations of AMB, and compare the antifungal activity of AMB or voriconazole (VCR) plus combinations of non-antifungal medications against the two groups of *R. mucilaginosa*. Thirty-five strains of *R. mucilaginosa* isolated from patients were studied. The isolates were identified based on microbiological and molecular methods. We defined group I to be the original strains isolated from patients and group II as the same strains after *in vitro* exposure to AMB. AMB exposure was assayed according to Fekete-Forgács *et al.*, with some modifications. Susceptibility tests were performed using the broth microdilution method (CLSI M27-A3). AMB, caspofungin, fluconazole (FLC), and VRC were tested alone and ciprofloxacin, levofloxacin, amlodipine, cyclosporine A, fluoxetine, ibuprofen, simvastatin, and warfarin were tested in combination with AMB or VRC, using the broth microdilution checkerboard technique. All group I isolates were susceptible to low concentrations of AMB. Susceptibility to VRC was quite poor. FLC and CAS exhibited no activity against *R. mucilaginosa*. Prolonged exposure to AMB changed the susceptibility of the isolates. The susceptibility tests with strains from group II showed high minimal inhibitory concentration (MICs) for AMB and the inhibition by VRC required more elevated MICs. In group I, the combination AMB + ibuprofen demonstrated the highest number of synergistic interactions. In group II, the most synergistic interactions was AMB + simvastatin. In group I, When VCR was combined with levofloxacin, a strong synergism was demonstrate against *R. mucilaginosa* isolates. In group II, VRC + cyclosporine A combination demonstrated a potent synergism. Treatments for *R. mucilaginosa* are restricted and a multidrug approach seems to be an alternative by administering novel chemical entity drugs with drugs currently on the market simultaneously.

1 INTRODUÇÃO

O perfil epidemiológico dos fungos leveduriformes de importância médica sofreu grandes alterações nas últimas décadas. Espécies fúngicas que inicialmente eram classificadas como comensais, passaram a causar infecções oportunistas com altas taxas de mortalidade em hospedeiros susceptíveis (1). Dentre estas destacamos o gênero *Rhodotorula*, cujas espécies estão amplamente distribuídas na natureza, podendo estar presentes em uma infinidade de fontes como ar, solo, água, plantas, além do ambiente doméstico (2). Estas espécies são consideradas não patogênicas e frequentemente são isoladas da pele, das unhas e do trato respiratório, gastrointestinal e urinário. Culturas positivas isoladas repetidamente de locais estéreis, como sangue, líquido peritoneal ou líquor; são indicativas de infecção fúngica subjacente (3). Em 1960, foi publicado o primeiro caso de fungemia por *Rhodotorula* em uma paciente com endocardite (4). Desde então, o número de infecções por este gênero aumentou nos últimos anos, especialmente quando as condições de imunossupressão estão presentes (dispositivos permanentes, exposição a antibióticos de amplo espectro e neutropenia). O principal fator de risco para o desenvolvimento de infecções por este gênero é a presença de cateter venoso central (CVC) (5).

Na maioria dos casos em que *Rhodotorula* é o patógeno responsável pela infecção, as espécies *R. mucilaginosa*, *R. glutinis* e *R. minuta* são as mais envolvidas (6). Fungemia associada ao uso de cateter é a manifestação clínica mais frequente. Ao contrário das fungemias, as infecções localizadas, como infecções de pele, ocular, juntas protéticas e infecções peritoneais; não estão relacionadas a imunossupressão ou ao uso de CVC (7,8,9). Outras complicações incluem infecção no sistema nervoso central (SNC), como meningite e ventriculite (10). Apesar destas espécies evidenciarem fácil crescimento em culturas de líquor, inicialmente podem ser consideradas contaminantes, determinando demora no início da terapia antifúngica (11).

Devido à escassa experiência clínica no manejo de infecções por *Rhodotorula*, o tratamento mais apropriado ainda merece investigações. Anfotericina B isolada ou em combinação com flucitosina permanece como terapia de escolha para tratamento de infecções causadas por este gênero. Antifúngicos azólicos e equinocandinas não são recomendados devido ao elevado número de casos de

resistência a estas classes durante o tratamento clínico (12). Os testes de suscetibilidade demonstram que este gênero é suscetível à anfotericina B e à flucitosina, *in vitro*, com Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ e $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$, respectivamente (13,14). De uma maneira geral, os antifúngicos azólicos demonstram pouca atividade frente a isolados de *Rhodotorula* sp. O gênero evidencia resistência intrínseca ao fluconazol com valores de CIM $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ e ao voriconazol com CIMs variáveis entre de 1 a $> 8 \mu\text{g/ml}$ (15,16). *Rhodotorula* é resistente às equinocandinas requerendo elevados valores de CIM para micafungina, anidulafungina e caspofungina (13).

Estudos de suscetibilidade tornaram-se relevantes pela emergência da resistência entre patógenos fúngicos clássicos, sobretudo entre os fungos oportunistas. A correta identificação do micro-organismo é imprescindível para o correto tratamento de infecções fúngicas. Em vista de limitadas opções da terapêutica antifúngica, as combinações de fármacos passam a ter relevância, seja pela ação direta, no caso da combinação flucitosina + anfotericina B, seja pelo potencial de associações que permitem investigação. Através de combinações é possível aumentar a potência dos fármacos, reduzir doses tóxicas, reduzir os efeitos adversos e transpor a barreira da resistência. Estudos de eficácia, doses e regimes terapêuticos são necessários para melhor entendimento de novas opções terapêuticas (7).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Rhodotorula* sp.

2.1.1 Epidemiologia

Rhodotorula é um fungo leveduriforme saprófita que está presente no meio ambiente, pois são colonizadoras de plantas e mamíferos. Este gênero já foi isolado do ar, solo, lagos e oceanos, leite e frutas. Embora o consumo de alimentos contaminados com leveduras não seja considerado causa de doença, há uma preocupação crescente de que a alimentação pode ser uma fonte subestimada de patógenos ambientais (17). *Rhodotorula* também está presente nos ambientes hospitalares, tendo sido isolada das mãos de profissionais da saúde e de pacientes (18). Devido a sua especial afinidade por plástico, estas leveduras já foram isoladas de vários equipamentos médicos, como materiais de diálise, broncoscópios de fibra-óptica; além de outras fontes ambientais como cortinas de chuveiro, banheiras e escovas de dente (19).

Em humanos, o primeiro caso de fungemia por *Rhodotorula* foi descrito por Louria *et al.*, em 1960 (4). Desde então, vários relatos já foram descritos na literatura. Estudos recentes indicam a incidência de fungemia entre 0,5% e 0.23% nos Estados Unidos e Europa. Em um estudo realizado no Brasil, compreendendo um período de nove anos, 2.3% dos isolados fúngicos em hemoculturas positivas pertenciam ao gênero *Rhodotorula*, em comparação aos 83.4% de infecções por *Candida* e 6.6% de infecções por *Cryptococcus* (1). Infecções da corrente sanguínea são frequentemente observadas na presença de CVC (20,21).

O aumento do número de casos de fungemia relacionado a cateteres está associado a modalidades de tratamento mais agressivos, que incluem admissão em unidades de tratamento intensivo, uso de CVC, administração de nutrição parenteral a curto e longo prazo, uso de antibacterianos de amplo espectro, transplante de órgãos e quimioterapia (19,22). A maioria dos pacientes que desenvolvem infecção por *Rhodotorula* possuem algum tipo de malignidade hematológica, transplante de órgãos, neutropenia ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (19,23). Por outro lado, infecções localizadas como endoftalmite, onicomicoses, meningites, infecções em articulações devido a próteses, peritonites associadas a diálise, podem

acometer tanto pacientes imunocomprometidos como pacientes imunocompetentes (7).

A mortalidade em casos de fungemia por este gênero corresponde a aproximadamente 15%, mesmo quando a terapia antifúngica é administrada (1). Fungemias não associadas ao uso de CVC evidenciam maiores taxas de mortalidade do que as endocardites e fungemias associada ao uso de cateter (7). Merece atenção o registro de um estudo onde a taxa de mortalidade atingiu 42% mesmo após instaurada a terapia antifúngica (24).

2.1.2 Manifestações clínicas

Muitas espécies do gênero *Rhodotorula* são consideradas não-patogênicas, porém algumas espécies se destacam como patógenos emergentes e causadores de infecções distintas. A revisão sistemática de Tuon & Costa avaliou 128 casos descritos de infecções por *Rhodotorula* (7). A espécie mais comumente identificada foi *R. mucilaginosa*, presente em 83.4% dos episódios, seguida por *R. glutinis* em 7.7%. As fungemias associadas a presença de CVC são a manifestação mais frequente de infecção. Esta forma geralmente é acompanhada de febre de etiologia desconhecida e não responsiva ao tratamento antimicrobiano, calafrios, hipotermia e hipotensão (7,25). Os pacientes adultos submetidos a transplante de medula óssea, com malignidades hematológicas ou pacientes com SIDA são aqueles mais suscetíveis a desenvolver infecção sistêmica por este gênero (7,24,26). Os casos publicados que envolvem crianças são raros e abrangem quase que exclusivamente aquelas com malignidades hematológicas ou tumores (26). Importantes estudos realizados em unidades neonatais associaram os casos de fungemia por *Rhodotorula* ao uso de cateter venoso umbilical ou CVC. Outros fatores de risco relatados foram a prematuridade dos bebês, terapia antimicrobiana prolongada e administração de fluconazol com finalidade profilática (25,27).

R. mucilaginosa e *R. glutinis* são responsáveis por causarem infecções no SNC, atingindo especialmente pacientes com SIDA, pacientes com malignidades hematológicas ou com doenças autoimunes (21,28,29). Meningites e ventriculites por *Rhodotorula* também foram relatados em pacientes imunocompetentes (31,32). Estes casos podem se desenvolver de maneira aguda, subaguda ou crônica, podendo ter evolução fatal (21,31). Os sintomas incluem febre, dor de cabeça,

alteração sensorial, edema cerebral a rigidez na nuca (28,32). Em um primeiro momento, o diagnóstico presuntivo de meningite criptocócica pode ser aceito com base na semelhança morfológica destas espécies em exames diretos, pois, infecções por *Cryptococcus* spp. são mais comuns neste sítio.

Infecções no SNC por espécies de *Rhodotorula* são consideradas infecções nosocomiais. Somente um caso de infecção na comunidade foi descrito, com dúvidas a respeito do acesso do fungo ao líquido sem a quebra de barreira (29). Embora seja uma levedura de crescimento rápido, períodos prolongados de incubação foram observados antes do aparecimento dos sintomas (33).

Infecções oculares por *Rhodotorula* também estão descritas na literatura. Acometendo principalmente pacientes imunocompetentes, este tipo de infecção compreende as endoftalmites, ceratites e infecções de córnea. Casos de endoftalmites possuem prognóstico mais sombrio, a perda da visão é relatada em todos os pacientes acometidos (7). Casos de endoftalmites foram descritos em pacientes com história de abuso de drogas ou com SIDA (34,35). As ceratites são relatadas após um trauma, transplante ou enxerto de córnea. Os sintomas são visão diminuída, abscesso, dor, vermelhidão, lacrimejamento, secreção e fotofobia (36,37). Em países subdesenvolvidos, as infecções de córnea são observadas em agricultores cujo trauma está relacionado a atividades laborais na natureza (36).

Os pacientes com falência renal crônica ou em diálise peritoneal sob uso do cateter de Tenckhoff também estão sujeitos a desenvolver peritonite por *Rhodotorula* (7). O desenvolvimento de peritonite fúngica é uma complicação incomum, porém contribui de maneira significativa para a morbidade e mortalidade (38). Os sintomas incluem dor abdominal, náuseas, anorexia, vômitos e ocasionalmente diarreia (39). A infecção através do cateter de diálise provém da contaminação deste dispositivo com micro-organismos saprófitos presentes no meio ambiente (34).

Outras infecções por *Rhodotorula* também foram descritas, como infecção de prótese ortopédica (40,41), hidro-salpingite (42), linfadenite (43), infecção da pele (44,45,46), onicomicose (47,48), úlceras orais infectadas (49,50).

2.1.3 Identificação morfológica

O gênero *Rhodotorula* foi descrito em 1927 por Harrison F.C. (51). Essas leveduras pertencem ao reino Fungi, filo Basidiomycota, classe Urediniomycetes,

ordem Sporidiales, família Cryptococcaceae subfamília *Rhodotorulalodeae* (52). Várias espécies fazem parte do gênero, mas somente *R. mucilaginosa*, *R. minuta* e *R. glutinis* são responsáveis por infecções em humanos (13). No homem, *Rhodotorula* sp. pode ser isolada de vários sítios, porém culturas positivas de amostras biológicas como sangue, líquido peritoneal, líquido cefalorraquidiano (líquor) ou biópsia são sugestivas de infecção por este fungo (14).

As leveduras demonstram crescimento rápido e se apresentam na forma de colônias com aspecto liso, mucoides, brilhantes, arredondadas e de coloração que varia do rosa ao avermelhado, pois possuem pigmentos carotenoides conhecidos como torularodina. A presença da cápsula produz um aspecto mucoide nas colônias, enquanto outras são pastosas ou secas e rugosas (19). Na microscopia observam-se blastoconídeos unicelulares, ovais, arredondados ou alongados que possuem reprodução por brotamento multilateral. Raramente apresentam pseudohifa e as hifas estão ausentes (1).

Testes bioquímicos evidenciam a assimilação de glicose, sacarose, maltose, trealose, xilose e rafinose. Este gênero hidrolisa a ureia, mas não possui capacidade fermentativa (31). *Rhodotorula* spp. e *Cryptococcus* spp. possuem propriedades morfológicas semelhantes, porém o gênero *Rhodotorula* não assimila inositol e produz pigmento carotenóide em culturas, o que não ocorre no gênero *Cryptococcus*. Também difere de outros gênero que apresentam colônias pigmentadas, como *Sporobolomyces*, pela ausência da formação de balistósporo (1).

Em pacientes com meningite por este gênero, as análises citológicas e bioquímicas do líquido cefalorraquidiano exibem pleocitose linfocítica com decréscimo da dosagem de glicose e aumento na concentração de proteínas (33). Os exames microscópicos baseados em preparações a fresco com tinta da Índia evidenciam células leveduriformes, encapsuladas e com brotamento. Esfregaços corados pela técnica de Gram exibem células leveduriformes redondas ou ovaladas, medindo 4-8 μm de diâmetro e com presença ocasional de células inflamatórias (31).

2.1.4 Suscetibilidade *in vitro* a antifúngicos e terapêutica antifúngica

Vários estudos tem sido realizados para avaliar a suscetibilidade deste gênero frente a fármacos disponíveis no mercado. Os isolados de *Rhodotorula* spp. são

mais sensíveis a anfotericina B e flucitosina e menos suscetíveis aos azólicos. As CIMs para anfotericina B variam de 0,25 a 1 µg/ml e para flucitosina de 0,06 a 0,25 µg/ml. A suscetibilidade aos azólicos exhibe resultados variados: ao posaconazol a suscetibilidade varia de 2,0 a > 4,0 µg/ml; ao voriconazol as CIMs variam de 1 a > 8 µg/ml; frente a fluconazol as CIMs são ≥ 32 µg/ml e ao itraconazol as CIMs variam entre 0,125 e > 4,0 µg/ml. A resistência intrínseca de *Rhodotorula* é observada para a classe de equinocandinas, onde a CIM de caspofungina é de 16 µg/ml e de micafungina >64 µg/ml (14,15,16,53).

As equinocandinas e o fluconazol não devem ser considerados como opções terapêuticas frente a este gênero, todavia, o voriconazol pode ser uma opção no caso de resistência a anfotericina B ou em casos de comprometimento renal. Embora *Rhodotorula* exiba alguma sensibilidade os azólicos como ravuconazol e posaconazol os relatos de experiências clínicas com esses agentes são escassos, dificultando a avaliação da sua eficácia clínica (7).

O estudo de Tuon *et al.* descrevendo 128 casos de infecções por *Rhodotorula* apontou a anfotericina B como fármaco de escolha para fungemias, utilizada em tratamentos com duração de 14 a 41 dias. A flucitosina, isoladamente, ou em combinação com anfotericina B, também mostrou bons resultados no tratamento deste tipo de infecção. Em alguns casos, o sucesso da terapêutica antifúngica foi alcançado sem a necessidade da remoção do CVC (7).

Em um estudo envolvendo infecção por este gênero em uma UTI neonatal, quatro bebês foram infectados em um período de 19 dias. Abandonou-se a terapia profilática com fluconazol e se instaurou a terapia antifúngica com anfotericina B após a segunda hemocultura positiva para *Rhodotorula*. O sucesso do tratamento foi alcançado após duas semanas com a negativação das hemoculturas (27). No estudo de Duggal *et al.*, a administração de fluconazol em um recém-nascido (RN) foi substituída por anfotericina B após a hemocultura positivo para *Rhodotorula*. A melhora do paciente foi alcançada após o tratamento com voriconazol, alternativa adotada devido aos danos renais provocados pela anfotericina B neste RN (25).

Anfotericina B também é recomendada no tratamento de infecções oculares. O uso de antifúngicos sistêmicos é preferível em endoftalmites; todavia prefere-se tratamento tópico ou injeção intravitreal de anfotericina B em casos de ceratites (7,36,37). Em casos de peritonite por *Rhodotorula*, o tratamento inicia com a remoção do cateter de Tenckhoff com subseqüentes sessões de hemodiálise. A

terapia sistêmica com anfotericina B permanece de duas a quatro semanas ou até o desaparecimento dos sintomas (39,41).

2.2 ANTIFÚNGICOS

Durante muitos anos, a anfotericina B foi o único antifúngico disponível para tratamento de uso sistêmico, apesar do inconveniente de ser muito tóxica. Nos anos subsequentes houve o lançamento dos azólicos e das equinocandinas. Esses novos fármacos proporcionaram uma terapia mais direcionada e menos tóxica do que os seus antecessores. Atualmente, novas formulações e a terapia combinada estão sendo estudadas para uso (54).

2.2.1 Anfotericina B

A anfotericina B é um agente antifúngico poliênico isolado pela primeira vez do *Streptomyces nodosus* em 1955 e ainda permanece como o principal fármaco fungicida mais efetivo e de amplo espectro para o tratamento de micoses sistêmicas. Tanto a resistência intrínseca quanto a adquirida são pouco expressivas. Na tentativa de aumentar a eficácia terapêutica e reduzir a toxicidade, a anfotericina B tem sido combinada com outros antifúngicos.

