

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

Francieli Chassot

***Candida parapsilosis*: RESISTÊNCIA AS EQUINOCANDINAS E A  
SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS ISOLADOS E EM  
COMBINAÇÃO**

Santa Maria, RS

2016



**Francieli Chassot**

***Candida parapsilosis*: RESISTÊNCIA AS EQUINOCANDINAS E A  
SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS ISOLADOS E EM COMBINAÇÃO**

**Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, da  
Universidade Federal de Santa  
Maria (UFSM, RS), como requisito  
parcial para obtenção do título de  
Doutora em Ciências  
Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves  
Coorientadora: Profa. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

Santa Maria, RS  
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Chassot, Francieli

Candida parapsilosis: RESISTÊNCIA AS EQUINOCANDINAS E A SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS ISOLADOS E EM COMBINAÇÃO / Francieli Chassot.- 2016.

140 p.; 30 cm

Orientador: Sydney Hartz Alves

Coorientadora: Terezinha Inez Estivalet Svidzinski  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2016

1. Candida parapsilosis 2. Suscetibilidade 3. Associações 4. Equinocandinas 5. Resistência antifúngica  
I. Hartz Alves, Sydney II. Estivalet Svidzinski, Terezinha Inez III. Título.

Francieli Chassot

***Candida parapsilosis*: RESISTÊNCIA AS EQUINOCANDINAS E A  
SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS ISOLADOS E EM COMBINAÇÃO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 05 de agosto de 2016:



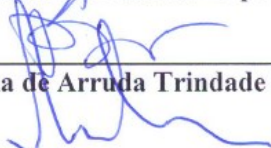
Sydney Hartz Alves Dr. (UFSM)  
(Presidente/Orientador)



Érico Silva Loreto Dr. (SOBRESP)



Paulo Guilherme Markus Lopes Dr. (UFCSPA)



Priscila de Arruda Trindade Dra. (UFSM)

Paulo Edelvar Corrêa Peres Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS  
2016

## AGRADECIMENTOS

A todos que estiveram ao meu lado e que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho. Para vocês, ofereço este espaço e agradeço:

- aos meus pais, Aloísio Enori Chassot e Cinesia Teresinha Chassot, pelo imenso amor, compreensão, respeito, ensinamentos, educação e pelo apoio incessante na busca dos meus objetivos;

- as minhas irmãs Daici, Tatiani e Janaíne, à minha sobrinha Amanda, pelo amor, pela força e sentimento que nos une, pelo carinho e amizade;

- ao meu orientador Prof. Dr. Sydney Hartz Alves, pela sua dedicação, competência, profissionalismo e pela confiança em mim depositada;

- a Profa. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski, pela orientação, pela oportunidade de desenvolver parte deste trabalho em seu laboratório e a todos os colegas da Universidade Estadual de Maringá que me acolheram de forma carinhosa;

- as minhas amigas, Tarcieli Pozzebon Venturini, Luana Rossato e Fernanda Baldissera Piasentin, que me ajudaram desde o início, muito obrigada pela amizade, incentivo e apoio;

- aos colegas e amigos do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria, pela amizade e apoio técnico e científico;

- aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela solicitude com que resolvem nossos problemas;

- a todos os docentes e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos conhecimentos transmitidos;

- aos professores Érico Silva Loreto, Paulo Guilherme Markus Lopes, Priscila de Arruda Trindade, Paulo Edelvar Corrêa Peres, Franciele Pantella Kunz de Jesus e Roberto Christ Vianna Santos por terem gentilmente aceito o convite para participarem da banca de avaliação desta tese;

- à universidade pública, gratuita e de qualidade, pela oportunidade de desenvolver e concretizar este estudo e a CAPES pelo apoio financeiro.

Muito obrigada a todos!



## RESUMO

### ***Candida parapsilosis*: RESISTÊNCIA AS EQUINOCANDINAS E A SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS ISOLADOS E EM COMBINAÇÃO**

