

**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 recaptção 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 aos 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 positiva 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 intravítrea 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 mononucleares 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 resistente 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 imunossuppressores 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 a 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 negatização 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, Catavittello 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 *Torulæ*. *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, Meletiadiis 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, Meletiadiis 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.