A anfotericina B é um antibiótico macrolídeo heptaênico, possui sete ligações duplas conjugadas na posição trans e uma micosamina ligada ao anel principal por uma ligação glicosídica (55). A atividade antifúngica é mediada pela sua ligação a uma fração esterol presente na membrana de fungos sensíveis. Esta interação resulta na formação de canais iônicos, permitindo o extravasamento de componentes celulares e a morte da célula fúngica. Embora anfotericina B tenha uma maior afinidade para se ligar ao ergosterol fúngico, também possui afinidade na ligação ao colesterol das membranas celulares de mamíferos contribuindo, assim, para a produção de efeitos adversos e toxicidade associadas a este antifúngico (56, 57). Um mecanismo de ação adicional envolve dano direto à membrana e morte celular devido as propriedades oxidantes do fármaco, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio e na peroxidação lipídica das membranas celulares (57). Um terceiro mecanismo de ação da anfotericina B se deve a uma potencialização não específica das defesas do hospedeiro. A anfotericina B

evidencia, também, atividade como um imunoadjuvante estimulando a proliferação de células imunológicas em modelos animais (58), resultando em aumento da capacidade fagocítica, antitumoral e antibacteriana dos macrófagos em camundongos (59). A anfotericina B induz a produção de múltiplas citocinas inflamatórias, como interleucinas e fatores de necrose tumoral, além de aumentar a síntese de óxido nítrico *in vitro* (60). Em contraste, estudos relatam que este fármaco inibe a quimiotaxia de neutrófilos, inibe a resposta induzida por antígenos, diminui o número de células monucleares e diminui a atividade de células *natural killers* (61,62). Dessa maneira, a atividade antifúngica tem como pontos básicos, a formação de poros na membrana celular, o dano oxidativo e a inibição da atividade metabólica.

Este antifúngico possui atividade frente a *Rhodotorula*, *Candida* sp. *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium*, *Trichosporon*, *Pseudallescheria*, *Malassezia*, *Aspergillus* sp., *Fusarium* spp. e zigomicetos (14,61). Este antifúngico também demonstra algum grau de atividade frente a *Leishmania brasiliensis*, *Trypanosoma* sp., e *Naegleria fowleri* (55). Algumas espécies de *Candida* spp. como *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* vem demonstrando redução de suscetibilidade e possível resistência a este antifúngico. *A. terreus* exibe uma maior resistência do que as outras espécies deste gênero. Alguns isolados de *C. neoformans* com reduzida suscetibilidade também já foram relatados em pacientes com SIDA. Os isolados resistentes substituem o ergosterol por esteróis precursores de sua síntese (16,64) permitindo que o micro-organismo escape da atividade da anfotericina B. Vários estudos também constataram que isolados resistentes evidenciam aumento da atividade da catalase intracelular, enfraquecendo o dano oxidativo produzido pelo antifúngico (65).

A aquisição de resistência a anfotericina B raramente ocorre entre as espécies de *Candida*. Os casos registrados de falha na resposta ao tratamento, *C. lusitaniae* foi o agente infeccioso implicado (66). A resistência promove nas células leveduriformes alterações na composição das membranas lipídicas, comprometendo a fluidez e a permeabilidade das mesmas (67). A principal alteração bioquímica na resistência aos poliênicos envolve enzimas que participam da biossíntese do ergosterol. Defeitos nos genes *ERG2* e *ERG3*, que codificam C-8 esterol (convertendo fecosterol e episterol com baixa afinidade a anfotericina B) e a delta-

5,6-desaturase, resultam em modificações qualitativas e quantitativas no conteúdo de ergosterol da membrana que influenciam na quantidade de ergosterol e sua disponibilidade para a ação dos polienos (68). Um gene ERG defeituoso resulta em baixos níveis de ergosterol na membrana fúngica, conferindo resistência cruzada entre azólicos e polienos em isolados de *Candida* (69).

Apesar do mecanismo de resistência em *Candida* spp. já estar descrito, este mecanismo em outras espécies fúngicas ainda não está claro. A resistência a anfotericina B em isolados de *C. neoformans* em paciente com SIDA foi relacionada com alterações no esterol delta 8-7-isomerase. O gênero *Aspergillus* é comumente resistente a anfotericina B com algumas variações entre as espécies, porém sem alteração no conteúdo do ergosterol. Um dos mecanismos propostos para a resistência que ocorre nas espécies *A. terreus* provém do bloqueio da via de sinalização do Ras pelo Hsp90 e Hsp 70, que inibe inibindo a formação de poros aquosos na membrana citoplasmática das células fúngicas (70).

Os efeitos adversos ao uso deste fármaco podem ser classificados em três grupos: reações relacionadas a infusão, relacionadas a dose e reações idiossincráticas. Os sintomas incluem febre, calafrios, náusea, vômitos, dor de cabeça e hipotensão. Acredita-se que estes efeitos relacionados com a infusão se devem a produção de mediadores pró inflamatórios por monócitos e macrófagos em resposta a exposição a anfotericina B (65,71). Arritmias também são relatadas quando elevadas concentrações do antifúngico são infundidas muito rapidamente, especialmente em pacientes com doenças cardíacas, com doenças renais ou nos casos de superdosagem (72). A nefropatia relacionada a dose ocorre devido diminuição da filtração glomerular, redução do fluxo sanguíneo renal e acidose tubular. Alterações bioquímicas como hipocalcemia e hipocalcemia também são relatadas. Alterações hematológicas como anemia normocítica e normocrômica também são identificadas em resposta a diminuição da produção de eritropoietina (73,74). As reações idiossincráticas com anafilaxia, falência hepática, hipertensão e falência respiratória são raras e imprevisíveis.

2.2.2 Azólicos

Em 1979 foi lançado o miconazol, introduzindo no mercado uma nova classe de antifúngicos para tratamento de micoses sistêmicas. Em sequência, cetoconazol

(1981), fluconazol (1990) e itraconazol (1992) foram desenvolvidos, sendo considerados efetivos e mais seguros que seu antecessor anfotericina B, além da facilidade de serem administrados de forma oral (75). No entanto, estes fármacos não possuem atividade frente a alguns fungos filamentosos que são importantes agentes oportunistas. A segunda geração de triazólicos possui um espectro de ação estendido, especialmente contra fungos filamentosos e espécies de *Candida* resistentes. O voriconazol foi aprovado em 2002 e o posaconazol em 2006 (76,77).

Os azólicos são, quimicamente, classificados como imidazóis (dois átomos de nitrogênio no anel azol) e triazóis (três átomos de nitrogênio no anel azol). O voriconazol possui estrutura semelhante ao fluconazol, porém possui atividade superior, espectro ampliado e baixa hidrossolubilidade. Os triazóis sistêmicos são metabolizados mais lentamente e exercem menos efeitos sobre a síntese de esteróis humanos que os imidazóis (78).

O mecanismo de ação primária se baseia na inibição da enzima citocromo P-450, responsável pela síntese do ergosterol, o mais importante esteroide presente na membrana celular dos fungos. Em nível molecular, a ligação do nitrogênio livre do azol com a fração heme C-14D demetilase do fungo inibe a desmetilação do lanosterol, desprovendo a célula de ergosterol e favorecendo a acumulação de vários 14D metilesteróis. Essa reação resulta na alteração da estrutura e no funcionamento normal da membrana celular, além da inibição do crescimento e morfogênese celular (79).

Antifúngicos azólicos são considerados agentes fungistáticos em doses terapêuticas e possuem amplo espectro de atividade frente a maioria dos patógenos associados a infecções sistêmicas (80). Possuem atividade frente a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. neoformans*, *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *Coccidioides*, *P. brasilienses* e dermatófitos. Os fungos filamentosos *Aspergillus*, *Scedosporium*, *Fusarium* e *Sporothrix* possuem sensibilidade intermediária. *C. krusei* e os agentes de mucormicose, mostram-se resistentes aos azólicos, exceto para voriconazol e posaconazol (80,81). A resistência intrínseca aos antifúngicos azólicos tem sido observada para isolados de *C. krusei*, pois estes demonstram resistência ao fluconazol mas são sensíveis ao voriconazol. A resistência secundária ocorre durante a terapia prolongada com azólicos (82,83). Este tipo de resistência é mais frequente em paciente com SIDA, pacientes transplantados ou sob efeito de quimioterápicos. Este mecanismo de resistência inclui alteração ou superexpressão

da enzima alvo dos antifúngicos azólicos, efluxo do fármaco de dentro da célula fúngica, redução ou perda da função da enzima dessaturase prevenindo a acumulação do 14-metoxiesterol (84). Alguns estudos correlacionaram a resistência ao fluconazol e voriconazol, demonstrando a existência de resistência cruzada entre os azólicos frente a espécies de *Candida* (85). A resistência adquirida ao itraconazol frente a isolados de *A. fumigatus* também foi relatada em pacientes recebendo prolongado tratamento com este agente (86).

O voriconazol mantém as propriedades gerais dos azólicos, mas o bloqueio da síntese do ergosterol ocorre mais intensamente nos fungos filamentosos. O voriconazol possui atividade *in vitro* frente a *Aspergillus*, incluindo a espécie de *A. terreus* que é considerada resistente a anfotericina B. Possui atividade contra espécies de *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Alternaria*, *Bipolaris* e sobre *Scedosporium apiospermum*. A ação fungistática é observada para as espécies de *Candida*, incluindo aquelas resistentes ao fluconazol, *Cryptococcus* spp. e *Trichosporon* spp., agindo também sobre fungos de micoses endêmicas (87). O voriconazol é usado por via oral com boa biodisponibilidade ou por via endovenosa. É capaz de atingir níveis inibitórios no líquido e no encéfalo (88).

O principal vantagem desta classe de fármacos é o menor potencial em causar efeitos adversos, especialmente quando comparados com anfotericina B. A principal reclamação provem de alterações no trato gastrointestinal e consistem em anorexia, náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal (89). Alguns azólicos também possuem a propriedade de causar alteração nas funções hepática, com o aumento reversível do nível das transaminases. Raros relatos descrevem falência hepática associada ao uso de cetoconazol, fluconazol, itraconazol e voriconazol (90,91). Além dos casos descritos acima, exantema generalizado, síndrome de Stevens-Johnson e necrose tóxica epidermal estão associadas ao uso de fluconazol e voriconazol (92). O voriconazol também está associado a eritema/descamação induzida pela luz, devendo-se evitar a luz solar quando em uso dessa medicação. Efeitos reversíveis relacionados com a dose também são observados como distúrbios neurológicos e alterações visuais (92). O uso durante a gravidez e no aleitamento deve ser evitado, sob o risco de má formação congênita. Relatos descrevem anormalidades craniofacial, esqueléticas e cardíacas em crianças cuja mãe tenha sido tratada com este medicamento na gravidez (93).

2.2.3 Equinocandinas

As equinocandinas são uma nova classe, altamente seletiva, de lipopeptídeos semissintéticos cuja atividade ocorre na parede celular fúngica através da inibição da enzima ligada a síntese de beta (1,3) D glucana. A glucana na forma de microfibrilas é um dos principais componentes da parede celular fúngica. Como este componente é essencial a vitalidade dos fungos e inexistente nas células dos mamíferos, a referida estrutura representa um alvo ideal para a ação dos antifúngicos. A parede celular possui funções de crescimento e divisão celular, além de controlar a tumidez interna da célula. As alterações na membrana celular determinam uma instabilidade osmótica que resulta em lise da célula fúngica (94). Os principais representantes dessa classe são: caspofungina, anidulafungina e micafungina. Estes fármacos possuem poucas diferenças entre si no que diz respeito ao espectro de ação, farmacodinâmica, farmacocinética, segurança e eficácia antifúngica (95).

A caspofungina é um lipopeptídeo semissintético, hidrossolúvel, sintetizado a partir do produto de fermentação de *Glarea lozoyensis*. É composta de hexapeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral de ácido graxo. Possuem amplo espectro de ação frente a *Candida* e *Aspergillus*, são fármacos considerados seguros e apresentam características farmacocinéticas favoráveis. A caspofungina possui ação fungicida frente a diferentes espécies de *Candida*, incluindo as amostras resistentes ao fluconazol e anfotericina B. *C. guilliermondi* evidencia menor sensibilidade *in vitro* e alguns isolados sofrem apenas a ação fungistática da caspofungina. Em doses terapêuticas, esta equinocandina pode inibir amostras de espécies de *Aspergillus*, porém, CIMs maiores foram requeridas para os isolados de *A. terreus* e *A. nidulans* (96).

Testes *in vitro* revelam atividades fungicidas frente a maioria das espécies de *Candida*, porém isto não é observado frente a espécies de *Aspergillus*. Neste gênero, as extremidades das hifas tornam-se bulbosas e podem sofrer rupturas. As equinocandinas demonstram atividade frente a *Saccharomyces cerevisiae*, mas não demonstram atividade frente a *Rhodotorula*, *C. neoformans* ou *T. asahii*. Variado perfil de suscetibilidades foram observados frente a fungos demáceos e outros fungos filamentosos. São consideradas inativas frente a hialohifomicetos e aos

zigomicetos. Em modelos animais, as equinocandinas mostraram-se efetivas frente a espécies de *Pneumocystis pneumonia* (15,94,97).

Devido ao seu distinto mecanismo de ação, as equinocandinas não revelaram resistência cruzada com a anfotericina B ou fluconazol em isolados de *Candida* e *Aspergillus*. A resistência intrínseca raramente é observada entre os fungos suscetíveis, embora nos estudos envolvendo a exposição de isolados a crescentes concentrações de caspofungina não ficou demonstrada a resistência secundária frente a *Candida* spp. (98). A resistência a um representante desta classe está associada a resistência cruzada as outras equinocandinas. A resistência secundária manifestada por *Aspergillus* spp. é verificada com mais frequência em estudos in vitro do que em pacientes suscetíveis (99).

A caspofungina é um fármaco seguro e bem tolerado. Os ensaios clínicos descrevem que menos de 5% dos pacientes descontinuaram o tratamento de maneira prematura devido aos efeitos adversos do fármaco (100,101). Os efeitos colaterais mais comumente observados incluem febre, flebite, náusea e dor de cabeça. Sintomas como alergia, inchaço facial, prurido e aquecimento corporal são mediados pela liberação de histamina endógena (102). Alterações bioquímicas também são observadas em alguns pacientes, como o aumento da atividade de enzimas hepáticas no soro, assim como a diminuição do potássio, da hemoglobina e da contagem de leucócitos (103).

2.3 TERAPIA COMBINADA

As combinações antifúngicas podem ser utilizadas para melhorar a eficácia da terapia antimicrobiana em infecções de difícil tratamento por expandir seu espectro de atividade, porém estas combinações nem sempre são sinérgicas. Dessa maneira, a administração de combinações entre fármacos de diferentes classes terapêuticas deve ser utilizada com cautela para se evitar as interações antagônicas entre os fármacos (104).

2.3.1 Combinações de Anfotericina B com azólicos

É uma combinação que envolve muita controversa. A interação antagônica gerada pela combinação de anfotericina B e azólicos pode ser explicada com base

em seus mecanismos de ações. Os azólicos inibem a síntese do ergosterol dos fungos interferindo na ação da anfotericina B, pois, esta exerce sua atividade antifúngica se ligando ao ergosterol na membrana celular fúngica. A pré-exposição dos isolados aos azólicos pode alterar algumas características da membrana celular reduzindo a afinidade da anfotericina B pelo sítio de ação (104). Por outro lado, na prática, os resultados obtidos pelas combinações de antifúngicos variam de sinergismo a antagonismo. O estudo de Li *et al.* avaliou a combinação de anfotericina B e voriconazol frente a isolados de *T. asahii*. Os resultados obtidos evidenciaram a predominância de efeitos indiferentes, com 17% de sinergismo e nenhum antagonismo observado (105). O estudo de Barchiesi *et al* descreveu 7% de sinergismo para a combinação de anfotericina B mais fluconazol ou itraconazol frente a isolados de *Cryptococcus neoformans* e não observou antagonismo. Quando os testes foram realizados *in vivo*, a combinação de anfotericina B com fluconazol mostrou melhores condições de sobrevida e com redução da infecção tecidual quando comparados com a administração de fluconazol isoladamente (106).

Em estudos *in vivo*, a combinação de anfotericina B e voriconazol mostrou sinergismo em 20 a 30% frente a isolados de *Aspergillus*, quando baixas doses de anfotericina B e altas doses de voriconazol foram administradas. Nesta combinação, o antagonismo foi observado em 16% das interações quando altas doses de anfotericina B e baixas doses de voriconazol foram administradas. De maneira geral, esta combinação foi mais efetiva do que o regime de monoterapia (107). Chandrasekar *et al* utilizando cobaias neutropênicas com aspergilose pulmonar invasiva mostrou que o tratamento com a combinação de anfotericina B e voriconazol melhorou a sobrevida e reduziu a infecção nos pulmões quando comparado com o grupo controle. Apesar destes resultados, a interação indiferente foi predominante e a monoterapia mostrou resultados similares a combinação de fármacos (108).

Outros estudos envolvendo combinações de fluconazol, itraconazol ou cetoconazol com anfotericina B também mostraram baixas porcentagens de sinergismo. A maioria dos estudos de combinação entre azólicos e polienos frente a *C. albicans* mostraram antagonismo para a maioria dos isolados testados. A ordem de administração e a duração da exposição possuem papéis importantes na combinação entre fármacos, pois a pré-exposição ou as altas doses de fluconazol administradas minimizaram os efeitos da anfotericina B (104). Em modelos *in vivo*,

os resultados de acompanhamento da infecção pelos cultivos e o tempo de sobrevivência de cobaias mostrou resultados antagônicos para a combinação de fluconazol mais anfotericina B frente a *C. albicans* sensíveis ao fluconazol. A interação foi aditiva quando os isolados testados eram resistentes ao fluconazol (109).

2.3.2 Combinações de quinolonas com antifúngicos

As fluorquinolonas são moléculas sintéticas com atividade bactericida frente a micro-organismos gram-negativos e gram-positivos e classificadas em quatro gerações. De maior interesse temos o ciprofloxacino e levofloxacino que são classificadas como fluorquinolonas de segunda geração, com atividade no trato urinário e intestinal. Sua ação antibacteriana baseia-se na inibição da DNA girase (também denominada topoisomerase II), a enzima que determina o superenovelamento do DNA durante a replicação. Esta enzima é essencial ao crescimento e divisão das células bacterianas, logo, seu bloqueio, inibe os processos consequentes da sua ação, levando à morte celular (110).

Pacientes suscetíveis a infecções por bactérias e fungos podem se beneficiar com a combinação de classes terapêuticas. As fluorquinolonas, isoladamente, não possuem atividade inibidora do crescimento fúngico, entretanto, manifestam a afinidade de se ligar a topoisomerase destes. Com base neste mecanismo, essa classe de fármacos exerce inibição da replicação do DNA de fungos, mas este efeito só é percebido quando as fluorquinolonas são combinadas com antifúngicos. A combinação altera a concentração intracelular de antifúngicos e potencializa a formação de poros na membrana celular, aumentando a penetração de agentes antifúngicos e a sensibilidade da glucana sintetase às equinocandinas (111).

A ideia de sinergismo entre a combinação de antifúngicos com fluorquinolonas baseia-se no ataque deste medicamento ao fungo através de diferentes mecanismos de ação, que são aditivos e que podem suprimir o desenvolvimento de subpopulações resistentes ao antifúngico ou diminuir o tempo de resposta ao tratamento. Os estudos de Shen *et al.* e Nakajima *et al.* mostraram interações variando entre aditivas a sinérgicas frente a *Candida sp.* e *C. neoformans* para esta combinação (112,113). Sugar, Liu & Chen relataram que ciprofloxacino, trovafloxacino e DU-6859a não apresentam nenhuma atividade antifúngica

intrínseca frente a *Candida albicans* quando utilizados isoladamente, todavia, quando em combinação com polienos ou triazólicos, determinam a potencialização do efeito antifúngico (114). Vitale *et al.* constatou que a combinação de anfotericina B com ciprofloxacino e a combinação de itraconazol com ciprofloxacino ou levofloxacino produziu efeitos sinérgicos frente a isolados de *Exophiala spinifera*. Para essas combinações interações antagônicas não foram observadas (116).