AUTORA: Francieli Chassot

ORIENTADOR: Sydney Hartz Alves

COORIENTADORA: Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

*Candida parapsilosis* é um fungo leveduriforme que causa um amplo espectro de infecções, ocorrendo predominantemente em pacientes imunocomprometidos e representando uma das principais causas de infecções relacionadas à assistência a saúde. A emergência de resistência desta espécie às equinocandinas impõe a busca por novas possibilidades terapêuticas. Neste contexto, esta tese teve como objetivos a exposição *in vitro* de cepas *C. parapsilosis* equinocandina-sensíveis (ES) a concentrações crescentes de equinocandinas, a fim de obter isolados *C. parapsilosis* equinocandina-resistentes (ER) para então, avaliar a suscetibilidade *in vitro* de diferentes isolados de *C. parapsilosis* ES e ER, frente a agentes antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, fluocitosina e voriconazol), e frente a combinações entre estes fármacos, bem como avaliar as propriedades antifúngicas do disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e do ebselen. Adicionalmente, foram verificados os níveis de expressão dos genes *FKS* para *C. parapsilosis* ES e ER. A avaliação dos testes de suscetibilidade *in vitro* com base nos protocolos M27-A3 e M27-S4 do CLSI evidenciou que todas as cepas *C. parapsilosis* ES e ER foram sensíveis à anfotericina B. As cepas ES não apresentaram resistência aos agentes antifúngicos testados, enquanto que as taxas de resistência ao fluconazol, voriconazol e flucitosina foram de 73,3%; 43,3% e 20% para as cepas ER, respectivamente. Ademais, a exposição de *C. parapsilosis* às equinocandinas gerou resistência cruzada e resistência *in vitro* aos azóis e flucitosina. As associações entre anfotericina B, flucitosina, fluconazol e voriconazol foram avaliadas pelo método de microdiluição *checkerboard* e demonstraram que para ambos os grupos *C. parapsilosis* ES e ER, as interações tiveram como principal atividade a indiferença, sendo que em muitos casos a alta porcentagem de antagonismo foi evidenciada para cepas ER. Através do teste de suscetibilidade baseado no protocolo M27-A3 do CLSI, pode-se observar que o (PhSe)<sub>2</sub> e o ebselen apresentaram atividade antifúngica *in vitro* frente a *C. parapsilosis* ES, com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 1-8µg/mL e 0,25-4µg/mL, respectivamente. Entretanto, o ebselen apresentou a melhor atividade antifúngica frente às cepas ER, com CIM variando de 0,06-4µg/mL. Adicionalmente, a verificação dos níveis de expressão dos genes *FKS* pela técnica de PCR em tempo real demonstrou que a emergência de resistência as equinocandinas modifica os níveis de expressão do gene *FKS* em *C. parapsilosis* ER. Neste contexto, a exposição *in vitro* a concentrações crescentes de equinocandinas é um fator importante para a emergência de resistência em *C. parapsilosis*, fenômeno este, que agrega consequências para o perfil de suscetibilidade desta espécie.

**Palavras chave:** *Candida parapsilosis*. Suscetibilidade. Associações. Equinocandinas. Resistência antifúngica.





## ABSTRACT

### ***Candida parapsilosis*: ECHINOCANDIN RESISTANCE AND ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY ALONE AND IN COMBINATION**

AUTHOR: Francieli Chassot

ADVISOR: Sydney Hartz Alves

CO-ADVISOR: Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

*Candida parapsilosis* is a yeast fungus that causes a wide spectrum of infections predominantly in immunocompromised patients and representing a major cause of infections related to health care. The emergence of resistance of this species to echinocandins requires the search for new therapeutic options. In this context, this thesis aimed the exposure *in vitro* to increasing concentrations of echinocandins in *C. parapsilosis* echinocandin-susceptible (ES) to obtain *C. parapsilosis* echinocandin-resistant (ER) to then, evaluate the susceptibility *in vitro* of different strains of *C. parapsilosis* ES and ER, against antifungal agents (amphotericin B, fluconazole, flucytosine and voriconazole) and against the combinations between these drugs, as well as evaluate the antifungal properties of diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub> and the ebselen. Additionally, the expression levels of the *FKS* gene for *C. parapsilosis* ES and ER were checked. The evaluation of *in vitro* susceptibility tests based on protocols M27-A3 and M27-S4 of CLSI showed that all strains *C. parapsilosis* ES and ER were susceptible to amphotericin B. The strains ES showed no resistance to antifungal agents tested and the rates of resistance to fluconazole, voriconazole and flucytosine were 73.3%; 43.3% and 20% for strains ER, respectively. Furthermore, exposure of *C. parapsilosis* to echinocandins generated cross-resistance and resistance *in vitro* to azoles and flucytosine. Associations between amphotericin B, flucytosine, fluconazole and voriconazole were assessed by microdilution checkerboard method and demonstrated that for *C. parapsilosis* ES and ER groups, the main interaction was the indifferent activity and, in many cases the high percentage of antagonism was observed for ER strains. Through susceptibility testing based on the protocol CLSI M27-A3, can be observed that the (PhSe)<sub>2</sub> and ebselen exhibited antifungal activity *in vitro* against *C. parapsilosis* ES, with minimal inhibitory concentration (MIC) ranging from 1-8µg/mL and 0.25-4µg/mL, respectively. However, ebselen showed the best antifungal activity against the strains ER, with MICs ranging from 0.06-4µg/mL. Additionally, the verification of the gene expression levels *FKS* by Real Time PCR demonstrated that the emergence of resistance to echinocandins modifies the expression levels of the *FKS* gene in *C. parapsilosis* ER. In this context, exposure *in vitro* to increasing concentrations of echinocandins is an important factor for the emergence of resistance in *C. parapsilosis*, a phenomenon that brings consequences for the susceptibility profile of this species.

**Keywords:** *Candida parapsilosis*. Susceptibility. Associations. Echinocandins. Antifungal resistance.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### APRESENTAÇÃO

Figura 1 – Estrutura química da anfotericina B .....	27
Figura 2 – Mecanismo de ação da anfotericina B .....	28
Figura 3 – Mecanismo de ação dos azólicos .....	29
Figura 4 – Estruturas químicas do fluconazol e voriconazol.....	30
Figura 5 – Estrutura química da flucitosina.....	31
Figura 6 – Mecanismo de ação da flucitosina .....	31
Figura 7 –Estruturas químicas das equinocandinas.....	32
Figura 8 – Mecanismo de ação das equinocandinas.....	34
Figura 9 –Estrutura química do disseleneto de difenila .....	36
Figura 10 –Estrutura química do ebselen .....	38
Figura 11 –Eletroforese em gel de agarose de produtos da PCR para caracterização de <i>C. parapsilosis</i> .....	49
Figura 12 –Processo de indução de resistência as equinocandinas .....	50
Quadro 1 –Faixa de concentração testada para cada agente antifúngico .....	52
Figura 13 –Representação esquemática de uma placa de microdiluição utilizada para determinação das concentrações inibitórias mínimas.....	53
Quadro 2 – <i>Breakpoints</i> para interpretação dos testes de suscetibilidade de <i>C. parapsilosis</i> frente aos antifúngicos testados, conforme documentos M27-A3 (CLSI, 2008) e M27-S4 (CLSI, 2012).....	54
Quadro 3 –Combinações entre os agentes antifúngicos .....	54
Figura 14 –Representação esquemática de uma placa de microdiluição utilizada para avaliação das combinações de antifúngicos <i>in vitro</i> pelo método <i>checkerboard</i> .....	55
Quadro 4 – <i>Primers</i> usados para análise da expressão dos genes <i>FKS1</i> , <i>FKS2</i> e <i>FKS3</i> pela q-PCR.....	57
<b>MANUSCRITO 3</b>	
Figura 1 – Expressão dos genes <i>FKS</i> em <i>C. parapsilosis</i> equinocandina-resistente.....	108



## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1 – <i>In vitro</i> susceptibility of 30 clinical isolates of <i>Candida parapsilosis</i> before and after exposure to echinocandins .....	63
Tabela 2 – Cross-resistance to echinocandins for anidulafungin-, caspofungin-, and micafungin-resistant groups of <i>C. parapsilosis</i> .....	63
Tabela 3 – Comparison of the susceptibility of <i>C. parapsilosis</i> susceptible and resistant to antifungal agents .....	64

### MANUSCRITO 1

Tabela 1 – <i>In vitro</i> susceptibility ( $\mu\text{g/mL}$ ) of echinocandin-susceptible and echinocandin-resistant <i>C. parapsilosis</i> strains to amphotericin B (AMB), flucytosine (5FC), fluconazole (FLZ) and voriconazole (VCZ) .....	81
Tabela 2 – <i>In vitro</i> antifungal interactions of amphotericin B (AMB), flucytosine (5FC), fluconazole (FLZ) and voriconazole (VCZ) against echinocandin-susceptible and echinocandin-resistant <i>C. parapsilosis</i> strains .....	82

### MANUSCRITO 2

Tabela 1 – Susceptibility ( $\mu\text{g/mL}$ ) <i>in vitro</i> of echinocandin-susceptible and –resistant strains of <i>Candida parapsilosis</i> to diphenyl diselenide and ebselen .....	93
---	----

### MANUSCRITO 3

Tabela 1 – Primers used for the real-time PCR analysis of <i>FKS1</i> , <i>FKS2</i> , and <i>FKS3</i> gene expression .....	105
Tabela 2 – Susceptibility ( $\mu\text{g/mL}$ ) of <i>Candida parapsilosis</i> strains to echinocandin before and after the induction of echinocandin resistance .....	106
Tabela 3 – Relative expression ratios between <i>FKS</i> genes of <i>C. parapsilosis</i> .....	107



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ES	equinocandina-sensíveis
ER	equinocandina- resistentes
(PhSe) <sub>2</sub>	difenil disseleneto
(CLSI)	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CIM	concentração inibitória mínima
PCR	reação em cadeia da polimerase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
5FC	flucitosina
5-FU	5-fluoruracil
5-FUMP	monofosfato de 5-fluoruracil ribose
UPRTase	enzima fosforribosil transferase
5-FdUMP	5-fluoro-2-desoxiuridina-5-monofosfato
CIM <sub>90</sub>	concentração inibitória mínima para 90% das cepas.
CIM <sub>50</sub>	concentração inibitória mínima para 50% das cepas
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria
C <sub>máx</sub>	concentração plasmática máxima
OS	organocomposto de selênio
ROS	espécie reativa de oxigênio
GSH	glutathiona
GSH-Px	glutathiona peroxidase
FUR1	<i>5-fluorouridine resistant</i>
FKS	glucana sintase
ANF-R	anidulafungina-resistente
CSF-R	casposfungina-resistente
MCF-R	micafungina-resistente
CSD	caldo Sabouraud dextrose
PCR-RFLP	<i>polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorfism</i>
ITS	espaçador transcrito interno
SADH	<i>secondary alcohol dehydrogenase-encoding gene</i>
ASD	ágar Sabouraud dextrose
DMSO	dimetilsulfóxido
MOPS	ácido morfolino propanossulfônico
CIF	concentração inibitória fracionária
CIFI	índice de concentração inibitória fracionária
ANF-S	anidulafungina-sensível
CSF-S	casposfungina-sensível
MCF-S	micafungina-sensível
q-PCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
IC	candidíase invasiva
ANF	anidulafungina
CSF	casposfungina
MCF	micafungina
SDB	caldo Sabouraud glicose
pb	pares de base
ANF-AE	anidulafungina-após exposição
CSF-AE	casposfungina-após exposição
MCF-AE	micafungina-após exposição
GM	média geométrica