Em outro estudo, a combinação de fluconazol com quinolonas mostrou um efeito no prolongamento da sobrevivência de camundongos infectados com *Rhizopus oryzae*. Os camundongos com mucormicose pulmonar tratados somente com fluconazol, não mostraram resultados significativos quando comparados ao grupo controle; todavia, quando a terapia foi combinada com ciprofloxacino, a taxa de sobrevivência aumentou para 60% nos camundongos estudados (115).

2.3.3 Combinações de estatinas com antifúngicos

As estatinas são medicamentos com atividades hipolipemiantes que podem derivar de metabólitos de micro-organismos (mevastatina, lovastatina, sinvastatina e pravastatina) ou de origem sintética (atorvastatina, fluvastatina e rosuvastatina). Seu mecanismo de ação é baseado na inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, responsável pela biossíntese do esteroide. A principal indicação das estatinas é a redução dos níveis de colesterol sanguíneo, porém outros efeitos como a diminuição da inflamação e melhora da função endotelial, também já foram avaliados (117). Alguns estudos relataram que as estatinas possuem um efeito inibitório no crescimento de diferentes fungos patogênicos (118, 119). Sun & Singh já haviam reportado que as estatinas atenuam diretamente a virulência de micro-organismos por modularem as rotas regulatórias que envolvem o processo infeccioso (120). Chin, Weitzman & Della-Latta constataram sinergismo ao combinarem a fluvastatina com fluconazol, itraconazol e anfotericina B frente a isolados de *C. albicans* e *C. neoformans*. Neste estudo foi observado que a fluvastatina mostrou atividades fungicidas e que as combinações com antifúngicos azólicos foram efetivas frente a *C. albicans* e *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol (121). Nos estudos de Nyilasi *et al.*, a interação entre estatinas e diferentes antifúngicos frente a dermatófitos mostrou interações sinérgicas quando em combinação com terbinafina ou azólicos (122). Interações aditivas foram observadas

entre anfotericina B mais atorvastatina e rosuvastatina e entre nistatina mais fluvastatina, lovastatina ou rosuvastatina frente a isolados de *C. albicans* e *C. glabrata* (123). Chamilos, Lewis, & Kontoyiannis reportaram em seu estudo que a lovastatina é ativa frente a zigomicetos e sinergismo é observado quando em combinação com voriconazol frente a isolados resistentes (124).

2.3.4 Combinações de inibidores da calcineurina com antifúngicos

A ciclosporina A é um polipeptídeo cíclico constituído por 11 aminoácidos e extraída do fungo *Tolypocladium inflatum*. É um poderoso imunossupressor capaz de prolongar a sobrevivência de transplantados homogênicos de pele, coração, rins, pâncreas, medula óssea, intestino delgado e pulmão (125). Atua através da sua ligação com imunofilinas (ciclofilina e FK506-binding protein [FKBP], respectivamente), formando um complexo que se liga à fosfatase da calcineurina. Este complexo inibe a desfosforilação catalisada pela calcineurina, essencial para permitir o movimento do fator nuclear das células T ativadas (NFAT) para o núcleo. NFAT é necessário para a transcrição de IL-2 e outras citocinas associadas à diferenciação e crescimento dos linfócitos T (linfocinas) (125).

A calcineurina é uma fosfatase ativada por Ca^{2+} e calmodulina presente nas células fúngicas. Essa proteína atua de maneira cálcio dependente na sinalização e regulação de processos celulares importantes nas células como crescimento, integridade da parede celular, transição entre estados morfológicos, homeostase eletrolítica, resposta ao estresse e resistência aos antifúngicos. A calcineurina tem um papel importante na manutenção da integridade da parede celular e influencia na biossíntese do ergosterol, quitina e beta-glucana (137). Os inibidores da calcineurina influenciam na morfogênese e virulência dos fungos (126).

Estes inibidores estão associados com resultados satisfatórios em pacientes transplantados que desenvolveram criptococose (126). Dannaoui, Schwarz & Lortholary avaliaram a interação entre imunossupressores e antifúngicos *in vitro* frente a zigomicetos. Quando a anfotericina B foi combinada com ciclosporina A ou tacrolimus, registrou-se sinergismo para 90% e 30% dos isolados, respectivamente. Quando os antifúngicos azólicos foram testados, as interações sinérgicas foram mais facilmente observadas na combinação com ciclosporina do que na combinação com tacrolimus. O antagonismo não foi observado para estas interações (127).

Combinações sinérgicas também foram observadas frente a isolados de *C. neoformans* quando imunossupressores e agentes antifúngicos foram combinados. O estudo de Marchetti *et al.* mostrou que a combinação entre fluconazol e ciclosporina A resultou em potente sinergismo frente a espécies de *C. albicans* (128). Da mesma forma, Li *et al.* observou que a combinação dos azólicos fluconazol, itraconazol e voriconazol com ciclosporina A, observou-se um potente sinergismo para *C. albicans* azol-resistentes (129).

2.3.5 Combinações de inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRS) com antifúngicos

Nos seres humanos, os ISRS modificam o comportamento da 5-hidroxitriptamina agindo na proteína transportadora 5HT (SERT) bloqueando o processo de recaptção de 5HT (43). Como os SERTs são semelhantes aos outros transportadores de amina biogênica, é provável que a atividade antifúngica do fluconazol combinado com a fluoxetina resulte de uma interação da fluoxetina com os sistemas de transporte de fungos. O mecanismo pelo qual a fluoxetina atua sobre a biologia dos fungos continua a ser estudado (130).

A atividade antifúngica dos antidepressivos foi descoberta em 2001 quando três pacientes com candidíase vulvovaginal (CVV) crônica foram tratadas com sertralina para síndrome pré-menstrual (131). Durante a administração deste fármaco, não foi observado episódios de CVV, mas a recorrência retornou assim que o tratamento com os inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRS) foram interrompidos. Desde então, vários estudos tem se dedicado em explorar os efeitos dos ISRS. Lass-Flörl *et al.* mostrou que a sertralina exibe efeitos positivos frente a espécies de *Candida* (131). O estudo de Samanta *et al.* comprovou que altas doses de sertralina (>200 µg/ml) inibem o crescimento de leveduras como *C. albicans* e *C. tropicalis* (132). Young *et al.* mostrou que tanto as espécie de *Candida* como as espécies de *Aspergillus* eram susceptíveis as ações da sertralina (133). Outro estudo mostrou que sertralina possui atividades antifúngicas frente a *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. terreus* quando combinados com anfotericina B ou itraconazol e comparou com os resultados obtidos para *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Sertralina e fluoxetina foram os fármacos mais ativos, apesar das diferenças na suscetibilidade

dos fármacos testados. Sinergismo foi observado para as espécies de *Aspergillus*, porém antagonismo foi observado para as espécies de *C. parapsilosis* (134).

O estudo de Gu *et al* avaliou os efeitos sinérgicos da fluoxetina em combinação com azólicos frente a espécies de *C. albicans* tanto *in vivo* quanto *in vitro*. As combinações resultaram em atividade sinérgicas frente a isolados de *C. albicans* inclusive naqueles resistentes, porém este resultado não foi observado para as espécies de *Candida* não-*albicans* (130).

O estudo de Oliveira *et al.* teve por objetivo determinar o efeito antifúngico da fluoxetina quando combinada com fluconazol frente a 29 isolados de *Candida* oriundas de paciente com candidíase vulvovaginal. O efeito antifúngico da sertralina foi testado frente a 29 isolados de *Candida* que incluíam as seguintes espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. spaherica* and *C. parapsilosis*. Dependendo da concentração testada, os efeitos observados variaram de fungistático para fungicida. O efeito sinérgico foi observado para os cinco isolados resistentes ao fluconazol e o efeito aditivo foi observado para o restante dos isolados. Quando em combinação, a CIM do fluconazol em isolados resistentes decresceu de forma significativa (135).

2.3.6 Combinação de inibidores dos canais de cálcio com antifúngicos

O íon cálcio é um importante mensageiro intracelular, sendo fundamental nos mecanismos de excitação e contração da musculatura lisa do miocárdio e dos vasos. Os inibidores dos canais de cálcio impedem o fluxo de cálcio para dentro das células, incluindo células musculares cardíacas, células do sistema de condução do coração e da musculatura lisa do vaso, por bloqueio competitivo com o cálcio que entra pelos canais lentos voltagem-dependentes. Essa inibição reduz a excitabilidade do coração e a frequência cardíaca (136).

As propriedades antifúngicas destes fármacos provem da inibição da formação do tubo germinativo e da formação de biofilme (137). A calcineurina possui um papel significativo no crescimento da hifa, tolerância aos fármacos e virulência de algumas espécies de *Candida*, contribuindo para a formação de hifas e estabelecimento da infecção. Dessa maneira, os inibidores dos canais de cálcio acabam por influenciar na homeostasia do cálcio passando a ser bons candidatos a combinações farmacológicas no tratamento de infecções fúngicas (138). Os inibidores dos canais de cálcio, normalmente administrados a pacientes que fazem

tratamento de doenças cardíacas, mostraram atividades antifúngicas frente a *C. albicans* e *A. fumigatus* (145). Estudos que avaliaram isolados de *A. fumigatus* e *A. nidulans*, mutantes evidenciando deficiência de canais de cálcio, revelaram a perda da virulência e redução da formação de biofilme (139).

Liu *et al.* combinou quatro inibidores dos canais de cálcio, anlodipino, nifedipino, benidololol e flunarizina com fluconazol frente a isolados de *C. albicans*. O sinergismo foi observado quando fluconazol foi combinado com esses inibidores frente a isolados resistentes, mas indiferença foi constatada em isolados sensíveis (137). Gupta *et al.* revelou o potencial anti-*Candida* de fármacos anti-hipertensivos em um estudo com 10 isolados de *Candida*. Neste estudo, o anlodipino mostrou propriedades antifúngicas frente a células planctônicas e biofilme de *C. glabrata* e *C. albicans*, sendo mais efetivo frente a primeira espécie, *in vitro* (140).

2.3.7 Combinação de antiinflamatórios não esteroidais (AINES) com antifúngicos

A atividade antifúngica do ibuprofeno foi descrita pela primeira vez por Sanyal *et al.* em 1993 (141). Ibuprofeno é um fármaco anti-inflamatório não esteroidal indicado como antipirético, analgésico e anti-inflamatório que exibe atividade antimicrobiana frente a *C. albicans* e *C. não albicans* (142). Tem-se demonstrado que as células de mamíferos e fungos patogênicos como *Cryptococcus* e *Candida* possuem a capacidade de produzir prostaglandinas diretamente ou através do ácido araquidônico exógeno. Prostaglandinas são moléculas pequenas de lipídios com atividades diferenciadas no metabolismo humano, como a modulação da resposta imune. Dessa maneira, fármacos com propriedade de inibir a síntese das prostaglandina podem desenvolver um papel bioquímico importante no metabolismo fúngico (142,143).

Os resultados obtidos no estudo de Pina-Vaz *et al.* indicam que a morte da célula fúngica se deve ao dano direto causado na membrana citoplasmática. Na concentração de 5 mg/ml, o ibuprofeno inibe o crescimento, porém não promove a morte celular nem afeta a membrana citoplasmática. A combinação de ibuprofeno com fluconazol resultou em atividades sinérgicas em isolados de *Candidas*, incluindo 4 amostras fluconazol resistentes (142).

Oliveira *et al.* descreveram que a resistência antifúngica decorrente do aumento da atividade de efluxo pela expressão dos genes CDR1 e CDR2 em

Candida pode ser revertido pelo ibuprofeno. Em estudo *in vivo*, os camundongos que foram tratados com este fármaco mostraram a negativação da infecção, recuperação do peso corporal e conservação da arquitetura tecidual, exibindo raras células fúngicas nos rins e com predominância de células leveduriformes. Este ensaio *in vivo* confirmou que o ibuprofeno tem a propriedade de potencializar a atividade antifúngica do fluconazol e reduzir a virulência de *C. albicans* (139).

Rosato *et al.* relatou que as equinocandinas mostraram potente atividade frente a células planctônicas e biofilmes de *Candida* spp. Da mesma maneira, mostraram resultados sinérgicos quando associadas a antiinflamatórios não esteroidais frente a quatro isolados de *C. albicans*, dois isolados de *C. glabrata* e três isolados de *C. guilliermondii*. O sinergismo foi observado quando a anidulafungina foi combinada com aspirina, diclofenaco e ibuprofeno provando ser uma opção de tratamento frente a biofilmes formados pelas espécies de *Candida*. A diminuição do biofilme é melhor observado quando os fármacos são combinados do que quando administrados isoladamente. *C. albicans* e *C. glabrata* mostraram boa sensibilidade a combinação de anidulafungina e AINES enquanto um fraco sinergismo foi observado para a espécie *C. guilliermondii* (143).

Estes estudos demonstram a praticidade em usar ibuprofeno em combinação com azólicos no tratamento de candidoses e com um grande potencial de administração de modo tópico, aproveitando as propriedades antifúngicas e anti-inflamatória provenientes da combinação (142).

2.3.8 Combinação de anticoagulantes com antifúngicos

A varfarina é o anticoagulante mais prescrito no manejo da doença tromboembólica. Este fármaco faz parte da classe dos anticoagulantes cumarínicos e age inibindo a síntese de vitamina K ativa dependente de proteínas envolvidas na coagulação sanguínea, principalmente os fatores II, VII, IX, e X. Algumas interações com fármacos antimicrobianos já foram relatadas como: a diminuição da absorção de vitamina K, aumento da sensibilidade dos receptores hepáticos à varfarina, deslocamento da varfarina do sítio de ligação à albumina sérica e inibição ou potencialização do metabolismo da varfarina (144).

A combinação terapêutica de antifúngicos com varfarina é incomum, pois a interação entre estes fármacos é responsável pela elevação dos níveis de varfarina

e prolongação do tempo de coagulação. No estudo de Hong *et al.* um paciente com mucormicose rinocerebral utilizou varfarina no tratamento da trombose decorrente da infecção no seio cavernoso. A administração deste anticoagulante juntamente com fármacos antifúngicos teve como objetivo a prevenção da propagação de trombos e a melhora do fluxo sanguíneo (145). A hemorragia cerebral relacionada ao uso de anticoagulante não tem sido relatada quando este é administrado dentro dos limites terapêuticos (145).

3 JUSTIFICATIVA

O crescente número de pacientes imunocomprometidos devido aos avanços médicos tem desafiado o diagnóstico e o tratamento das infecções oportunistas emergentes. As infecções sistêmicas por fungos como *Rhodotorula* spp. são temidas devido ao insucesso da terapêutica antimicótica e as poucas opções terapêuticas disponíveis. Atualmente dispõe-se de limitado conhecimento sobre o impacto que combinações de antifúngicos com agentes não antifúngicos podem desempenhar na terapia de pacientes imunossuprimidos. Ao mesmo tempo, a literatura registra estudos onde associações de antifúngicos com fármacos de várias classes resultam em atividade sinérgica frente a fungos como *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*, incluindo isolados resistentes a azólicos ou anfotericina B. Estudos com *Rhodotorula* spp. são inexistentes e, por isto, requerem urgente atenção.

4 OBJETIVO

4.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo objetiva avaliar a suscetibilidade de *R. mucilaginosa* aos antifúngicos convencionais, verificar a habilidade destes isolados em modificar seu perfil de suscetibilidade após exposição a crescentes concentrações de anfotericina B e comparar a atividade antifúngica de anfotericina B/voriconazol em combinação com fármacos diversos frente a estes dois grupos de *R. mucilaginosa*.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1. Avaliar a suscetibilidade (CIM – Concentração Inibitória Mínima) de *R. mucilaginosa* a anfotericina B, fluconazol, voriconazol e caspofungina.

4.2.2. Avaliar a suscetibilidade (CIM – Concentração Inibitória Mínima) de *R. mucilaginosa* frente a combinações de antifúngicos com ciprofloxacino/levofloxacino, sinvastatina, ciclosporina A, anlodipino, fluoxetina, ibuprofeno e varfarina.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Almeida GMD, Costa SF, Melhem M, Motta AL, Szeszs MW, Miyashita F, *et al.* *Rhodotorula* spp. isolated from blood cultures: clinical and microbiological aspects. *Med Mycol.* 2008;46(6):547–56.
2. Vishniac HS, Takashima M. *Rhodotorula arctica* sp. nov., a basidiomycetous yeast from Arctic soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60(5):1215–8.
3. Kim HA, Hyun M, Ryu SY. Catheter-associated *Rhodotorula mucilaginosa* fungemia in an immunocompetent host. *Infect Chemother.* 2013;45(3):339–42.
4. Louria DB, Greenberg SM, Molander DW. Fungemia caused by certain nonpathogenic strains of the Family *Cryptococcaceae*. *N Engl J Med.* 1960 Dec 22;263(25):1281–4.
5. Kiehn TE, Gorey E, Brown AE, Edwards FF, Armstrong D. sepsis due to *Rhodotorula* related to use of indwelling central venous catheters. *Clin Infect Dis.* 1992;14(4):841–6.
6. Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. Vol. 11, *The Lancet Infectious Diseases.* 2011. p. 142–51.
7. Tuon FF, Costa SF. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25:135–40.
8. Diktas H, Gulec B, Baylan O, Oncul O, Turhan V, Acar A, *et al.* Intraabdominal abscess related fungaemia caused by *Rhodotorula glutinis* in a non-neutropenic cancer patient. *Acta Clin Belg.* 2013;68(1):62–4.
9. Alothman A. *Rhodotorula* species peritonitis in a liver transplant recipient: a case report. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2006;17(1):47–9.
10. Capoor M, Aggarwal S, Raghvan C, Gupta D, Jain A, Chaudhary R. Clinical and microbiological characteristics of *Rhodotorula mucilaginosa* infections in a tertiary-Care facility. *Indian J Med Microbiol.* 2014;32(3):304.
11. Baradkar VP, Kumar S. Meningitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in human immunodeficiency virus seropositive patient. *Ann Indian Acad Neurol.* 2008;11(4):245–7.
12. Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O, *et al.* ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Apr 1;20:76–98.
13. Thomson P, López-Fernández L, Guarro J, Capilla J, Miller JL, Perfect JR, *et*

- al.* Virulence and antifungal therapy of murine disseminated infection by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017 Jun 16;41(0):5233–5.
14. Zaas AK, Boyce M, Schell W, Lodge BA, Miller JL, Perfect JR. Risk of fungemia due to *Rhodotorula* and antifungal susceptibility testing of *Rhodotorula* isolates. *J Clin Microbiol*. 2003;41(11):5233–5.
 15. Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Susceptibility profile of 29 clinical isolates of *Rhodotorula* spp. and literature review. Vol. 55, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005. p. 312–6.
 16. Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: Concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. Vol. 42, *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. p. 4419–31.
 17. Tournas VH, Heeres J, Burgess L. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiol*. 2006;23(7):684–8.
 18. Strausbaugh LJ, Sewell DL, Tjoelker RC, Heitzman T, Webster T, Ward TT, *et al.* Comparison of three methods for recovery of yeasts from hands of health-care workers. *J Clin Microbiol*. 1996;34(2):471–3.
 19. Wirth F, Goldani LZ. Epidemiology of *Rhodotorula*: An emerging pathogen. Vol. 2012, *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2012.
 20. Ahmed A, Aggarwal M, Chiu R, Ramratnam B, Rinaldi M, Flanigan TP. A fatal case of *Rhodotorula* meningitis in AIDS. *Med Health R I*. 1998 Jan;81(1):22–3.
 21. Tsiodras S, Papageorgiou S, Meletiadis J, Tofas P, Pappa V, Panayiotides J, *et al.* *Rhodotorula mucilaginosa* associated meningitis: A subacute entity with high mortality. Case report and review. *Med Mycol Case Rep*. 2014;6:46–50.
 22. Chitasombat MN, Kofteridis DP, Jiang Y, Tarrand J, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Rare opportunistic (non-*Candida*, non-*Cryptococcus*) yeast bloodstream infections in patients with cancer. *J Infect*. 2012;64(1):68–75.
 23. Tuon FF, de Almeida GMD, Costa SF. Central venous catheter-associated fungemia due to *Rhodotorula* spp. --a systematic review. *Med Mycol*. 2007;45(August):441–7.
 24. Lunardi LW, Aquino VR, Zimmerman RA, Goldani LZ. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. *Clin Infect Dis*. 2006 Sep 15;43(6):e60–3.
 25. Duggal S, Jain H, Tyagi A, Sharma A, Chugh TD. *Rhodotorula* fungemia: two

- cases and a brief review. *Med Mycol.* 2011;1–4.
26. Spiliopoulou A, Anastassiou ED, Christofidou M. *Rhodotorula* fungemia of an intensive care unit patient and review of published cases. *Mycopathologia.* 2012;174(4):301–9.
 27. Perniola R, Faneschi ML, Manso E, Pizzolante M, Rizzo A, Sticchi Damiani A, *et al.* *Rhodotorula mucilaginosa* outbreak in neonatal intensive care unit: Microbiological features, clinical presentation, and analysis of related variables. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006;25(3):193–6.
 28. Fadzilah Mohd N, Tan L, Na S, Ng K. Meningitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in HIV-infected patient: a case report and review of the literature. *Mycopathologia.* 2015;180:95–8.
 29. Lanzafame M, De Checchi G, Parinello A, Trevenzoli M, Cattelan AM. *Rhodotorula glutinis*-related meningitis. *J Clin Microbiol.* 2001 Jan 1;39(1):410.
 30. Donald FE, Sharp JF, Firth JL, Crowley JL, Ispahani P. *Rhodotorula rubra* ventriculitis. *J Infect.* 1988 Mar;16(2):187–91.
 31. Lo Re V, Fishman NO, Nachamkin I. Recurrent catheter-related *Rhodotorula rubra* infection. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9(8):897–900.
 32. Thakur K, Singh G, Agarwal S, Rani L. Meningitis caused by *Rhodotorula rubra* in an human immunodeficiency virus infected patient. *Indian J Med Microbiol.* 2007;25:166–8.
 33. Rajmane VS, Rajmane ST, Ghatole MP. *Rhodotorula* species infection in traumatic keratitis - a case report. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;71(4):428–9.
 34. Unal A, Koc AN, Sipahioglu MH, Kavuncuoglu F, Tokgoz B, Buldu HM, *et al.* CAPD-related peritonitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Perit Dial Int.* 2009 Sep 1;29(5):581–2.
 35. Dorey MW, Brownstein S, Kertes PJ, Gilberg SM, Toye B. *Rhodotorula glutinis* endophthalmitis. *Can J Ophthalmol.* 2002 Dec;37(7):416–8.
 36. Lifshitz T, Levy J. *Rhodotorula rubra* keratitis and melting after repeated penetrating keratoplasty. *Eur J Ophthalmol.* 2005;15(1):135–7.
 37. Merkur AB, Hodge WG. *Rhodotorula rubra* endophthalmitis in an HIV positive patient. *Br J Ophthalmol.* 2002 Dec;86(12):1444–5.
 38. Nannini EC, Paphitou NI, Ostrosky-Zeichner L. Peritonitis due to *Aspergillus* and zygomycetes in patients undergoing peritoneal dialysis: Report of 2 cases

- and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;46(1):49–54.
39. Eisenberg ES, Alpert BE, Weiss RA, Mittman N, Soeiro R. *Rhodotorula rubra* peritonitis in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Med*. 1983 Aug;75(2):349–52.
 40. Savini V, Sozio F, Catavitello C, Talia M, Manna A, Febbo F, *et al*. Femoral prosthesis infection by *Rhodotorula mucilaginosa*. *J Clin Microbiol*. 2008;46(10):3544–5.
 41. Cutrona AF, Shah M, Himes MS, Miladore MA. *Rhodotorula minuta*: an unusual fungal infection in hip-joint prosthesis. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. 2002;31(3):137–40.
 42. Gogate AA. Hydrosalpinx due to *Rhodotorula glutinis* (a case report). *J Postgrad Med*. 1987;33(1):34.
 43. Fung HB, Martyn CA, Shahidi A, Brown ST. *Rhodotorula mucilaginosa* lymphadenitis in an HIV-infected patient. *Int J Infect Dis*. 2009;13(1).
 44. Coppola R, Zanframundo S, Rinati MV, Carbotti M, Graziano A, Galati G, *et al*. *Rhodotorula mucilaginosa* skin infection in a patient treated with sorafenib. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2015 May;29(5):1028–9.
 45. Means AD, Sisto K, Lichon V, Monaghan D, O’Keefe P, Tung R. Cutaneous *Rhodotorula* treated with photodynamic therapy. *Dermatol Surg*. 2012 Jul;38(7 Pt 1):1100–3.
 46. Jaeger T, Andres C, Ring J, Anliker MD. *Rhodotorula mucilaginosa* infection in Li-Fraumeni-like syndrome: a new pathogen in folliculitis. *Br J Dermatol*. 2011 May;164(5):1120–2.
 47. Altun HU, Meral T, Aribas ET, Gorpelioglu C, Karabicak N. A Case of Onychomycosis Caused by *Rhodotorula glutinis*. *Case Rep Dermatol Med*. 2014;2014:563261.
 48. Da Cunha MML, Dos Santos LPB, Dornelas-Ribeiro M, Vermelho AB, Rozental S. Identification, antifungal susceptibility and scanning electron microscopy of a keratinolytic strain of *Rhodotorula mucilaginosa*: A primary causative agent of onychomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009;55(3):396–403.
 49. Deepa A, Nair BJ, Sivakumar T, Joseph AP. Uncommon opportunistic fungal infections of oral cavity: A review. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2014 May;18(2):235–43.
 50. Kaur R, Wadhwa A, Agarwal SK. *Rhodotorula mucilaginosa*: an unusual cause

- of oral ulcers in AIDS patients. *AIDS*. 2007 May 11;21(8):1068–9.
51. Harrison FC. Cheese *Torulae*. *Trans R Soc Canada*. 1927;21(2):341–80.
 52. Vartivarian SE, Anaissie EJ, Bodey GP. Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis, and management. *Clin Infect Dis*. 1993;17 Suppl 2:S487–91.
 53. Krzyściak P, Macura a. BAB. Drug susceptibility of 64 strains of *Rhodotorula* sp. *Wiad Parazytol*. 2010;56(2):167–70.
 54. Martinez R. Atualização no uso de agentes antifúngicos: An update on the use of antifungal agents. *J Bras Pneumol*. 2006;32(5):449–60.
 55. Vartivarian SE, Anaissie EJ, Bodey GP. Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis, and management. *Clin Infect Dis*. 1993;17 Suppl 2:S487–91.
 56. Fernández-Ruiz M, Guinea J, Puig-Asensio M, Zaragoza Ó, Almirante B, Cuenca-Estrella M, *et al*. Fungemia due to rare opportunistic yeasts: data from a population-based surveillance in Spain. *Med Mycol*. 2017 Feb 1;55(2):125–36.
 57. Gallis H a, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis*. 1990;12(2):308–29.
 58. Lin HS, Medoff G, Kobayashi GS. Effects of amphotericin B on macrophages and their precursor cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 1977;11(1):154–60.
 59. Mozaffarian N, Berman JW, Casadevall A. Enhancement of nitric oxide synthesis by macrophages represents an additional mechanism of action for amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(8):1825–9.
 60. Rogers PD, Jenkins JK, Chapman SW, Ndebele K, Chapman BA, Cleary JD. Amphotericin B activation of human genes encoding for cytokines. *J Infect Dis*. 1998;178(6):1726–33.
 61. Nair MP, Schwartz SA. Immunomodulatory effects of amphotericin-B on cellular cytotoxicity of normal human lymphocytes. *Cell Immunol*. 1982 Jul 1;70(2):287–300.
 62. Marmer DJ, Fields BT, France GL, Steele RW. Ketoconazole, amphotericin B, and amphotericin B methyl ester: Comparative *in vitro* and *in vivo* toxicological effects on neutrophil function. *Antimicrob Agents Chemother*. 1981;20(5):660–5.
 63. McClenny NB, Fei H, Baron EJ, Gales AC, Houston A, Hollis RJ, *et al*. Change

- in colony morphology of *Candida lusitanae* in association with development of amphotericin B resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(5):1325–8.
64. Steinbach WJ, Perfect JR, Schell WA, Walsh TJ, Benjamin DK. In Vitro Analyses, Animal Models, and 60 Clinical Cases of Invasive *Aspergillus terreus* Infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Sep 1;48(9):3217–25.
65. Cleary JD, Chapman SW, Nolan RL. Pharmacologic modulation of interleukin-1 expression by amphotericin B-stimulated human mononuclear cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36(5):977–81.
66. Atkinson BJ, Lewis RE, Kontoyiannis DP. *Candida lusitanae* fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. *Med Mycol*. 2008;46(6):541–6.
67. Da Matta DA, de Almeida LP, Machado AM, Azevedo AC, Kusano EJU, Travassos NF, *et al*. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;57(4):399–404.
68. Juvvadi PR, Lee SC, Heitman J, Steinbach WJ. Calcineurin in fungal virulence and drug resistance: Prospects for harnessing targeted inhibition of calcineurin for an antifungal therapeutic approach. *Virulence*. 2017 Feb 17;8(2):186–97.
69. Kanafani ZA, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis*. 2008;46(1):120–8.
70. Blatzer M, Blum G, Jukic E, Posch W, Gruber P, Nagl M, *et al*. Blocking Hsp70 enhances the efficiency of amphotericin B treatment against resistant *Aspergillus terreus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(7):3778–88.
71. Rogers PD, Pearson MM, Cleary JD, Sullivan DC, Chapman SW. Differential expression of genes encoding immunomodulatory proteins in response to amphotericin B in human mononuclear cells identified by cDNA microarray analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50(6):811–7.
72. Cleary JD, Hayman J, Sherwood J, Lasala GP, Piazza-Hepp T, Suarez EC, *et al*. Amphotericin B overdose in pediatric patients with associated cardiac arrest. *Ann Pharmacother*. 1993;27(6):715–9.
73. Fanos V, Cataldi L. Amphotericin B-induced nephrotoxicity: a review. *J Chemother*. 2000;12(6):463–70.
74. Lin AC, Goldwasser E, Bernard EM, Chapman SW. Amphotericin B blunts

- erythropoietin response to anemia. *J Infect Dis.* 1990;161(2):348–51.
75. Wood A. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N Engl J Med.* 1994;330(4):263–72.
 76. Taboada J, Grooters AM. Systemic antifungal therapy. In: *Small Animal Clinical Pharmacology.* 2008. p. 186–97.
 77. Pearson MM, Rogers PD, Cleary JD, Chapman SW, Da Camara C, Perreault MM. Voriconazole: A new triazole antifungal agent. *Ann Pharmacother.* 2003;37(3):420–32.
 78. Jeu L, Piacenti FJ, Lyakhovetskiy AG, Fung HB. Voriconazole. Vol. 25, *Clinical Therapeutics.* 2003. p. 1321–81.
 79. Heimark L, Shipkova P, Greene J, Munayyer H, Yarosh-Tomaine T, DiDomenico B, *et al.* Mechanism of azole antifungal activity as determined by liquid chromatographic/mass spectrometric monitoring of ergosterol biosynthesis. *J Mass Spectrom.* 2002;37(3):265–9.
 80. Castanheira M, Messer SA, Jones RN, Farrell DJ, Pfaller MA. Activity of echinocandins and triazoles against a contemporary (2012) worldwide collection of yeast and moulds collected from invasive infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44(4):320–6.
 81. Sabatelli F, Patel R, Mann PA, Mendrick CA, Norris CC, Hare R, *et al.* *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(6):2009–15.
 82. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. Vol. 36, *FEMS Microbiology Reviews.* 2012. p. 288–305.
 83. Mishra N, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta D, *et al.* Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2007;54(3):201–35.
 84. Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, Falconer D, Bille J. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(8):2404–12.
 85. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, *et al.* Cross-resistance between fluconazole and ravuconazole and the use of fluconazole

- as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to ravuconazole among 12,796 clinical isolates of *Candida* spp. J Clin Microbiol. 2004;42(7):3137–41.
86. Chen J, Li H, Li R, Bu D, Wan Z. Mutations in the *cyp51A* gene and susceptibility to itraconazole in *Aspergillus fumigatus* serially isolated from a patient with lung aspergilloma. J Antimicrob Chemother. 2005;55(1):31–7.
 87. Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Pfaller MA. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. J Clin Microbiol. 2003;41(8):3623–6.
 88. Johnson LB, Kauffman CA, Kauffman CA. Voriconazole: A New Triazole Antifungal Agent. Clin Infect Dis. 2003 Mar 1;36(5):630–7.
 89. Bodey GP. Azole antifungal agents. Clin Infect Dis. 1992;14 Suppl 1:S161-9.
 90. Scherpbier HJ, Hilhorst MI, Kuijpers TW. Liver failure in a child receiving highly active antiretroviral therapy and voriconazole. ClinInfectDis. 2003;37(6):828–30.
 91. Galgiani JN, Catanzaro A, Cloud GA, Johnson RH, Williams PL, Mirels LF, et al. Comparison of oral fluconazole and itraconazole for progressive, nonmeningeal coccidioidomycosis: A randomized, double-blind trial. Ann Intern Med. 2000;133(9):676–86.
 92. Hoffman HL, Rathbun RC. Review of the safety and efficacy of voriconazole. ExpertOpinInvestigDrugs. 2002;11(3):409–29.
 93. Lopez-Rangel E, Van Allen MI. Prenatal exposure to fluconazole: An identifiable dysmorphic phenotype. Birth Defects Res Part A - Clin Mol Teratol. 2005;73(11):919–23.
 94. Tawara S, Ikeda F, Maki K, Morishita Y, Otomo K, Teratani N, et al. In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(1):57–62.
 95. Tawara S, Ikeda F, Maki K, Morishita Y, Otomo K, Teratani N, et al. In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(1):57–62.
 96. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, et al. In vitro susceptibility of clinical isolates of *Aspergillus* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: A head-to-head comparison using the CLSI M38-

- A2 broth microdilution method. *J Clin Microbiol.* 2009;47(10):3323–5.
97. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, *et al.* In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: Six years of global surveillance. *J Clin Microbiol.* 2008;46(1):150–6.
 98. Hernandez S, López-Ribot JL, Najvar LK, McCarthy DI, Bocanegra R, Graybill JR. Caspofungin Resistance in *Candida albicans*: Correlating Clinical Outcome with Laboratory Susceptibility Testing of Three Isogenic Isolates Serially Obtained from a Patient with Progressive Candida Esophagitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(4):1382–3.
 99. Eschertzhuber S, Velik-Salchner C, Hoermann C, Hoefler D, Lass-Flörl C. Caspofungin-resistant *Aspergillus flavus* after heart transplantation and mechanical circulatory support: a case report. *Transpl Infect Dis.* 2008;10(3):190–2.
 100. Kohno S, Izumikawa K, Yoshida M, Takesue Y, Oka S, Kamei K, *et al.* A double-blind comparative study of the safety and efficacy of caspofungin versus micafungin in the treatment of candidiasis and aspergillosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32(3):387–97.
 101. Villanueva A, Gotuzzo E, Arathoon EG, Noriega LM, Kartsonis NA, Lupinacci RJ, *et al.* A randomized double-blind study of caspofungin versus fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis. *Am J Med.* 2002;113(4):294–9.
 102. Hope WW, Shoham S, Walsh TJ. The pharmacology and clinical use of caspofungin. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2007;3(2):263–74.
 103. León-Gil C, Ubeda-Iglesias A, Loza-Vázquez A, de la Torre MV, Raurich-Puigdevall JM, Alvarez-Sánchez B, *et al.* Efficacy and safety of caspofungin in critically ill patients. ProCAS Study. *Rev Esp Quimioter.* 2012;25(4):274–82.
 104. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Mar;48(3):693–715.
 105. Li H, Lu Q, Wan Z, Zhang J. In vitro combined activity of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(6):550–2.
 106. Barchiesi F, Schimizzi AM, Caselli F, Novelli A, Fallani S, Giannini D, *et al.* Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus*

- neoformans*. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(9):2435–41.
107. Siopi M, Siafakas N, Vourli S, Zerva L, Meletiadis J. Optimization of polyene-azole combination therapy against aspergillosis using an *in vitro* pharmacokinetic-pharmacodynamic model. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(7):3973–83.
 108. Chandrasekar PH, Cutright JL, Manavathu EK. Efficacy of voriconazole plus amphotericin B or micafungin in a guinea-pig model of invasive pulmonary aspergillosis. Clin Microbiol Infect. 2004;10(10):925–8.
 109. Louie A, Banerjee P, Drusano GL, Shayegani M, Miller MH. Interaction between fluconazole and amphotericin B in mice with systemic infection due to fluconazole-susceptible or -resistant strains of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(12):2841–7.
 110. Ferrero L, Cameron B, Manse B, Lagneaux D, Crouzet J, Famechon A, *et al.* Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: A primary target of fluoroquinolones. Mol Microbiol. 1994;13(4):641–53.
 111. Stergiopoulou T, Meletiadis J, Sein T, Papaioannidou P, Tsiouris I, Roilides E, *et al.* Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. J Antimicrob Chemother. 2009;63(2):343–8.
 112. Nakajima R, Kitamura A, Someya K, Tanaka M, Sato K. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of DU-6859a, a fluoroquinolone, in combination with amphotericin B and fluconazole against pathogenic fungi. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39(7):1517–21.
 113. Shen LL, Baranowski J, Fostel J, Montgomery DA, Lartey PA. DNA topoisomerases from pathogenic fungi: targets for the discovery of antifungal drugs. Antimicrob Agents Chemother. 1992 Dec;36(12):2778–84.
 114. Sugar AM, Liu XP, Chen RJ. Effectiveness of quinolone antibiotics in modulating the effects of antifungal drugs. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(11):2518–21.
 115. Vitale RG, Afeltra J, De Hoog GS, Rijs AJ, Verweij PE. *In vitro* activity of amphotericin B and itraconazole in combination with flucytosine, sulfadiazine and quinolones against *Exophiala spinifera*. J Antimicrob Chemother. 2003;51:1297–300.