AR	anidulafungina-resistente
CR	caspofungina-resistente
MR	micalfungina-resistente
AMB	anfotericina B
FLZ	fluconazol
VCZ	voriconazol

## SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO .....	21
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	23
1.2.1 O gênero <i>Candida</i> .....	23
1.2.2 Manifestações clínicas e fatores de risco.....	24
1.2.3 <i>Candida parapsilosis</i> .....	24
1.2.4 Tratamento das candidíases .....	26
1.2.4 Agentes antifúngicos.....	27
1.2.5.1 Derivados poliênicos .....	27
1.2.5.2 Derivados azólicos .....	29
1.2.5.3 Análogos da pirimidina: flucitosina .....	30
1.2.5.4 Equinocandinas .....	32
1.2.6 Disseleneto de difenila .....	36
1.2.7 Ebselen.....	37
1.2.8 Resistência aos antifúngicos.....	39
1.2.8.1 Resistência aos poliênicos .....	39
1.2.8.2 Resistência aos azólicos .....	40
1.2.8.3 Resistência à flucitosina .....	41
1.2.8.4 Resistência às equinocandinas .....	41
1.2.8.4.1 Mecanismo de resistência <i>FKS</i> .....	43
1.2.9 Combinação entre antifúngicos.....	44
1.3 PROPOSIÇÃO .....	46
1.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
1.4.1 Micro-organismos.....	47
1.4.1.1 Identificação molecular.....	47
1.4.2 Indução de resistência às equinocandinas.....	49
1.4.3 Agentes antifúngicos.....	51
1.4.4 Testes de Suscetibilidade <i>in vitro</i> .....	51
1.4.4.1 Preparação do inóculo .....	52
1.4.4.2 Determinação das concentrações inibitórias mínimas ( <i>CIMs</i> ).....	52
1.4.5 Atividade <i>in vitro</i> das combinações entre agentes antifúngicos.....	54
1.4.5.1 Avaliação das combinações .....	55
1.4.6 Análise da Expressão do gene <i>FKS</i> de <i>C. parapsilosis</i> .....	56
1.4.6.1 Extração do RNA e síntese do cDNA.....	56
1.4.6.2 Detecção dos genes <i>FKS1</i> , <i>FKS2</i> e <i>FKS3</i> .....	56
1.4.6.3 Eficiência dos primers .....	58
1.4.6.4 Expressão dos genes <i>FKS</i> .....	58
2. ARTIGO 1 – EXPLORING THE <i>in vitro</i> RESISTANCE OF <i>Candida parapsilosis</i> TO ECHINOCANDINS .....	59
3. MANUSCRITO 1 – THE ACTIVITY OF ANTIFUNGAL AGENTS ALONE AND IN COMBINATION AGAINST <i>Candida parapsilosis</i> STRAINS SUSCEPTIBLE AND RESISTANT TO ECHINOCANDINS.....	68
4. MANUSCRITO 2 – ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF DIPHENYL DISELENIDE AND EBSELEN AGAINST ECHINOCANDIN-SUSCEPTIBLE AND –RESISTANT STRAINS OF <i>Candida parapsilosis</i> .....	83
5. MANUSCRITO 3 – <i>Candida. parapsilosis</i> THE IMPACT OF RESISTANCE TO ECHINOCANDINS ON THE EXPRESSION OF <i>FKS</i> GENES .....	94
6 DISCUSSÃO .....	109
7 CONCLUSÃO.....	113

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>114</b>
<b>ANEXO A – CARTA DE PERMISSÃO ARTIGO 1 .....</b>	<b>137</b>
<b>ANEXO B – SUBMISSÃO DO MANSUCRITO 1.....</b>	<b>139</b>
<b>ANEXO C – SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 2 .....</b>	<b>140</b>

## 1 APRESENTAÇÃO

A incidência de candidemias tem aumentado no mundo todo nos últimos anos e está associada a elevadas taxas de morbidade e mortalidade, especialmente entre pacientes imunossuprimidos (PFALLER et al., 2007a, 2010b; PERLIN, 2015b). Atualmente, uma grande proporção destas infecções deve-se a *Candida não-albicans*, sendo que *Candida parapsilosis* ocupa o segundo lugar entre as espécies de *Candida* mais isoladas de hemoculturas na Ásia, América Latina e alguns países europeus (PEMAN et al., 2005; ALMIRANTE et al., 2006; PFALLER et al., 2007a; COSTA-DE-OLIVEIRA et al., 2008; PEMAN et al., 2011b) e de candidemias em crianças (KRCMERY et al., 2002; ZAOUTIS et al., 2005; BLYTH et al., 2009; ARENDRUP et al., 2011).