116. Sugar AM, Liu XP. Combination antifungal therapy in treatment of murine pulmonary mucormycosis: Roles of quinolones and azoles. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(7):2004–6.
117. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic Effects of Statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2009;45(8):89–118.
118. Roze L V, Linz JE. Lovastatin triggers an apoptosis-like cell death process in the fungus *Mucor racemosus*. *Fungal Genet Biol.* 1998;25(2):119–33.
119. Macreadie IG, Johnson G, Schlosser T, Macreadie PI. Growth inhibition of *Candida* species and *Aspergillus fumigatus* by statins. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;262(1):9–13.
120. Sun H-Y, Singh N. Antimicrobial and immunomodulatory attributes of statins: relevance in solid-organ transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2009;48(6):745–55.
121. Chin NX, Weitzman I. In vitro activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent, and synergy with fluconazole and itraconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(4):850–2.
122. Nyilasi I, Kocsubé S, Krizsán K, Galgóczy L, Papp T, Pesti M, *et al.* Susceptibility of clinically important dermatophytes against statins and different statin-antifungal combinations. *Med Mycol.* 2013;1–9.
123. Nyilasi I, Kocsubé S, Pesti M, Lukács G, Papp T, Vágvolgyi C. In vitro interactions between primycin and different statins in their effects against some clinically important fungi. *J Med Microbiol.* 2010;59(2):200–5.
124. Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Lovastatin has significant activity against zygomycetes and interacts synergistically with voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(1):96–103.
125. Tedesco D, Haragsim L. Cyclosporine: A Review. *J Transplant.* 2012;2012:1–7.
126. Cruz MC, Goldstein AL. Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. *EMBO J.* 2002;21(4):546–59.
127. Dannaoui E, Schwarz P, Lortholary O. *In vitro* interactions between antifungals and immunosuppressive drugs against zygomycetes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(8):3549–51.
128. Marchetti O, Moreillon P, Glauser MP, Bille J, Sanglard D. Potent synergism of

- the combination of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(9):2373–81.
129. Li Y, Sun S, Guo Q, Ma L, Shi C, Su L, *et al*. *In vitro* interaction between azoles and cyclosporin A against clinical isolates of *Candida albicans* determined by the checkerboard method and time-kill curves. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(3):577–85.
 130. Gu W, Guo D, Zhang L, Xu D, Sun S. The synergistic effect of azoles and fluoxetine against resistant *Candida albicans* strains is attributed to attenuating fungal virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(10):6179–88.
 131. Lass-Flörl C, Dierich MP, Fuchs D, Semenitz E, Ledochowski M. Antifungal activity against *Candida* species of the selective serotonin-reuptake inhibitor, sertraline. *Clin Infect Dis*. 2001;33(12):E135-6.
 132. Samanta A, Chattopadhyay D, Sinha C, Dulal Jana A, Ghosh S, Mandal Ananya Banerjee A, *et al*. Evaluation of *in vivo* and *in vitro* antimicrobial activities of a selective serotonin reuptake inhibitor sertraline hydrochloride. *Anti-Infective Agents*. 2012;10:0–0.
 133. Young TJ, Oliver GP, Pryde D, Perros M, Parkinson T. Antifungal activity of selective serotonin reuptake inhibitors attributed to non-specific cytotoxicity. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Apr 1;51(4):1045–7.
 134. Heller I, Leitner S, Dierich MP, Lass-Flörl C. Serotonin (5-HT) enhances the activity of amphotericin B against *Aspergillus fumigatus in vitro*. *Int J Antimicrob Agents*. 2004;24(4):401–4.
 135. Oliveira AS, Gaspar CA, Palmeira-de-Oliveira R, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira A. Anti-*Candida* activity of fluoxetine alone and combined with fluconazole: A synergistic action against fluconazole-resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(7):4224–6.
 136. Liu S, Yue L, Gu W, Li X, Zhang L, Sun S. Synergistic effect of fluconazole and calcium channel blockers against resistant *Candida albicans*. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150859.
 137. Liu S, Hou Y, Liu W, Lu C, Wang W, Sun S. Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. *Eukaryot Cell*. 2015;14(4):324–34.
 138. Patenaude C, Zhang Y, Cormack B, Köhler J, Rao R. Essential role for vacuolar acidification in *Candida albicans* virulence. *J Biol Chem*.

- 2013;288(36):26256–64.
139. Costa-de-Oliveira S, Miranda IM, Silva-Dias A, Silva AP, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. Ibuprofen potentiates the *in vivo* antifungal activity of fluconazole against *Candida albicans* murine infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(7):4289–92.
 140. Gupta P, Chanda R, Rai N, Kataria VK, Kumar N. Antihypertensive, Amlodipine Besilate Inhibits Growth and Biofilm of Human Fungal Pathogen *Candida*. *Assay Drug Dev Technol.* 2016 Jul;14(5):291–7.
 141. Elvers KT, Wright SJ. Antibacterial activity of the anti-inflammatory compound ibuprofen. *Lett Appl Microbiol.* 1995;20(2):82–4.
 142. Pina-Vaz C, Sansonetty F, Rodrigues AG, Martinez-De-Oliveira J, Fonseca AF, Mårdh PA. Antifungal activity of ibuprofen alone and in combination with fluconazole against *Candida* species. *J Med Microbiol.* 2000 Sep 1;49(9):831–40.
 143. Rosato A, Catalano A, Carocci A, Carrieri A, Carone A, Caggiano G, *et al.* In vitro interactions between anidulafungin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms of *Candida* spp. *Bioorganic Med Chem.* 2016;24(5):1002–5.
 144. Yamamoto H, Habu Y, Yano I, Ozaki J, Kimura Y, Sato E, *et al.* Comparison of the effects of azole antifungal agents on the anticoagulant activity of warfarin. *Biol Pharm Bull.* 2014;37(12):1990–3.
 145. Hong RH, Koch RJ. Possible role of anticoagulation in the treatment of rhinocerebral mucormycosis. *Otolaryngol -- Head Neck Surg.* 2000 Apr 1;122(4):577–8.

6 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Atividade *in vitro* de anfotericina B combinada com agentes não antifúngicos frente a isolados de *Rhodotorula mucilaginosa*

***In vitro* interactions of amphotericin B combined with non-antifungal agents against *Rhodotorula mucilaginosa* strains**

Tatiana Borba Spader¹, Mauricio Ramírez-Castrillón², Patricia Valente², Sydney Hartz Alves³, Luiz Carlos Severo¹

¹Laboratório de Patologia e Micologia, Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, RS.

² Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

³Laboratório de Pesquisas Micológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

Autor para correspondência: Tatiana Borba Spader. R. Sarmiento Leite, 187, 1º andar - Centro Histórico, Porto Alegre - RS, 90050-170.

Email: tatispader@gmail.com

RESUMO

As espécies de *Rhodotorula* emergiram como agentes patogênicos oportunistas, capazes de causar fungemia associada ao uso de cateter em pacientes imunocomprometidos. *R. mucilaginosa* é a espécie mais comumente envolvida em infecções humanas. A correta identificação e susceptibilidade dos isolados de *Rhodotorula* isolados de hemoculturas ou do sistema nervoso central (SNC) são essenciais para determinar a melhor conduta terapêutica dessa infecção incomum. A seqüência espaçadora transcrita interna foi usada para identificar 35 isolados de *R. mucilaginosa*. O teste de susceptibilidade *in vitro* de anfotericina B (AMB), voriconazol, caspofungina e fluconazol foi realizado de acordo com o documento M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Os testes de susceptibilidade antifúngica mostraram que *Rhodotorula* é suscetível a baixas concentrações de AMB, mas possui menor suscetibilidade ao voriconazol. A resistência primária foi observada para o fluconazol e caspofungina. A exposição dos isolados a crescentes concentrações de AMB *in vitro* alterou o perfil de susceptibilidade destes isolados que foram classificadas em Rm AMB-R. As combinações de AMB com ciprofloxacina, levofloxacina, amlodipina, ciclosporina A, ibuprofeno, fluoxetina, simvastatina e varfarina foram avaliadas frente a 35 isolados clínicos sensíveis e resistentes de *Rhodotorula* de acordo com a técnica de microdiluição em caldo “checkerboard”. As combinações com maior número de interações sinérgicas foram: AMB + sinvastatina (Rm AMB-R), seguido de AMB + ibuprofeno (Rm AMB-S), AMB + anlodipino (Rm AMB-R) e AMB + varfarina (Rm AMB-R). A combinação AMB + ciclosporina A mostrou sinergismo e antagonismo tanto para os isolados sensíveis quanto para os resistentes. A AMB combinada com uma fluoroquinolona (AMB + levofloxacina) também mostrou antagonismo para os isolados Rm AMB-S, mas observou-se um número extraordinário de interações sinérgicas para o Rm AMB - R resistente. A combinação de fármacos pode oferecer uma estratégia diferente na terapêutica de infecções causadas por *R. mucilaginosa* resistente a AMB.

Palavras-chave: combinação de fármacos; teste de suscetibilidade; anfotericina B; agentes não-antifúngicos; *R. mucilaginosa*

ABSTRACT

Rhodotorula species are emerging as opportunistic pathogens, causing catheter-associated fungemia in patients with compromised immunity. *R. mucilaginosa* is considered the most common species involved in human infections. Correct identification and susceptibility testing of *Rhodotorula* isolates recovered from the blood stream or central nervous system (CNS) are essential to determine the best management of this unusual infection. Here the internal transcribed spacer sequence was used to identify 35 *R. mucilaginosa* isolates. *In vitro* susceptibility testing of amphotericin B (AMB), voriconazole, caspofungin, and fluconazole was performed according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document M27-A3. The antifungal susceptibility tests showed that *Rhodotorula* was susceptible to low concentrations of AMB but was less susceptible to voriconazole. Natural resistance was registered to fluconazole and caspofungin. We showed that *in vitro* exposure to increasing concentrations of AMB changed the susceptibility profile to these strains, which were named the AMB-R group. Combinations of AMB plus ciprofloxacin, levofloxacin, amlodipine, cyclosporine A, ibuprofen, fluoxetine, simvastatin, and warfarin were evaluated against 35 susceptible and resistant clinical *Rhodotorula* isolates using the broth microdilution checkerboard technique. The main interactions were AMB + simvastatin (*Rm* AMB-R), followed by AMB + ibuprofen (*Rm* AMB-S), AMB + amlodipine (*Rm* AMB-R), and AMB + warfarin (*Rm* AMB-R) as the most synergistic interactions. Synergism and antagonism was observed in both groups for the combination AMB + cyclosporine A. AMB combined with a fluoroquinolone (AMB + levofloxacin) also demonstrated antagonism for the AMB-S strains, but an extraordinary number of synergistic interactions was observed for the *Rm* AMB-R resistant group. A combination drug approach can provide a different strategy to treat infections caused by AMB-resistant *R. mucilaginosa*.

Keywords: antifungal combination; susceptibility test; amphotericin B; non-antifungals agents; *R. mucilaginosa*

INTRODUCTION

Rhodotorula mucilaginosa and *R. glutinis* are the most frequently isolated species from the *Rhodotorula* genus related to opportunistic mycoses. A high frequency in the environment can result in infections, such as fungemia, endocarditis, peritonitis, and endophthalmitis (1, 2). These species have a tendency to infect the central nervous system (CNS), including cases of meningitis and ventriculitis. Localized infections, such as the skin, prosthetic joint and peritoneal infections, are not necessarily related to immunosuppression (3, 4).

Antifungal susceptibility profiles suggest that the genus *Rhodotorula* is not a target of echinocandins, as it is resistant to caspofungin (CAS). Azoles also show poor activity and the isolates often show resistance to fluconazole (FLC). Voriconazole (VRC) may have reduced activity against *Rhodotorula* species compared with other clinically relevant yeasts. Amphotericin B (AMB) is the most active antifungal *in vitro*, although clinical failures have been reported (4, 5). *In vitro* resistance to AMB is considered rare. Nevertheless, the *in vivo* response is occasionally poor resulting in an unfavorable outcome. High mortality rates caused by *R. mucilaginosa* infections are associated with subacute or chronic meningitis. Despite AMB therapy, an overall mortality of 46.2% is associated with CNS infections among patients with hematological malignancies or HIV (6, 7). Bloodstream infections caused by *Rhodotorula* are mostly observed when a central venous catheter is present and represent 2.3% of fungal isolates from the blood. The mortality rate due to *Rhodotorula* fungemia is estimated to be about 15%, even when AMB is administered (8). This scenario points to three main questions: are the AMB failures related to resistance? How should an infection from AMB-resistant *Rhodotorula* sp. be treated? Which combinations of drugs show antifungal activity to resistant strains? The objectives of this study were to evaluate the susceptibility profile of *R. mucilaginosa*, verify the ability of this species to change its susceptibility profile after exposure to high concentrations of AMB, and compare the antifungal activity of AMB plus combinations of non-antifungal medications against the two groups of *R. mucilaginosa*.

MATERIALS AND METHODS

a) Strains and molecular identification:

Thirty-five strains of *Rhodotorula* isolated from patients at the Santa Casa de Misericórdia Hospital (Porto Alegre, RS, Brazil) and maintained in the Mycology Laboratory were studied.

The isolates were identified based on microbiological and molecular methods. The isolates were grown aerobically in Sabouraud broth at 30°C until growth attained the mid-log phase. Total genomic DNA was extracted and purified from 100 mL cultures using the UltraClean® Soil DNA Isolation Kit (Mobio Laboratories, Carlsbad, CA, USA). Sequencing of the internal transcribed sequence (ITS) 1-5.8S rDNA-ITS2 region was performed using the universal primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (white). The polymerase chain reaction (PCR) product was purified by the UltraClean® PCR Clean-Up Kit (Mobio Laboratories), and sequenced at the Ludwig Biotechnologia facility in Alvorada, Brazil (9). The sequences were assembled and compared with sequences reported in GenBank using the basic local alignment search tool algorithm. The etiologic agent was confirmed as *R. mucilaginosa*, as it had 99% sequence identity with the type strain of this species (CBS 316).

b) Exposure to amphotericin B:

AMB exposure was assayed according to Fekete-Forgács *et al.* (10), with some modifications. This method is based on growing each strain in increasing concentrations of AMB. The minimal inhibitory concentration (MIC) of AMB was first determined for *Rhodotorula* species according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document M27-A3. After the MIC determinations, the cultures were grown overnight in Sabouraud glucose broth (SDB). The cells were added to flasks containing 5 mL of media to achieve a final absorbance of 0.5 at 640 nm. The cultures were incubated at 30°C for 10 h, and AMB was added to a final concentration of 0.125 µg/mL. After a 24 h incubation, the cells of cultures containing AMB were consecutively subcultured three times in fresh SDB medium containing 0.125 µg/mL AMB. The cultures were incubated at 30°C with shaking for 48 h. After the third incubation, the cells were added to flasks containing 5 mL of SDB medium

and 0.125 µg/mL AMB. The turbidity of the cultures was adjusted to achieve a final absorbance of 0.5 at 640 nm. After a 10 h incubation, AMB was added to a final concentration of 0.25 µg/mL. After 24 h at 30°C, the cells were subcultured three times in new SDB medium containing 0.25 µg/mL AMB. Each subculture was incubated at 30°C with shaking for 48 h, which concluded the second exposure. This procedure was repeated consecutively and the AMB concentration was doubled to a final concentration of 16 µg/mL. An intermediate concentration was occasionally introduced when no growth was detected at another concentration. Cells grown at 30°C for 24 h in Sabouraud glucose agar (SDA) with the respective concentration of the drug were used as a control at the end of each exposure. If no growth was observed, the exposure was repeated. Cells from the 16 µg/mL culture were plated on SDA, and a single colony was designated *R. mucilaginosa* AMB resistant (*Rm* AMB-R). Strains that were categorized as resistant, obeyed the MIC > 2 µg/mL criteria.

A negative control was included, and the MIC did not change during the experiment. The strain was maintained in distilled water with 10% glycerol at the resistance concentration (16 µg/mL).

c) Susceptibility tests for the two groups of *R. mucilaginosa*

We defined group I to be the original strains isolated from patients and group II as the same strains after *in vitro* exposure to AMB.

Susceptibility tests were performed using the broth microdilution method (CLSI M27-A3). *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258 were included as quality controls to determine the MICs.

d) Drugs

The stock solutions of AMB (Cristália, São Paulo, Brazil; 5.000 µg/ml), fluconazole (FLC) (Pfizer, São Paulo, Brazil; 6.400 µg/ml), voriconazole (VRC) (Pfizer, São Paulo, Brazil; 1.600 µg/ml), caspofungin (CAS) (Merck Research Laboratories, São Paulo, Brazil; 6.400 µg/ml), ciprofloxacin (CPX) (Bayer, São Paulo, Brazil; 6.400 µg/ml), levofloxacin (LVX) (Janssen, São Paulo, Brazil; 6.400 µg/ml), amlodipine (AML) (Sandoz, Paraná, Brazil; 800 µg/ml), cyclosporine A (CYP)

(Novartis, Sao Paulo, Brazil; 6.400 µg/ml), fluoxetine (FLX) (Germed, São Paulo, Brazil; 6.400 µg/ml), ibuprofen (IBR) (Wyeth, Sao Paulo, Brazil; 6.400 µg/ml), simvastatin (SVT) (Sandoz, Paraná, Brazil; 6.400 µg/ml), and warfarin (WFR) (Farmoquimica, Sao Paulo, Brazil; 800 µg/ml) were prepared by dissolving standard powder/intravenous solution of each drug in their specific solvent (DMSO, or water). The final solutions were diluted in RPMI 1640 medium (Sigma), and the pH was adjusted to 7.0 with morpholinepropanesulfonic acid buffer (Sigma) so that concentrations were two-fold or four-fold greater than the final desired concentrations.

e) Drug interactions tests

AMB, FLC, VRC, and CAS were tested alone and CPX, LVX, AML, CYP, FLX, IBR, SVT, and WFR were tested in combination with AMB, using serial two-fold dilutions of each drug. Susceptibility testing was performed by the broth microdilution method according to the recommendations of NCCLS document M27-A3. The agents and concentrations tested included the following: 8–0.0156 µg/mL AML and WFR; 16–0.0313 µg/mL AMB and VRC; 64–0.125 µg/mL CAS, FLC, CYP, IBR, FLX, CPX, and LVX; 128–0.25 µg/mL SVT. The microdilution plates containing 100 µL of RPMI-1640 with different concentrations of antifungals were inoculated with 100 µL of diluted culture, resulting in 0.5×10^3 – 2.5×10^3 cells/mL in each well. The inoculum was prepared by suspending five colonies from a 48-h old pure culture in sterile saline and adjusting the turbidity to 0.5 McFarland units at 530 nm. The colonies were resuspended in 2 mL distilled water and vortexed for 15 s. Working suspensions were prepared in a 1:50 dilution followed by a 1:10 dilution of the inoculum suspension with RPMI 1640 medium. The microdilution plates were incubated at 30°C and read visually after a 48 h incubation. The experiment was tested in triplicate. The MICs of FLC and CAS were defined as the lowest concentrations that produced a prominent decrease in turbidity compared to the drug-free control. The MICs of all other agents tested were defined as the lowest concentration that completely inhibited growth.

The interactions between AMB and the non-antifungal agents against 35 *Rhodotorula* AMB-susceptible and -resistant strains were evaluated using the broth microdilution checkerboard technique (21). The concentration ranges of the

antifungal agents and non-antifungal agents were 8–0.0625 µg/mL for AML and WFR; 64 to 0.50 µg/mL for CYP, IBR, FLX, CPX, and LVX; and 128–1.0 µg/m: for SVT. The AMB concentrations were 4–0.0313 µg/mL (AMB-susceptible isolates), and 16–0.125 µg/mL (AMB-resistant isolates). A fungal suspension was prepared as described for the broth microdilution assay (approximately 5×10^3 CFU/ml), and 100 µL was inoculated into each well of a 96-well microtiter plate. The plates were incubated at 30°C and read after 48 h. A positive control (fungal growth in drug-free medium) and a negative control (absence of growth on inoculated medium) were also added to the antifungal combination tests. The MIC was defined as the lowest drug concentration at which there was complete absence of growth. The experiment was tested in triplicate. The fractional inhibitory concentration (FIC) was calculated for each agent by dividing the MIC of each drug in combination by the MIC of the drug alone. The FIC values were totaled to determine the fractional inhibitory concentration index (FICI) that resulted from the drug combinations, as described by the following equation: $FICI = FIC_A + FIC_B = C_{A \text{ Comb}}/MIC_{A \text{ Alone}} + C_{B \text{ Comb}}/MIC_{B \text{ Alone}}$, where $MIC_{A \text{ Alone}}$ and $MIC_{B \text{ Alone}}$ are the MICs of drugs A and B when acting alone and $C_{A \text{ Comb}}$ and $C_{B \text{ Comb}}$ are the concentrations of drugs A and B when combined. The FICI was the sum of the FICs for each of the drugs combined.

Drug interactions were classified as synergistic when the FICI was ≤ 0.5 , indifference when the FICI was > 0.5 and ≤ 4 , and antagonistic when the FICI > 4 (22, 23). MICs were converted to the next higher dilution for off-scale calculations.

f) Statistical analysis

Data were captured in MS Excel (Microsoft Corp. Redmond, WA, USA) and analyzed using SPSS ver. 23 software (IBM/SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The paired *t*-test was used to evaluate the different groups (susceptible strains vs. resistant strains) when the antifungal was acting alone.

When combination tests were analyzed, categorical variables were summarized by proportions and percentages. Comparisons of proportions between groups were carried out by the chi-square test. A *p*-value ≤ 0.05 was considered significant.

RESULTS

The *in vitro* susceptibilities of the groups studied are shown in **Table 1**. All group I isolates were susceptible to low concentrations of AMB. Susceptibility to VRC was quite poor (MICs 2–16 µg/mL). FLC and CAS exhibited no activity against *R. mucilaginosa*.

Prolonged exposure to AMB changed the susceptibility of *R. mucilaginosa*. After eight exposures (65 days) to increasing concentrations of AMB, we detected the first four cases of resistance (MICs > 4 µg/mL). After 164 days (11 exposures), all isolates showed MICs of 4–16 µg/mL, which was considered resistant to this polyene.

The susceptibility tests with strains from group II showed high MICs for AMB: 45.7% showed MICs of 8 µg/mL and 25.7% showed MICs of 16 µg/mL. Similarly, the inhibition by VRC required more elevated MICs (4 to > 16 µg/mL); 54.3% showed MICs \geq 16 µg/mL. Primary resistance to CAS and FLC was observed in the group II strains. The statistical analysis showed significant differences in the susceptibility of AMB between the two groups as well as in susceptibility to VRC ($p < 0.05$).

Table 2 shows the percentages of synergism, indifference and antagonism resulting from combinations of AMB with CPX, LFX, AML, CYP, IBP, FXT, SVT, and WRF. The mean FICI of all drugs in combination was indifferent, except for AMB + SVT ($p < 0.05$). The *Rm* AMB-S demonstrated a 1.04 mean FICI, which was indifferent, but mean *Rm* AMB-R was 0.36, indicating synergism. Strains that were resistant to AMB were more susceptible to the combination with SVT. The FICI decreased when *Rhodotorula* strains were resistant to AMB for WFR (1.03–0.77), CPX (2.18–0.74), LFX (2.11–0.55), and increased for IBP (0.61–0.93) combination, $p < 0.05$.

When AMB was combined with antibacterial agents, a high number of antagonistic interactions and no synergism were observed against *Rm* AMB-S. CPX demonstrated 28.6% antagonism followed by 22.9% for LFX. Antagonistic interactions were also observed for three isolates when AMB was combined with CYP. The combination AMB + IBP demonstrated the highest number of synergistic interactions, with FICI < 0.50 for 26 *Rhodotorula* isolates (74.3%). The combinations of AMB with AML, FXT, SVT, and WFR were indifferent, although synergisms were

observed in 45.7% (AML), 42.9% (CYP), 28.6% (FXT), 34.3% (SVT), and 45.7% (WFR) in combination.

Antagonism was no longer observed in the *Rm* AMB-R group when AMB was combined with antibiotics; however, it was present in 14.3% of the isolates in the AMB + CYP combination. The combination with the most indifferent interactions and lowest synergism was AMB + CPX. Twenty-eight isolates (80%) demonstrated indifference, and seven isolates (20%) were synergistic. The combination with the most synergistic interactions was AMB + SVT, with 88.6% (31 isolates) synergism. Synergism was also observed for AMB + LFX (77.1%), AML (62.9%), CYP (60%), and WFR (60%). Indifference was observed for the combinations of AMB + IBP or FXT, with 42.9% of synergism and 57.1% indifferent interactions.

The number of synergistic interactions was highest in the *Rm* AMB-R group. Synergism was observed in 56.8% of all combinations tested vs. 33.9% for the *Rm* AMB-S group. Interestingly, the number of antagonistic interactions was limited in the *Rm* AMB-S group (7.5%). Indifference was predominant in the *Rm* AMB-S group (58.6%).

DISCUSSION

New therapies and medical progress have led to emerging fungal infections, such as *Rhodotorula* infections, in immunocompromised patients. *Rhodotorula* is an opportunistic yeast and an important pathogen in the modern world. Treatments for *R. mucilaginosa* are restricted and a multidrug approach seems to be an alternative by administering novel chemical entity drugs with drugs currently on the market simultaneously (11).

Our susceptibility results are in accordance with those reported by Diekema *et al.*, Pfaller *et al.*, and Zaas *et al.* (5, 12, 13). CAS and FLC did not show *in vitro* activities against *R. mucilaginosa*, but moderate activity was observed for VRC, and AMB remained the treatment of choice with MIC ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ for 100% of the isolates. Resistance to AMB (MIC > 2 $\mu\text{g/ml}$) seemed uncommon and slow in strains isolated from patients treated with AMB, despite extensive worldwide utilization (14). The resistance to antifungal agents acts as an evolutionary improvement allowing the microorganism to survive and reproduce in the presence of the drug (14). Resistance to AMB along with azole resistance is an emerging phenomenon in *Candida* species.

In vitro development of AMB resistance has been described in *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* and *C. lusitanae*, accompanied by changes in cellular morphology (15, 16). Antifungal resistance involves changes, such as reduced capacity to form the germ tube, decreased ergosterol content and cell growth rate, and reduced overexpression of genes encoding efflux pumps or target enzymes (17). These AMB-resistant mechanisms can affect the antifungal therapeutic strategy as well standardized susceptibility testing of yeast. The exact mechanism of *R. mucilaginosa* resistance remains unclear. Here, we showed *in vitro* exposure of *R. mucilaginosa* to increasing concentrations of AMB-originating strains with MICs ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$.

The combined activity of antifungal agents and non-antifungal agents against *Rhodotorula* has rarely been evaluated. The best activity was obtained for the combination AMB + SVT against the AMB-resistant group. The potential use of statins to prevent and treat infections is due to their ability to inhibit ergosterol synthesis, which negatively affects membrane fluidity (18). Cabral *et al.* described the synergism between statins and azoles, and this synergism has been observed against *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, zygomycetes, and dermatophytes (19, 20, 18). Brilhante *et al.* reported no synergistic interactions between SVT and AMB against most *Candida* spp. strains; however, synergism was observed against *Cryptococcus* spp. strains (21).

The best active combination against the AMB-susceptible group (group I) was AMB + IBR with a 74.3% synergistic effect. The synergism observed for this combination is based on the ability of IBR to change prostaglandin production, membrane potential, biofilm formation, and reduce extracellular polysaccharides. Prostaglandin production can be an important virulence factor by promoting fungal colonization and chronic infection (22). A synergistic interaction of this combination has also been observed against *Fusarium* (23, 24).

The combinations AMB + AML or WFR generated synergistic interactions against sensitive and resistant groups of *R. mucilaginosa*. Agents that disturb calcium homeostasis or interfere with hyphal growth, drug tolerance, and virulence can cause stress responses in some yeast (25). Liu *et al.* evaluated the antifungal effects of a combination of calcium channel blockers and showed synergism of FLC combined with AML against resistant strains (26). Guo *et al.* provided *in vitro* evidence for synergism by an azole plus amiodarone against resistant *C. albicans*,

but almost no synergistic activity was seen against susceptible strains (27). The combination therapy of an azole plus WRF is uncommon, given that this interaction is responsible for prolonging prothrombin time. However, anticoagulants have been used along with antimicrobial drugs to prevent further thrombus propagation and improve blood flow through the thrombus. The combination with AMB provides some synergistic effects (28, 29).

No effects were observed (>57%) with the FXT + AMB combination against either group studied. Several studies have explored the effects of selective serotonin reuptake inhibitor (SSRIs) on fungi. Oliveira *et al.* described a stronger synergistic effect in resistant strains, with the majority having no effect in susceptible strains with the FLC + FXT combination (29). Other studies based on checkerboard tests demonstrated that SSRIs interact synergistically with azoles against resistant *C. albicans* strains and with AMB against *Aspergillus* species (30, 31). FLX is an SSRI and the antifungal activity of this class when combined with azoles is probable due to the action of FLX on fungal transporter systems (32).

Antagonisms were observed when AMB was combined with CYP, CPX, or LFX. Studies against mucorales, *Penicillium marneffeii*, *Candida* spp. and *C. neoformans* demonstrated synergism for almost all interactions, AMB + CYP showed antagonism against eight *Rhodotorula* isolates, including AMB-sensitive and -resistant strains (33,34,35,36). Calcineurin inhibitors promote AMB activity by changing cell membrane permeability. Calcineurin is implicated in physiological functions of yeast, including morphogenesis, cell wall biosynthesis, antifungal drug resistance, and virulence (37). Sun *et al.* reported indifference for the combination of tacrolimus and azoles against *C. albicans* susceptible strains, while marked synergism was registered for the resistant strains.

Antagonistic effects in combination with fluorquinolones (CPX/LFX) were registered exclusively against *Rhodotorula* AMB-sensitive strains. Marked synergism was observed for AMB + LFX in the AMB-resistant isolates but indifference was observed for AMB + CPX. Petrou and Rogers reported antagonism against sensitive isolates, whereas Nakajima *et al.* and Vitale *et al.* described synergistic effects for these combinations (37, 38, 39). Quinolones are antibiotics employed to treat different types of bacterial infections with broad spectrum activity as DNA gyrase inhibitors, which are present in pathogenic fungi. Quinolones exhibit an antifungal effect by inhibiting fungal DNA replication (30).

An increase in potency, reduction in dose while maintaining an effect, reduced potential toxicity, fewer side effects, and reduced or slowing of resistance are possible actions gained through synergism. Animal models and clinical trials are warranted to evaluate the potential role of combinations of AMB with non-antifungals for treating infections caused by *R. mucilaginosa* AMB-susceptible or resistant strains.

CONCLUSIONS

Rhodotorula spp. must be considered a potential pathogen in immunosuppressed patients with central venous catheters. Identification is important for correct management because *Rhodotorula* is resistant to FLC and echinocandins. AMB remains the drug of choice for treating *Rhodotorula* infections. More studies are needed to ensure that antifungal drugs are not routinely used and to establish effective antifungal combination therapies for the future. The present study selected eight combinations, which yielded synergistic interactions, notably: SVT + AMB (59.7%), AML + AMB (54.2%), and WFR + AMB (52.8%). Antagonistic interactions were observed for the combinations CPX/LVC + AMB (13.9–11.1%) and CYP + AMB. Combinations between antifungal and non-antifungal agents have the potential to provide new options to counteract the toxicity or failure of traditional therapy and offer a strategy to treat AMB-resistant *R. mucilaginosa* infection through a combined drug approach.

REFERENCES

1. Biswas SK, Yokoyama K, Nishimura K, Miyaji M. Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001 May 1;51(3):1191–9.
2. Mori T, Nakamura Y, Kato J, Sugita K, Murata M, Kamei K, *et al*. Fungemia due to *Rhodotorula mucilaginosa* after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2012 Feb;14(1):91–4.
3. Tuon FF, Costa SF. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. *Rev Iberoam Micol*. 2008;25:135–40.

4. Nunes JM, Bizerra FC, Carmona E, Ferreira R, Colombo AL. Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):382–9.
5. Diekema DJ, Petroelje B, Messer SA, Hollis RJ, Pfaller MA. Activities of available and investigational antifungal agents against *Rhodotorula* species. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):476–8.
6. Tsiodras S, Papageorgiou S, Meletiadis J, Tofas P, Pappa V, Panayiotides J, *et al.* *Rhodotorula mucilaginosa* associated meningitis: A subacute entity with high mortality. Case report and review. *Med Mycol Case Rep.* 2014;6:46–50.
7. Ahmed A, Aggarwal M, Chiu R, Ramratnam B, Rinaldi M, Flanigan TP. A fatal case of *Rhodotorula* meningitis in AIDS. *Med Health R I.* 1998 Jan;81(1):22–3.
8. De Almeida GMD, Costa SF, Melhem M, Motta AL, Szeszs MW, Miyashita F, *et al.* *Rhodotorula* spp. isolated from blood cultures: clinical and microbiological aspects. *Med Mycol.* 2008;46(6):547–56.
9. White T, Bruns T, Lee S, Taylor FJRM, White T, Lee S-H, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications.* 1990.
10. Fekete-Forgács K, Gyüre L, Lenkey B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses.* 2000;43(7–8):273–9.
11. Musiol R, Mrozek-Wilczkiewicz a, Polanski J. Synergy Against Fungal Pathogens: Working Together is Better Than Working Alone. *Curr Med Chem.* 2014;21(7):870–93.
12. Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: Concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. Vol. 42, *Journal of Clinical Microbiology.* 2004. p. 4419–31.
13. Zaas AK, Boyce M, Schell W, Lodge BA, Miller JL, Perfect JR. Risk of fungemia due to *Rhodotorula* and antifungal susceptibility testing of *Rhodotorula* isolates. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):5233–5.
14. Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49 Suppl 1:7–10.

15. Yoon SA, Vazquez JA, Steffan PE, Sobel JD, Akins RA. High-frequency, in vitro reversible switching of *Candida lusitanae* clinical isolates from amphotericin B susceptibility to resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(4):836–45.
16. Kumar R, Shukla PK. Amphotericin B resistance leads to enhanced proteinase and phospholipase activity and reduced germ tube formation in *Candida albicans*. *Fungal Biol.* 2010;114(2–3):189–97.
17. Barker KS, Crisp S, Wiederhold N, Lewis RE, Bareither B, Eckstein J, *et al.* Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(2):376–85.
18. Terblanche M, Almog Y, Rosenson RS, Smith TS, Hackam DG. Statins and sepsis: multiple modifications at multiple levels. Vol. 7, *Lancet Infectious Diseases.* 2007. p. 358–68.
19. Cabral ME, Figueroa LIC, Fariña JI. Synergistic antifungal activity of statin-azole associations as witnessed by *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida utilis*-bioassays and ergosterol quantification. *Rev Iberoam Micol.* 2013;30(1):31–8.
20. Nyilasi I, Kocsubé S, Krizsán K, Galgóczy L, Papp T, Pesti M, *et al.* Susceptibility of clinically important dermatophytes against statins and different statin-antifungal combinations. *Med Mycol.* 2013;1–9.
21. Brilhante RSN, Caetano EP, de Oliveira JS, Castelo-Branco D de SCM, Souza ERY, de Alencar LP, *et al.* Simvastatin inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* and *Cryptococcus* species. *Brazilian J Infect Dis.* 2015;19(5):459–65.
22. Yang S, Liao Y, Cong L, Lu X, Yang R. In vitro interactions between non-steroidal anti-inflammatory drugs and antifungal agents against planktonic and biofilm forms of *Trichosporon asahii*. *PLoS One.* 2016;11(6).
23. Venturini TP, Rossato L, Spader TB, Tronco-Alves GR, Azevedo MI, Weiler CB, *et al.* In vitro synergisms obtained by amphotericin B and voriconazole associated with non-antifungal agents against *Fusarium* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;71(2):126–30.
24. Pina-Vaz C, Sansonetty F, Rodrigues AG, Martinez-De-Oliveira J, Fonseca AF, Mårdh PA. Antifungal activity of ibuprofen alone and in combination with fluconazole against *Candida* species. *J Med Microbiol.* 2000 Sep 1;49(9):831–40.

25. Chen YL, Yu SJ, Huang HY, Chang YL, Lehman VN, Silao FGS, *et al.* Calcineurin controls hyphal growth, virulence, and drug tolerance of *Candida tropicalis*. *Eukaryot Cell*. 2014;13(7):844–54.
26. Liu S, Yue L, Gu W, Li X, Zhang L, Sun S. Synergistic effect of fluconazole and calcium channel blockers against resistant *Candida albicans*. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150859.
27. Guo Q, Sun S, Yu J, Li Y, Cao L. Synergistic activity of azoles with amiodarone against clinically resistant *Candida albicans* tested by checkerboard and time-kill methods. *J Med Microbiol*. 2008;57(4):457–62.
28. Yamamoto H, Habu Y, Yano I, Ozaki J, Kimura Y, Sato E, *et al.* Comparison of the effects of azole antifungal agents on the anticoagulant activity of warfarin. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(12):1990–3.
29. Hong RH, Koch RJ. Possible role of anticoagulation in the treatment of rhinocerebral mucormycosis. *Otolaryngol -- Head Neck Surg*. 2000 Apr 1;122(4):577–8.
30. Gu W, Guo D, Zhang L, Xu D, Sun S. The synergistic effect of azoles and fluoxetine against resistant *Candida albicans* strains is attributed to attenuating fungal virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(10):6179–88.
31. Heller I, Leitner S, Dierich MP, Lass-Flörl C. Serotonin (5-HT) enhances the activity of amphotericin B against *Aspergillus fumigatus in vitro*. *Int J Antimicrob Agents*. 2004;24(4):401–4.
32. Sanchez C, Hyttel J. Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. Vol. 19, *Cellular and Molecular Neurobiology*. 1999. p. 467–89.
33. Dannaoui E, Schwarz P, Lortholary O. *In vitro* interactions between antifungals and immunosuppressive drugs against zygomycetes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3549–51.
34. Mo D, Li X, Wei L, Sun C, Liang H, Cao C. *In Vitro* interactions of calcineurin inhibitors with conventional antifungal agents against the yeast form of *Penicillium marneffeii*. *Mycopathologia*. 2014;178(3–4):217–20.
35. Cordeiro R de A, Macedo R de B, Teixeira CEC, Marques FJ de F, Bandeira T de JPG, Moreira JLB, *et al.* The calcineurin inhibitor cyclosporin A exhibits synergism with antifungals against *Candida parapsilosis* species complex. *J Med Microbiol*. 2014;63(PART 7):936–44.