Estudos multicêntricos envolvendo a suscetibilidade do gênero *Candida* aos antifúngicos de uso sistêmico têm definido características marcantes como a resistência primária de *C. krusei* aos azólicos, o rápido desenvolvimento da resistência de *C. glabrata* e *C. dubliniensis* ao fluconazol, e resistência cruzada ao itraconazol e voriconazol, o que inutiliza a classe dos azólicos frente a algumas situações críticas (PFALLER et al., 2007a; PFALLER et al., 2010a).

Os antifúngicos da classe das equinocandinas - anidulafungina, caspofungina e micafungina - foram licenciados para o tratamento das candidíases invasivas (BRIELMAIER et al., 2008). O mecanismo de ação ocorre por inibição da enzima  $\beta$ -1,3-D-glucana-sintase, o que determina dificuldades na síntese da parede fúngica, comprometendo a viabilidade do micro-organismo (MESSER et al., 2009). Tal mecanismo permite a atividade das equinocandinas mesmo sobre *Candida* spp resistentes aos antifúngicos azólicos. A utilização recente das equinocandinas já permitiu a detecção de espécies de *Candida* resistentes a estes agentes, sobretudo *C. glabrata*. Todavia, frente às demais espécies de *Candida*, o perfil de suscetibilidade às equinocandinas requer investigações. Na América Latina, principalmente no Brasil, *C. parapsilosis* desponta como a segunda espécie mais isolada de episódios de candidemia (NUCCI et al., 2013; DOI et al., 2016). Esse fato determina que estudos voltados a suscetibilidade desta espécie frente aos antimicóticos mais modernos, como as equinocandinas, sejam melhor avaliados.

Com este propósito, é pertinente avaliar se a resistência de *C. parapsilosis* as equinocandinas é cruzada e qual o perfil de suscetibilidade dos isolados equinocandina-

resistentes frente aos demais antifúngicos. Estudos neste sentido ainda não foram desenvolvidos.

Apesar do desenvolvimento de novos agentes antifúngicos com diferentes mecanismos de ação, o aumento da incidência de micoses sistêmicas sem resposta satisfatória é preocupante. Este fato tem determinado significativo interesse pelas associações entre agentes antifúngicos (JOHNSON et al., 2004). A obtenção de sinergismo é a principal justificativa para a terapia de combinação, uma vez que permite a redução das doses de medicamentos, reduz sua toxicidade, amplia a cobertura antifúngica em pacientes gravemente doentes. Ao mesmo tempo, em que combate o aparecimento de mutantes resistentes (VAZQUEZ, 2003).

Neste contexto, em decorrência das altas taxas de mortalidade causadas pelas candidemias tratadas com monoterapia e da menor sensibilidade natural de *C. parapsilosis* frente às equinocandinas, novas estratégias como a combinação *in vitro* entre antifúngicos, merecem ser estudadas frente a esta espécie, seja em seu estado natural, seja após a indução da resistência as equinocandinas.

Além disso, a busca de novos agentes antifúngicos continua sendo um assunto relevante e digno de investigação, uma vez que são poucas as classes de agentes antifúngicos disponíveis para tratar doenças fúngicas invasivas. Este problema é agravado pelas diversas limitações farmacológicas e pelo desenvolvimento de resistência antifúngica. Desta forma, considerando que o disseleneto de difenila (ROSA et al., 2007) e o ebselen (SOTEROPOULOS et al., 2000; AZAD et al., 2014) apresentam inúmeras propriedades farmacológicas, estudos focados na avaliação do perfil de suscetibilidade de *C. parapsilosis* equinocandina-sensível e equinocandina-resistente para disseleneto de difenila e ebselen, são também pertinentes e atuais, sobretudo envolvendo isolados equinocandina-resistentes.

## 1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.2.1 O gênero *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Classe *Saccharomycetes*, Ordem *Saccharomycetales* e Família *Saccharomycetaceae* (GUARRO et al., 1999). Um estudo recente realizado em 183 centros médicos dos Estados Unidos mostrou que *Candida* é classificada como a causa mais comum de infecções da corrente sanguínea (MAGILL et al., 2014). No Brasil, é o sétimo agente mais prevalente em infecções da corrente sanguínea (DOI et al., 2016). Atualmente, há mais de 200 espécies de *Candida* descritas. Destas, cerca de 17 são conhecidas por ocasionar micoses superficiais ou invasivas em seres humanos (SARDI et al., 2013).

Embora *C. albicans* seja a espécie mais frequentemente isolada de amostras clínicas, durante as últimas décadas houve um aumento significativo nas espécies não-*albicans*, entre elas, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata* (BASSETTI et al., 2006; TAMURA et al., 2007; CHAKRABARTI et al., 2009; ORTEGA et al., 2011; AL-RAWAHI et al., 2013; GUINEA et al., 2014; CAGGIANO et al., 2015). A distribuição das espécies de *Candida* recuperadas de hemoculturas muda geograficamente. No que diz respeito à *C. parapsilosis*, é relatada como a segunda espécie de *Candida* mais comumente isolada na América Latina e na Europa. Na América do Norte, *C. glabrata* é a segunda espécie mais isolada (PFALLER et al., 2006; PEMAN et al., 2011a; NUCCI et al., 2013; DOI et al., 2016). *C. parapsilosis* é responsável por mais de um quarto de todas as infecções fúngicas invasivas em recém-nascidos com baixo peso no Reino Unido (CLERIHEW et al., 2007) e América do Norte (BENJAMIN et al., 2003; SMITH et al., 2005).

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância, pela alta frequência com que infectam e colonizam o hospedeiro humano. As espécies de *Candida* residem como comensais, fazendo parte da microbiota normal dos indivíduos saudáveis. Todavia, quando há um desbalanço da microbiota ou o sistema imune do hospedeiro encontra-se comprometido, esses micro-organismos tendem a manifestações agressivas, tornando-se patogênicos (COLOMBO et al., 2003). As candidíases ou candidoses são infecções provocadas por leveduras do gênero *Candida*, e envolvem um amplo espectro de doenças superficiais e invasivas oportunistas, acometendo pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco (BOUZA et al., 2008).

Em hospitais, o gênero *Candida* responde por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas, representando um grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades, devido às dificuldades diagnósticas, terapêuticas e altas taxas de mortalidade que estas infecções representam (COLOMBO et al., 2003; COLOMBO et al., 2006).

### **1.2.2 Manifestações clínicas e fatores de risco**

As manifestações clínicas das candidíases são extremamente variáveis, atingem a superfície cutânea ou membranas mucosas, resultando em: candidíase oral, candidíase vaginal, intertriginosa, paroníquia e onicomicose. Podem ocorrer também, nas formas sistêmicas, como sepse, endocardite e meningite (FLEVARI et al., 2013).

Vários fatores favorecem o desenvolvimento de infecções por *Candida*, dentre os quais é possível destacar: o rompimento das barreiras cutânea e mucosa, disfunção dos neutrófilos, defeito da imunidade mediada por células, desordem metabólica, exposição direta aos fungos, extremos de idade, desnutrição aguda, tratamento prolongado com antimicrobianos, quimioterapia, transplantes e resistência a antifúngicos (PFALLER et al., 2007a).

Além disso, infecções por *Candida* são comumente observadas em pacientes que fazem uso de cateter, devido à formação de biofilme, que permite a multiplicação do fungo, facilitando a penetração e invasão tecidual (SENEVIRATNE et al., 2008). Os riscos para adquirir infecções relacionadas ao uso de cateter dependem do tipo de paciente e localização deste dispositivo. Infecções relacionadas ao uso de cateter venoso central podem estar relacionadas a cinco mecanismos: contaminação no local da inserção devido à falta de assepsia; migração de microorganismos da pele na superfície externa do cateter; contaminação do centro do cateter por fontes endógenas e exógenas que passaram através do lúmen, infusão contaminada e disseminação hematogênica de infecção por *Candida* (BOUZA et al., 2002; O'GRADY et al., 2011).

### **1.2.3 *Candida parapsilosis***

A *C. parapsilosis* é um micro-organismo comensal do homem, caracterizado por apresentar diversos fatores de virulência, entre eles, a capacidade de adesão às células dos hospedeiros, a produção de enzimas hidrolíticas (lipases, proteases) e a formação de

biofilmes (CLARK et al., 2004; RAMAGE et al., 2006). A incidência de *C. parapsilosis* tem aumentado expressivamente, demonstrando ser, em muitos estudos, a segunda espécie de *Candida* mais comumente isolada de culturas de sangue (RODERO et al., 2005; ALMIRANTE et al., 2006; BRITO et al., 2006; FRIDKIN et al., 2006; MAGANTI et al., 2011; MIRANDA et al., 2012). Recentemente, emergiu como um importante patógeno nosocomial causando candidíase invasiva em pacientes hospitalizados em estado crítico, neonatos de baixo peso, crianças, indivíduos imunocomprometidos, transplantados e pacientes que recebem nutrição parenteral (TROFA et al., 2008; DOTIS et al., 2012; JUYAL et al., 2013; OESER et al., 2014). Atualmente, WANG et al. (2016) revelaram um aumento súbito na proporção de 47,9% de *C. parapsilosis* isolada de pacientes com candidemia em um hospital na China. TRABASSO et al. (2015) também descreveram altas taxas de isolamento de *C. parapsilosis* perfazendo uma média anual de oito casos por ano em um hospital no Brasil, sendo que a mortalidade geral foi de 47,2%. Sua transmissão é, usualmente, pelo contato com as mãos dos profissionais da área da saúde, fluidos, aparelhos e dispositivos médicos como cateteres, próteses e outros implantes (BONASSOLI et al., 2005; VAN ASBECK et al., 2007).