36. Uppuluri P, Nett J, Heitman J, Andes D. Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(3):1127–32.
37. Petrou MA, Rogers TR. *In-vitro* activity of antifungal agents in combination with four quinolones. *Drugs Exp Clin Res.* 1988;14(1):9–18.
38. Nakajima R, Kitamura A, Someya K, Tanaka M, Sato K. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of DU-6859a, a fluoroquinolone, in combination with amphotericin B and fluconazole against pathogenic fungi. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(7):1517–21.
39. Vitale RG, Afeltra J, De Hoog GS, Rijs AJ, Verweij PE. *In vitro* activity of amphotericin B and itraconazole in combination with flucytosine, sulfadiazine and quinolones against *Exophiala spinifera*. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:1297–300.

TABLES

Table 1 Comparison of the susceptibilities of *R. mucilaginosa* Groups I and II to antifungal agents.

Strains	MIC $\mu\text{g.ml}^{-1}$							
	AMB		CAS		FLC		VRC	
	range	Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range	Mean
<i>Rm</i> AMB-S (n=35)	0.25 – 1.0	0.35	>64	>64	>64	>64	2.0 - 16	6.00
<i>Rm</i> AMB-R (n=35)	4.0 - 16	8.91	>64	>64	>64	>64	4.0 - >16	15.43
p-value		<0.05		>0.05		>0.05		<0.05

AMB, amphotericin B; CAS, caspofungin; VCZ, voriconazole; *Rm* AMB-S, *Rhodotorula mucilaginosa* amphotericin B - susceptible; *Rm* AMB-R, *Rhodotorula mucilaginosa* amphotericin B – resistant

Table 2 Percentages of synergism, indifference and antagonism that resulted from the combinations of AMB with ciprofloxacin (CPX), levofloxacin (LFX), amlodipine (AML), cyclosporin A (CYP), ibuprofen (IBP), fluoxetine (FXT), simvastatin (SVT) and warfarin (WRF).

Agents	Groups of isolates	Interactions (%)			p-value
		Synergism	Indifference	Antagonism	
CPX	<i>Rm</i> AMB-S	0	71.4	28.6	<0.05
	<i>Rm</i> AMB-R	20	80	0	
LFX	<i>Rm</i> AMB-S	0	77.1	22.9	<0.05
	<i>Rm</i> AMB-R	77.1	22.9	0	
AML	<i>Rm</i> AMB-S	45.7	54.3	0	>0.05
	<i>Rm</i> AMB-R	62.9	37.1	0	
CYP	<i>Rm</i> AMB-S	42.9	48.6	8.6	>0.05
	<i>Rm</i> AMB-R	60	25.7	14.3	
IBP	<i>Rm</i> AMB-S	74.3	25.7	0	<0.05
	<i>Rm</i> AMB-R	42.9	57.1	0	
FXT	<i>Rm</i> AMB-S	28.6	71.4	0	>0.05
	<i>Rm</i> AMB-R	42.9	57.1	0	
SVT	<i>Rm</i> AMB-S	34.3	65.7	0	<0.05
	<i>Rm</i> AMB-R	88.6	11.4	0	
WRF	<i>Rm</i> AMB-S	45.7	54.3	0	>0.05
	<i>Rm</i> AMB-R	60	40	0	

Atividade *in vitro* de voriconazol combinado com agentes não antifúngicos frente a *Rhodotorula mucilaginosa*

In vitro* interactions of voriconazole combined with non-antifungal agents against *Rhodotorula mucilaginosa

Tatiana Borba Spader¹, Mauricio Ramírez-Castrillón², Patricia Valente², Sydney Hartz Alves³, Luiz Carlos Severo¹

¹Laboratório de Patologia e Micologia, Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, RS.

² Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

³Laboratório de Pesquisas Micológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

Autor para correspondência: Tatiana Borba Spader. R. Sarmento Leite, 187, 1º andar - Centro Histórico, Porto Alegre - RS, 90050-170.

Email: tatispader@gmail.com

RESUMO

A combinação de voriconazol (VRC) com anfotericina B (AMB) e agentes não-antifúngicos *in vitro* foi avaliada frente a isolados de *Rhodotorula mucilaginosa* de acordo com a técnica de microdiluição em caldo “checkerboard”. A sequência espaçadora transcrita interna foi usada para identificar 35 isolados de *R. mucilaginosa*. As combinações de VRC também foram realizadas após os isolados serem expostos a crescentes concentrações de AMB. A indiferença foi a interação mais predominante quando o VCR foi combinado com AMB frente a isolados sensíveis. Quando o VCR foi combinado com levofloxacino, interações sinérgicas foram observadas. A combinação VRC + ciclosporina A mostrou um potente sinergismo em 85,7% das interações frente a isolados resistentes. Indiferença também foi observada para interações entre VCR + ciprofloxacino ou VCR + sinvastatina. O antagonismo esteve presente na combinação entre VRC e anlodipino frente a isolados sensíveis e resistentes. A terapia combinada pode ser de grande utilidade em infecções causadas por *R. mucilaginosa* quando os isolados apresentam baixa suscetibilidade aos antifúngicos comercializados.

Palavras-chaves: voriconazol; anfotericina B; combinação de fármacos *in vitro*; *R. mucilaginosa*; sinergismo

ABSTRACT

In vitro activities of voriconazole (VRC) in combination with amphotericin B (AMB) and non-antifungal agents were evaluated against isolates of *Rhodotorula mucilaginosa* using the broth microdilution checkerboard technique. Here the internal transcribed spacer sequence (ITS) was used to identify 35 *R. mucilaginosa* isolates. We also evaluated VRC combinations after the isolates were exposure to increasing concentrations of AMB. Indifference was the most common interaction when VCR and AMB was combined against sensitive strains. When VCR was combined with levofloxacin, a strong synergism was observed. VRC + cyclosporine A combination demonstrated a potent synergism and was observed in 85.7% of interactions against resist strains. Indifference was most frequently interaction when VCR was combined with ciprofloxacin or simvastatin. Antagonism was present for VRC + amlodipine combination in susceptible and resistant strains. Combination therapy might be useful in infections caused by *R. mucilaginosa*, in which enhanced drug activity is needed.

Keywords: voriconazole; amphotericin B; *in vitro* drug combination; *R. mucilaginosa*; synergism

INTRODUCTION

Rhodotorula species are generally assumed as commensals and are isolate from skin, nails, and respiratory, gastrointestinal, and urinary tracts. Initially considered a non-pathogenic yeast, in 1960 was published the first case of fatal endocarditis with rheumatic heart disease in a female patient (1). Since then, the number of infections by this genus has clearly increased during the last few years, especially when immunocompromising conditions as indwelling devices, exposure to broad-spectrum antibiotics, neutropenia and/or immunosuppression are present (2).

Rhodotorula species are responsible for bloodstream infections, followed by meningitis, eye infections and peritonitis. In the ARTEMIS surveillance project, *Rhodotorula* were the fourth most common non-*Candida* yeasts isolated from clinical specimens reaching 2 to 4% from 8821 isolates (3). Catheter-related infection is the most common form of infection associated with this genus (4). Fungemia corresponds to 79% of *Rhodotorula* infections in cancer patients and represent 0.2 to 2.3% of all cases described in some epidemiologic studies (5). The mortality from *Rhodotorula* fungemia is around 15% and an overall mortality of 46.2% in patients with meningitis (6). When hematological setting is involved, the mortality range 0% in patients with non-Hodgkin's lymphoma to 21% in patients with acute leukemia (7).

Success of antifungal therapy is restrict and involves AMB administration with or without flucytosine. *In vitro* susceptibility studies show *Rhodotorula* as susceptible to AMB and flucytosine, but reduced susceptibility to azoles and resistance to echinocandins is registered (8). The best activity of azoles is revealed for isavuconazole and fluconazole as not susceptible. Due to the intrinsic resistance to fluconazole, immunocompromised patients who are receiving fluconazole prophylaxis show risk to develop breakthrough infections (9). Using CLSI M27-A3 method, *R. mucilaginosa* reveal a profile of sensibility to AMB (MIC from 0.25 to 1 µg/ml) and flucytosine (MIC from 0.06 to 0.5 µg/mL) (8,10). These genus are susceptible to isavuconazole (0.03–0.125 µg/mL), less susceptible to VCR (0.25–8.0 µg/mL) and resistant to fluconazole (MICs > 64 µg/mL) (10,11). Another important characteristic of *Rhodotorula* spp. is the primary resistance to the echinocandins. Acquired resistance to AMB (MIC > 2 µg/ml) remains uncommon, but when present, few antifungal options are available. It must be stressed that treatments based in azoles, requires usually high dosages because the susceptibility is poor (12).

In view of the reduced activity of antifungals against *Rhodotorula*, we performed *in vitro* drug combination between voriconazole and non-antifungal agents against AMB-susceptible and AMB-resistant isolates. When medicines belong to different pharmacological classes and possess different mechanisms of action, the combination therapy may offer an attractive approach.

MATERIALS AND METHODS

c) Strains and molecular identification

Thirty-five strains of *Rhodotorula* isolated from patients at the Santa Casa de Misericórdia Hospital (Porto Alegre, RS, Brazil) and maintained in the Pathology and Microbiology Laboratory were studied. The internal transcribed spacer sequence was used to identify 35 *R. mucilaginosa* isolates. Sequencing of the internal transcribed sequence (ITS) 1-5.8S rDNA-ITS2 region was performed using the universal primers ITS5 (5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG - 3') and ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') (13). The polymerase chain reaction (PCR) product was purified by the UltraClean® PCR Clean-Up Kit (Mobio Laboratories), and sequenced at the Ludwig Biotechnologia facility in Alvorada, Brazil. The sequences were assembled and compared with sequences reported in GenBank using the basic local alignment search tool algorithm. The etiologic agent was confirmed as *R. mucilaginosa*, as it had 99% sequence identity with the type strain of this species (CBS 316).

d) Exposure to amphotericin B:

AMB exposure was assayed according to Fekete-Forgács *et al.*, with some modifications (14). This method is based on growing each strain in increasing concentrations of AMB. After the MIC determinations, the cultures were grown overnight in Sabouraud glucose broth (SDB). The cells were added to flasks containing 5 mL of media to achieve a final absorbance of 0.5 at 640 nm. The cultures were incubated at 30°C for 10 h, and AMB was added to a final concentration of 0.125 µg/mL. After a 24 h incubation, the cells of cultures containing AMB were consecutively subcultured three times in fresh SDB medium containing

0.125 µg/mL AMB. After the third incubation, the cells were added to flasks containing 5 mL of SDB medium and 0.125 µg/mL AMB. This procedure was repeated consecutively and the AMB concentration was doubled to a final concentration of 16 µg/mL. An intermediate concentration was occasionally introduced when no growth was detected at another concentration. Cells grown at 30°C for 24 h in Sabouraud glucose agar (SDA) with the respective concentration of the drug were used as a control at the end of each exposure. If no growth was observed, the exposure was repeated. Cells from the 16 µg/mL culture were plated on SDA, and a single colony was designated *R. mucilaginosa* AMB resistant (*Rm* AMB-R). Strains that were categorized as resistant, obeyed the MIC > 2 µg/mL criteria.

c) Susceptibility tests for the two groups of *R. mucilaginosa*

We defined group I to be the original strains isolated from patients and group II as the same strains after *in vitro* exposure to AMB.

Susceptibility tests were performed using a broth microdilution method (CLSI M27-A3). *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258 were included as quality controls to determine the MICs.

g) Drugs

The stock solutions of AMB (Cristália, São Paulo, Brazil; 5.000 µg/ml), VRC (Pfizer, Sao Paulo, Brazil; 1.600 µg/ml), ciprofloxacin (CPX) (Bayer, Sao Paulo, Brazil; 6.400 µg/ml), levofloxacin (LVX) (Janssen, Sao Paulo, Brazil; 6.400 µg/ml), amlodipine (AML) (Sandoz, Paraná, Brazil; 800 µg/ml), cyclosporine A (CYP) (Novartis, Sao Paulo, Brazil; 6.400 µg/ml), fluoxetine (FLX) (Germed, São Paulo, Brazil; 6.400 µg/ml), ibuprofen (IBR) (Wyeth, Sao Paulo, Brazil; 6.400 µg/ml), simvastatin (SVT) (Sandoz, Paraná, Brazil; 6.400 µg/ml), and warfarin (WFR) (Farmoquimica, Sao Paulo, Brazil; 800 µg/ml) were prepared by dissolving standard powder/intravenous solution of each drug in their specific solvent (DMSO, or water). The final solutions were diluted in RPMI 1640 medium (Sigma), and the pH was adjusted to 7.0 with morpholinepropanesulfonic acid buffer (Sigma) so that

concentrations were two-fold or four-fold greater than the final desired concentrations.

h) Drug interactions tests

AMB and VRC were tested alone and CPX, LVX, AML, CYP, FLX, IBR, SVT, and WFR were tested in combination with VCR, using serial two-fold dilutions of each drug. Susceptibility testing was performed by the broth microdilution method according to the recommendations of NCCLS document M27-A3. The agents and concentrations tested included the following: 8–0.0156 µg/mL AML and WFR; 16–0.0313 µg/mL AMB and VRC; 64–0.125 µg/mL CYP, IBR, FLX, CPX, and LVX; 128–0.25 µg/mL SVT. The microdilution plates containing 100 µL of RPMI-1640 with different concentrations of antifungals were inoculated with 100 µL of diluted culture, resulting in 0.5×10^3 – 2.5×10^3 cells/mL in each well. The microdilution plates were incubated at 30°C and read visually after a 48 h incubation. The experiment was tested in triplicate. The MICs of all agents tested were defined as the lowest concentration that completely inhibited growth.

The interactions between VCR and the non-antifungal agents against 35 *Rhodotorula* AMB-susceptible and -resistant strains were evaluated using a broth microdilution checkerboard technique (14). The concentration ranges of the antifungal agents and non-antifungal agents were 8–0.0625 µg/mL for AML and WFR; 64 to 0.50 µg/mL for CYP, IBR, FLX, CPX, and LVX; and 128–1.0 µg/m: for SVT. The AMB concentrations were 4–0.0313 µg/mL (AMB-susceptible isolates), and 16–0.125 µg/mL (AMB- resistant isolates). A fungal suspension was prepared as described for the broth microdilution method (approximately 5×10^3 CFU/ml), and 100 µL was inoculated into each well of a 96-well microtiter plate. The plates were incubated at 30°C and read after 48 h. A positive control (fungal growth in drug-free medium) and a negative control (absence of growth on inoculated medium) were also added to the antifungal combination tests. The MIC was defined as the lowest drug concentration at which there was complete absence of growth. The experiment was tested in triplicate. The fractional inhibitory concentration (FIC) was calculated for each agent by dividing the MIC of each drug in combination by the MIC of the drug alone. The FIC values were totaled to determine the fractional inhibitory concentration index (FICI) that resulted from the drug combinations, as described by

the following equation: $FICI = FIC_A + FIC_B = C_{A\text{ Comb}}/MIC_{A\text{ Alone}} + C_{B\text{ Comb}}/MIC_{B\text{ Alone}}$, where $MIC_{A\text{ Alone}}$ and $MIC_{B\text{ Alone}}$ are the MICs of drugs A and B when acting alone and $C_{A\text{ Comb}}$ and $C_{B\text{ Comb}}$ are the concentrations of drugs A and B when combined. The FICI was the sum of the FICs for each of the drugs combined. Drug interactions were classified as synergistic when the FICI was ≤ 0.5 , indifference when the FICI was > 0.5 and ≤ 4 , and antagonistic when the FICI > 4 . (22, 23) MICs were converted to the next higher dilution for off-scale calculations.

e) Statistical Analysis

Data were captured in MS Excel (Microsoft Corp. Redmond, WA, USA) and analyzed using SPSS ver. 23 software (IBM/SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The Wilcoxon paired test was used to evaluate the different groups (susceptible strains vs. resistant strains) when the antifungal was acting alone. When combination tests were analyzed, categorical variables were summarized by proportions and percentages. Comparisons of proportions between groups were carried out by the chi-square test. A p-value ≤ 0.05 was considered significant.

RESULTS

In vitro susceptibilities of the groups to VRC were tested. All group I isolates were poorly susceptible to VRC and MICs from 2 - 16 $\mu\text{g/mL}$. Prolonged exposure to AMB changed the susceptibility of *R. mucilaginosa* and the inhibition by VRC required more elevated MICs (4 to $> 16 \mu\text{g/mL}$). The statistical analysis showed significant differences in the susceptibility of VCR between the two groups ($p < 0.05$).

The mean FICI of VCR + AMB or non-antifungal agents are summarized in **Table 1**. By checkerboard testing, the majority of antifungal combinations were found to be indifferent. Indifference were found when VCR were combined with AMB, CPX, FXT, IBP, SVT or WFR. The lowest FICI was observed in group II for VCR + CYP combination and the highest were observed for VRC + AML, in group I and II. Significant FICI increase in group II of VCR + LFX combination were demonstrated, although reduction were observed for VRC + CYP combination ($p < 0.05$).

Table 2 points that synergistic interactions were noticed for all combinations. In group I, synergy was found for VCR + AMB combination; however, indifference

was the most common interaction. When VCR was combined with LVX, a strong synergism was demonstrated against *R. mucilaginosa* isolates. Synergistic interaction was observed for VCR plus CPX, CYP, FXT, IBP, SVT and WFR and varies from 40% to 60%. Antagonism was revealed in one combination. VCZ + AML demonstrated 11.4% of antagonist interaction, although indifference and synergism were present in this combination.

In group II, VRC + CYP combination demonstrated a potent synergism and was observed in 85.7% of interactions. Indifference was most frequently interaction and was revealed in 82.9% for VRC + CPX combination and in 34.3% for VRC + SVT combination. Antagonism was present for VRC + AML combination in 8.6% of the isolates, although the number of synergistic interaction increase from 11.4% (group I) to 34.3% (group II).

DISCUSSION

Although a variety of molds and yeasts are susceptible to VRC *in vitro* and *in vivo*, *R. mucilaginosa* and *R. glutinis* can be resistant (6). VCR is a triazole antifungal agent generally used in invasive fungal infections treatment. It works inhibiting cytochrome P450 (CYP 450)-dependent 14 α -lanosterol demethylation, which is a vital step in cell membrane ergosterol synthesis by fungi. By blocking fungal cell wall growth, the result is the death of the fungus (15). This second-generation triazole provide a broad spectrum of activity and a potential to improve therapeutic options against invasive fungal infections, such as invasive aspergillosis and refractory infections of *Scedosporium apiospermum* and *Fusarium* spp. Azole derivatives have a disadvantage in antifungal activity since they are only fungistatic and this characteristic contributes to the development of resistant perceived in strains from patients with profound neutropenia or immunosuppression (16).

We found synergy, indifference and antagonism for the nine-combination antifungal therapies against *R. mucilaginosa*. VRC demonstrated an increased activity in combination than your activity alone. The best combination was VRC + CYP, showing synergism for groups I and II. Our findings are in accordance with those reported in other studies. Li *et al.* described synergism when azoles was combined with CYP against *C. albicans* isolates, especially against azole-resistant strains (17). In Cordeiro *et al.* study, the synergism was observed between CYP plus

AMB, FLC, VRZ or CAS, with FICI values as low as 0.025 for CYP + VRZ against *C. parapsilosis* (18). MIC reduction caused by synergistic association with CYP led us to suppose that calcineurin inhibition may also have an effect against resistant *R. mucilaginosa* isolates, as shown previously for *C. albicans* (18). Alone CYP has no activity, but the potent synergism showed in the combination can be explained by the capacity of CYP cause changes in calcineurin pathway, which is critical in fungal survival and stress responses in several fungi (17).