Desde sua descoberta, a *C. parapsilosis* sofreu várias alterações em sua classificação filogenética. Foi isolada pela primeira vez a partir das fezes de um paciente com diarreia em Porto Rico, tendo sido classificada por *Monilia parapsilosis* (ASHFORD, 1928). Somente em 1932 a espécie foi reclassificada como *C. parapsilosis* (LANGERON et al., 1932). Alguns anos mais tarde, *C. parapsilosis* foi separada em três grupos: grupo I, II e III. No entanto, alguns estudos genéticos revelaram que a extensão das diferenças entre os subgrupos de *C. parapsilosis* era suficiente para sua designação em espécies distintas (CASSONE et al., 1995; LIN et al., 1995; ROY et al., 1998; KATO et al., 2001).

Assim, estudos genéticos revelaram diferenças suficientes que levaram à separação dos grupos em três espécies distintas relacionadas: *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. methapsilosis*. Apesar destas espécies, apresentarem características fenotípicas e bioquímicas idênticas, a sua reclassificação ocorreu após o sequenciamento de frações dos seus genomas, a qual demonstrou a existência de diferenças significativas (TAVANTI et al., 2005). Ainda que as três espécies sejam capazes de causar doenças graves, com diversas manifestações clínicas, incluindo



fungemia (LOCKHART et al., 2008), *C. parapsilosis* é a mais isolada de infecções hospitalares (TAVANTI et al., 2005; TRABASSO et al., 2015; LOVERO et al., 2016).

Vários estudos epidemiológicos indicam que a maioria das infecções causadas pelo complexo *C. parapsilosis* são causadas por isolados *C. parapsilosis stricto sensu*, e que *C. orthopsilosis* é responsável por cerca de 1-10% dos casos, dependendo da região geográfica (LOCKHART et al., 2008). No entanto, *C. orthopsilosis* é mais frequentemente identificada do que *C. metapsilosis* (BONFIETTI et al., 2012; RICCOMBENI et al., 2012), embora ambas as espécies, estejam associadas com vários focos de infecção (LOCKHART et al., 2008; GE et al., 2012; TAJ-ALDEEN et al., 2014).

Além disso, embora intimamente relacionados, os membros do complexo *C. parapsilosis* diferem uns dos outros em relação à sua virulência e suscetibilidade às equinocandinas. Modelos de infecção *in vitro* sugerem que *C. metapsilosis* é a espécie menos virulenta (ORSI et al., 2010; NEMETH et al., 2013), e isto vai ao encontro com a sua baixa relevância clínica em comparação com *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* (BORGHI et al., 2011; GARCIA-EFFRON et al., 2012). Ainda, dados da suscetibilidade *in vitro* à anidulafungina, caspofungina e micafungina, indicam que *C. parapsilosis* é menos sensível que *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* (GOMEZ-LOPEZ et al., 2008; CANTON et al., 2011).

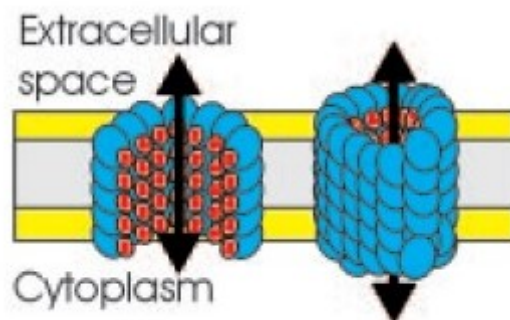
#### 1.2.4 Tratamento das candidíases

A utilização rápida e específica de terapia antifúngica é altamente eficaz e importante. Em se tratando de candidíases superficiais e mucosas em pacientes imunocompetentes, os tratamentos recomendados são à base de antifúngicos tópicos associados ou não a antifúngicos sistêmicos. Ademais, para candidíases invasivas em pacientes imunocomprometidos, onde as candidemias representam a manifestação mais frequente, o tratamento é à base de equinocandinas (FERNANDEZ-RUIZ et al., 2014b).

Atualmente, não há consenso sobre o tratamento das infecções fúngicas causadas por *C. parapsilosis*, embora a abordagem terapêutica geralmente inclua a identificação do isolado e a administração de um antifúngico sistêmico (FERNANDEZ-RUIZ et al., 2014b).



Figura 2 – Mecanismo de ação da anfotericina B.



Poros/canal formado pela anfotericina B resulta em morte celular.  
Fonte: MUKHERJEE et al. (2005).

A anfotericina B foi introduzida em meados da década 1950 (OURA et al., 1955) como primeiro agente antifúngico para micoses sistêmicas (JOHNSON et al., 2007) e em 1965 foi o primeiro agente antifúngico a ser aprovado pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) (WU, 1994; DISMUKES, 2000). Trata-se de um antifúngico poliênico de amplo espectro, ativo sobre várias micoses como candidíases, aspergilose, blastomicose, coccidioidomicose, criptococose, histoplasmose, paracoccidioidomicose, esporotricose e zigomicose. A anfotericina B não é absorvida por via oral ou intramuscular, requerendo, portanto, administração intravenosa, intratecal ou através da rota inalatória (GUBBINS et al., 2002).