Synergism was described between quinolones and VRC. Contrary to reported by Stergiopoulou *et al.* the synergy rate for CPX combination was not as high as that for the LVX + VRC against sensitive strains, however there were a significant number of isolates displaying synergistic interaction. Antagonism was not observed in any of the two groups (19). Another *in vivo* study have showed the efficacy of interaction when antifungals agents were combined with fluorquinolones against candidiasis caused by azole-resistant *C. albicans* strains (20). Antifungal activity of fluorquinolones can be explained by the binding of fungal topoisomerase and so inhibits the fungal DNA replication (19). Patients under risk of fungal and bacterial infections can benefit with combination between quinolone and azoles.

Although no statistic difference was found between VRC plus FXT, IBP, SVT and WFR, synergism reached 50% against sensitive and resistant strains. The lack of antagonism was also confirmed. Gu *et al.* studying *C. albicans* resistant justified the synergism obtained by azoles + fluoxetine due the ability of fluoxetine in attenuating fungal virulence and interact with fungal transporter systems (21). Pina-Vaz *et al.* explained the synergism between ibuprofen and FCZ against *C. albicans* and non-*albicans* resistant strains due the damage in cytoplasmic membrane with change in permeability of the cell. The fungicidal activity of this drug was described as dependent of the concentration used (22). Arai *et al.* described *in vitro* synergistic effect of fluconazole with non-steroidal anti-inflammatory agent ibuprofen against pathogenic yeast *C. albicans* and revealed that no synergistic effect of fluconazole combined with ibuprofen was seen against fluconazole-susceptible strains, but an effect was seen against fluconazole-resistant strains (23). The *in vitro* interactions between azoles and statins were also studied against *C. albicans*, *C. glabrata*, *Paecilomyces variotii* and *Aspergillus fumigatus*. Nyilasi *et al* detected additive or synergistic interactions between statins and azoles at concentrations clinically achievable in human serum (24). Cabral *et al.* justified the synergism between azoles

and statins association by the interference of statin in sterol biosynthesis, enhancing the permeability of fungus cell to azoles. Antifungal activity of azoles + WRF has not been studied. However, anticoagulants have been used along with antimicrobial drugs and has the objective to prevent further thrombus propagation and improve blood flow through the thrombus (25).

Our findings confirm the indifference found in combinations between azoles and polyenes. Indifferent interaction was found over 88% of the isolates, including sensitive and resistant *R. mucilaginosa*. In theory, combining a polyene with azoles may generate antagonist interaction due the block synthesis of ergosterol by azoles interfering in AMB mechanism of action of in cell membrane (26). However, *in vitro* assays show results ranging from antagonism to synergism. Indifference was found for AMB plus azoles against *Trichosporon asahii* and *C. neoformans* (27, 28). AMB plus azole exhibited mostly indifference and antagonism in animal models of invasive aspergillosis (29, 30).

In the present study, while VRC + AML produced antagonistic reaction, other studies involving azoles plus calcium channel blockers have shown that this combination markedly improves the therapeutic outcome against azole-resistant *C. albicans* and *A. fumigatus* (31, 32). The synergistic antifungal activity is expect since calcium channel blockers elicits an immediate, dose-dependent hyperpolarization of the membrane, causing calcium influx and release from internal stores and inducing a disruption of calcium homeostasis.

CONCLUSION

In summary, we found evidence of a strong synergism for VCR + CYP and VRC + LVX combination against *R. mucilaginosa*. Synergism interaction was also observed for VRC plus CPX, CYP, FXT, IBP, SVT and WFR, with no significant difference between them. The interaction most frequently detected was indifference for VRC + AMB (88.6%). In addition, antagonism was observed for the combination VRC + AML. These results strengthen the potential of VCR combination as a promising approach to enhance the susceptibility against AMB resistant strains. The primary aim of our study was to examine the *in vitro* potential of drug combinations against *R. mucilaginosa*. We think our results can signal in the choice of potential antifungal combinations in order to evaluate their effects in animal models.

REFERENCES

1. Louria DB, Greenberg SM, Molander DW. Fungemia caused by certain nonpathogenic strains of the Family *Cryptococcaceae*. N Engl J Med. 1960 Dec 22;263(25):1281–4.
2. Kiehn TE, Gorey E, Brown AE, Edwards FF, Armstrong D. Sepsis due to *Rhodotorula* related to use of indwelling central venous catheters. Clin Infect Dis. 1992;14(4):841–6.
3. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2005: an 8.5-Year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing. J Clin Microbiol. 2007 Jun 1;45(6):1735–45.
4. Nunes JM, Bizerra FC, Carmona E, Ferreira R, Colombo AL. Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(1):382–9.
5. Fernández-Ruiz M, Guinea J, Puig-Asensio M, Zaragoza Ó, Almirante B, Cuenca-Estrella M, et al. Fungemia due to rare opportunistic yeasts: data from a population-based surveillance in Spain. Med Mycol. 2017 Feb 1;55(2):125–36.
6. Tuon FF, Costa SF. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. Rev Iberoam Micol. 2008;25:135–40.
7. Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O, et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. Clin Microbiol Infect. 2014;20(S3):76–98.
8. Guidara R, Trabelsi H, Neji S, Cheikhrouhou F, Sellami H, Makni F, et al. *Rhodotorula* fungemia: Report of two cases in Sfax (Tunisia). Vol. 26, Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology. 2016.
9. Lunardi LW, Aquino VR, Zimmerman RA, Goldani LZ. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. Clin Infect Dis. 2006 Sep 15;43(6):e60–3.
10. Diekema DJ, Petroelje B, Messer SA, Hollis RJ, Pfaller MA. Activities of available and investigational antifungal agents against *Rhodotorula* species. J Clin Microbiol. 2005;43(1):476–8.

11. Thompson GR, Wiederhold NP, Sutton DA, Fothergill A, Patterson TF. *In vitro* activity of isavuconazole against *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Geotrichum*, *Saccharomyces* and *Pichia* species. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(1):79–83.
12. Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49 Suppl 1:7–10.
13. White T, Bruns T, Lee S, Taylor FJRM, White T, Lee S-H, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications.* 1990.
14. Fekete-Forgács K, Gyüre L, Lenkey B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses.* 2000;43(7–8):273–9.
15. Pearson MM, Rogers PD, Cleary JD, Chapman SW, Da Camara C, Perreault MM. Voriconazole: A new triazole antifungal agent. *Ann Pharmacother.* 2003;37(3):420–32.
16. Onyewu C, Blankenship JR, Del Poeta M, Heitman J. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(3):956–64.
17. Li Y, Sun S, Guo Q, Ma L, Shi C, Su L, et al. *In vitro* interaction between azoles and cyclosporin A against clinical isolates of *Candida albicans* determined by the checkerboard method and time-kill curves. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(3):577–85.
18. Uppuluri P, Nett J, Heitman J, Andes D. Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(3):1127–32.
19. Stergiopoulou T, Meletiadis J, Sein T, Papaioannidou P, Tsiouris I, Roilides E, et al. Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(2):343–8.
20. Sasaki E, Maesaki S, Miyazaki Y, Yanagihara K, Tomono K, Tashiro T, et al. Synergistic effect of ofloxacin and fluconazole against azole-resistant *Candida albicans*. *J Infect Chemother.* 2000 Sep;6(3):151–4.

21. Gu W, Guo D, Zhang L, Xu D, Sun S. The synergistic effect of azoles and fluoxetine against resistant *Candida albicans* strains is attributed to attenuating fungal virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(10):6179–88.
22. Pina-Vaz C, Sansonetty F, Rodrigues AG, Martinez-De-Oliveira J, Fonseca AF, Mårdh PA. Antifungal activity of ibuprofen alone and in combination with fluconazole against *Candida* species. *J Med Microbiol*. 2000 Sep 1;49(9):831–40.
23. Arai R, Sugita T, Nishikawa A. Reassessment of the in vitro synergistic effect of fluconazole with the non-steroidal anti-inflammatory agent ibuprofen against *Candida albicans*. *Mycoses*. 2005 Jan;48(1):38–41.
24. Nyilasi I, Kocsubé S, Krizsán K, Galgóczy L, Papp T, Pesti M, et al. Susceptibility of clinically important dermatophytes against statins and different statin-antifungal combinations. *Med Mycol*. 2013;1–9.
25. Cabral ME, Figueroa LIC, Fariña JI. Synergistic antifungal activity of statin-azole associations as witnessed by *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida utilis*-bioassays and ergosterol quantification. *Rev Iberoam Micol*. 2013;30(1):31–8.
26. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Mar;48(3):693–715.
27. Li H, Lu Q, Wan Z, Zhang J. In vitro combined activity of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(6):550–2.
28. Barchiesi F, Schimizzi AM, Caselli F, Novelli A, Fallani S, Giannini D, et al. Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(9):2435–41.
29. Vazquez JA. Clinical practice: combination antifungal therapy for mold infections: much ado about nothing? *Clin Infect Dis*. 2008;46(12):1889–901.
30. Chandrasekar PH, Cutright JL, Manavathu EK. Efficacy of voriconazole plus amphotericin B or micafungin in a guinea-pig model of invasive pulmonary aspergillosis. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10(10):925–8.
31. Liu S, Yue L, Gu W, Li X, Zhang L, Sun S. Synergistic effect of fluconazole and calcium channel blockers against resistant *Candida albicans*. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150859.

32. Guo Q, Sun S, Li Y, Yu J, Shi C, Severin FF. *In vitro* interactions between azoles and amiodarone against clinical *Candida albicans*. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Jan 1;31(1):88–90.

TABLES

Table 1. Checkerboard FICI (median and range) of VCR in combination with AMB and non-antifungals agents against 35 *Rhodotorula mucilaginosa* susceptible and resistant strains

	<i>Rm</i> AMB-S		<i>Rm</i> AMB-R		p-value
	FICI median (range)	Interpretation	FICI median (range)	Interpretation	
AMB	1.06 (0.38 - 2.13)	indifference	1.00 (0.27 - 2.03)	indifference	>0.05
CPX	0.89 (0.25 - 2.00)	indifference	0.92 (0.02 - 2.01)	indifference	>0.05
LFX	0.60 (0.25 - 1.00)	indifference	0.93 (0.07 - 2.00)	indifference	<0.05
AML	1.78 (0.13 - 4.00)	indifference	1.18 (0.13 - 4.00)	indifference	<0.05
CYP	0.67 (0.13-2.00)	indifference	0.39 (0.04 - 2.00)	synergism	<0.05
FXT	0.73 (0.13 - 2.00)	indifference	0.71 (0.02 - 2.00)	indifference	>0.05
IBP	1.21 (0.07 - 2.00)	indifference	1.02 (0.06 - 2.00)	indifference	>0.05
SVT	0.74 (0.13 - 2.00)	indifference	0.61 (0.07 - 2.00)	indifference	>0.05
WFR	0.81 (0.13 - 2.00)	indifference	0.77 (0.02 - 2.00)	indifference	>0.05

Rm AMB-S, *Rhodotorula mucilaginosa* AMB-susceptible; *Rm* AMB-R, *Rhodotorula mucilaginosa* AMB-resistant; amphotericin B; CPX, ciprofloxacin; LFX, levofloxacin; AML, amlodipine; CYP, cyclosporine A; FXT, fluoxetine; IBP, ibuprofen; SVT, simvastatin; WFR, warfarin.

Table 2. Interactions among VRC combined with non-antifungal agents against *Rhodotorula mucilaginosa* strains.

		Synergism	Indifference	Antagonism	p-value
		(n%)	(n%)	(n%)	
AMB	<i>Rm</i> AMB - S	4 (11.4%)	31 (88.6%)	0	>0.05
	<i>Rm</i> AMB - R	2 (5.7%)	33(94.3%)	0	
CPX	<i>Rm</i> AMB - S	15 (42.9%)	20 (57.1%)	0	<0.05
	<i>Rm</i> AMB - R	6 (17.1%)	29 (82.9%)	0	
LVX	<i>Rm</i> AMB - S	25 (71.4%)	10 (28.6%)	0	<0.05
	<i>Rm</i> AMB - R	16 (45.7%)	19 (54.3%)	0	
AML	<i>Rm</i> AMB - S	4 (11.4%)	27 (77.1%)	4 (11.4%)	>0.05
	<i>Rm</i> AMB - R	12 (34.3%)	20 (57.1%)	3 (8.6%)	
CYP	<i>Rm</i> AMB - S	19 (54.3%)	16 (45.7%)	0	<0.05
	<i>Rm</i> AMB - R	30 (85.7%)	5 (14.3%)	0	
FXT	<i>Rm</i> AMB - S	15 (42.9%)	20 (57.1%)	0	>0.05
	<i>Rm</i> AMB - R	22 (62.9%)	13 (37.1%)	0	
IBP	<i>Rm</i> AMB - S	14 (40%)	21 (60%)	0	>0.05
	<i>Rm</i> AMB - R	11 (31.4%)	24 (68.6%)	0	
SVT	<i>Rm</i> AMB - S	21 (60%)	14 (40%)	0	>0.05
	<i>Rm</i> AMB - R	23 (65.7%)	12 (34.3%)	0	
WFR	<i>Rm</i> AMB - S	19 (54.3%)	16 (45.7%)	0	>0.05
	<i>Rm</i> AMB - R	19 (54.3%)	16 (45.7%)	0	

AMB, amphotericin B; **VRC**, voriconazole; *Rm* AMB-S, *Rhodotorula mucilaginosa* amphotericin B - susceptible; *Rm* AMB-R, *Rhodotorula mucilaginosa* amphotericin B – resistant; ciprofloxacin (CPX), levofloxacin (LVX), amlodipine (AML), cyclosporin A (CYP), ibuprofen (IBP), fluoxetine (FXT), simvastatin (SVT) and warfarin (WRF).

7 CONCLUSÕES

Os isolados de *R. mucilaginosa* foram suscetíveis a baixas concentrações de anfotericina B e elevadas CIM foram descritas para fluconazol e caspofungina. A exposição dos isolados a elevadas concentrações de anfotericina B modificou a suscetibilidade ao voriconazol, resultando em CIMs mais elevadas.

Interações antagônicas foram observadas para a combinação entre anfotericina B mais quinolonas ou ciclosporina frente a isolados sensíveis e resistentes a anfotericina B. Quando voriconazol foi combinado com anlodipino, interações antagônicas também foram descritas.

Um potente sinergismo foi observado para as combinações entre anfotericina B mais ibuprofeno frente a isolados sensíveis e entre anfotericina B mais sinvastatina frente a isolados resistentes a anfotericina B. Quando voriconazol foi combinado com levofloxacino, um elevado número de interações sinérgicas foram observadas frente a isolados sensíveis e entre voriconazol mais ciclosporina A frente a isolados resistentes.

Interações indiferentes foram descritas para as combinações entre anfotericina B mais anlodipino, fluoxetina ou varfarina. Indiferença também foi observada quando voriconazol foi combinado com anfotericina B ou ciprofloxacino.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inicialmente considerada não patogênica, *R. mucilaginosa* tem se destacado como um patógeno emergente principalmente em pacientes imunocomprometidos que fazem uso de CVC. Considerando que os antifúngicos demonstram pouca atividade frente a isolados de *Rhodotorula* e que o perfil de suscetibilidade se modificou após a exposição a elevadas concentrações de anfotericina B, novas opções terapêuticas se tornam necessárias. Um potente sinergismo foi obtido para as combinações entre anfotericina B mais sinvastatina e entre voriconazol mais ciclosporina ou levofloxacino frente a espécies sensíveis e resistentes de *R. mucilaginosa*. Antagonismo esteve presente nas combinações entre anfotericina B mais quinolonas ou ciclosporina A e entre voriconazol mais anlodipino. A combinação entre antifúngicos e não antifúngicos mostrou importantes interações sinérgicas e, nestes casos, a terapia combinada mostrou resultados superiores a monoterapia *in vitro*.

9 ANEXOS

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DAS ASSOCIAÇÕES DE ANTIFÚNGICOS COM FÁRMACOS DIVERSOS FRENTE A *Trichosporon* sp., *Rhodotorula* sp. e *Saccharomyces* sp.

Pesquisador: TATIANA BORBA SPADER

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 23190013.4.0000.5335

Instituição Proponente: ISCMPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 607.867

Data da Relatoria: 11/03/2014

Apresentação do Projeto:

Estudos de suscetibilidade tornaram-se relevantes pela emergência da resistência entre patógenos fúngicos clássicos, mas, sobretudo, entre os fungos oportunistas. Os gêneros *Trichosporon*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces* que inicialmente eram classificados como comensais, desenvolveram capacidade de causar infecções oportunistas com altas taxas de mortalidade em hospedeiros susceptíveis. Atualmente, a importância médica de micoses disseminadas devido a estes gêneros tem aumentado, já que fatores que predispõe ao risco de infecção, como as malignidades hematológicas, quimioterapia citotóxica e transplantes de órgãos estão presentes com determinada frequência. Em relação ao tratamento, estes fungos manifestam respostas variadas aos medicamentos administrados e altas taxas de mortalidade são observadas. A prospecção de combinações medicamentosas com efeito sinérgico encerra um potencial para futuros tratamentos, o que requer imediata investigação *in vitro*.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a suscetibilidade de espécies dos gêneros *Trichosporon* sp., *Rhodotorula* sp. e *Saccharomyces* sp. a antifúngicos convencionais e associações.

Objetivo Secundário: Avaliar a suscetibilidade (CIM e CFM- Concentração Fungicida Mínima) de *Trichosporon* sp., *Rhodotorula* sp. e *Saccharomyces* sp. a anfotericina B, fluconazol, itraconazol,

Endereço: R. Profª Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 607.867

voriconazol e flucitosina e avaliar a suscetibilidade (CIM e CFM) de *Trichosporon* sp., *Rhodotorula* sp. e *Saccharomyces* sp. a associações de antifúngicos com antibacterianos, estatinas, flucitosina e imunomoduladores.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios: O presente projeto trará o benefício de demonstrar as combinações entre fármacos na qual poderá ser explorada a atividade sinérgica, buscando-se "in vitro" opções para futuros tratamentos "in vivo". Combinações com interações positivas são importantes por serem uma terapêutica alternativa nos casos de infecções por fungos pouco sensíveis a monoterapia antifúngica habitual. Também terá o benefício de demonstrar as interações antagônicas que obrigatoriamente deverão ser evitadas no tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A metodologia de análise de dados será estatístico. Utilizar-se-ão 120 isolados fúngicos pertencentes as espécies de *Trichosporon*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces* que foram anteriormente isolados e identificados de pacientes que utilizaram o serviço laboratorial, sem distinção de faixa etária, sexo, etnia, classes e grupo sexuais. Os resultados das interações entre antifúngicos e fármacos diversos serão demonstrados em porcentagens, analisando quantas das interações foram sinérgicas, antagônicas ou indiferentes com relação a todas as interações que foram realizadas.

Considerações sobre os Temos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Após avaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer.

Endereço: R. Prof. Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51) 3214-8571 **Fax:** (51) 3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 607.867

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 - Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

PORTO ALEGRE, 08 de Abril de 2014

Assinador por:
Claudio Teloken
(Coordenador)

Endereço: R. Profª Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51) 3214-8571 **Fax:** (51) 3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br