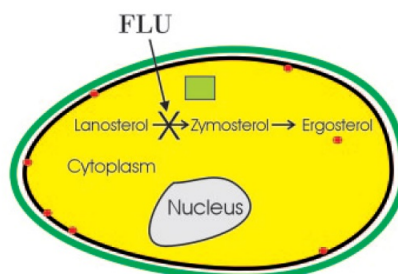
Além disso, a anfotericina B na sua forma pura é pouco solúvel em soluções aquosas a um pH fisiológico, o que requer complexação com outro agente para sua administração clínica como por exemplo o desoxicolato de sódio. Seu uso tem sido limitado devido aos efeitos colaterais, como nefrotoxicidade e devido à limitação na sua administração, a qual deve ser feita por via endovenosa (NENOFF et al., 1999).

Atualmente, existem três derivados lipídicos da anfotericina B: complexo lipídico de anfotericina B, anfotericina B de dispersão coloidal e anfotericina B lipossomal, os quais foram desenvolvidos para limitar a toxicidade, especialmente injúria renal. As três formulações apresentam boa atividade fungicida, sem diferença na eficácia (CARRILLO-MUNOZ et al., 2006; DENNING et al., 2010; FLEVARI et al., 2013).

### 1.2.5.2 Derivados azólicos

Os azólicos são compostos de três grupamentos amina, os quais atuam na inibição da síntese do ergosterol (Figura 3), um importante componente da membrana plasmática dos fungos. Bloqueiam a enzima 14- $\alpha$ -demetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica, impedindo a demetilação do precursor lanosterol em ergosterol, o principal componente esterol da membrana da célula fúngica (GEORGOPAPADAKOU et al., 1996; ANTACHOPOULOS et al., 2005). Os triazólicos representam um novo grupo de azólicos com grande eficiência e baixa toxicidade. Estes antifúngicos possuem alta afinidade pelo citocromo P450 fúngico, não apresentando afinidade pelo citocromo P450 dos mamíferos (SPINOSA et al., 2002). Os antifúngicos triazólicos são considerados muito efetivos para o tratamento de candidíases e são menos tóxicos que a anfotericina B, podendo ser administrados por via oral (PAPPAS et al., 2009).

Figura 3 – Mecanismo de ação dos azólicos



O fluconazol inibe a biossíntese do ergosterol, resultando em depleção deste esterol na membrana celular fúngica.

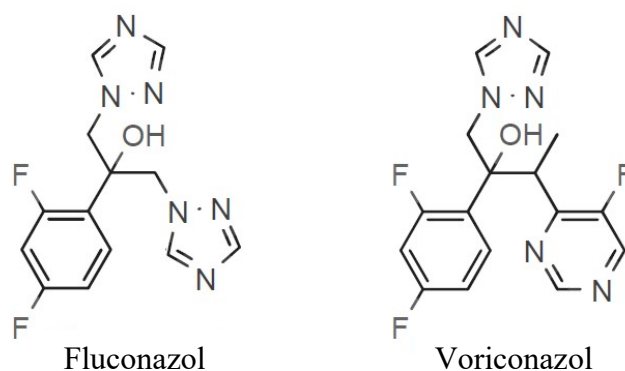
Fonte: MUKHERJEE et al. (2005).

O fluconazol (Figura 4) é um fármaco fungistático pertencente ao grupo dos triazóis. Trata-se de um antifúngico, altamente solúvel em água e pode ser administrado por via parenteral em pacientes graves. Não é alterado por mudanças na acidez gástrica e possui baixo risco de hepatotoxicidade. Apresenta boa penetrabilidade no fluido cerebrospinal, alcançando níveis sanguíneos de quase 80%. Devido à sua menor toxicidade, este antifúngico é mais frequentemente administrado como alternativa à

anfotericina B (PATTON et al., 2001; MAERTENS, 2004). O fluconazol é geralmente efetivo contra candidemia, mas o seu uso pode ser limitado pela prevalência de isolados com aquisição ou resistência intrínseca (PAPPAS et al., 2009).

O voriconazol (Figura 4) possui espectro antifúngico expandido, atuando contra várias espécies de leveduras, incluindo *C. albicans* e não-*albicans*, além de ser ativo em fungos filamentosos como *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. (BADEN et al., 2003; PERFECT et al., 2003). O voriconazol é muito utilizado em casos de infecção disseminada causada por espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol, entretanto, o seu custo faz com que seu uso ainda seja muito limitado (DENNING et al., 2010).

Figura 4 – Estruturas químicas do fluconazol e voriconazol

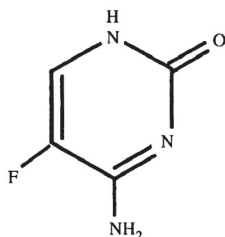


Fonte: COSTE et al. (2015).

#### 1.2.5.3 Análogos da pirimidina: flucitosina

A flucitosina (5FC) (Figura 5) tem sido utilizada para o tratamento de candidemia e outras micoses invasivas desde 1968 (TASSEL et al., 1968). É um agente antifúngico sintético do tipo antimetabólito, ativo contra uma gama limitada de infecções fúngicas sistêmicas, sendo principalmente eficaz nas infecções causadas por leveduras. Quando administrada isoladamente, é comum o desenvolvimento de resistência, por isso costuma ser usada em combinação com outros antifúngicos, como anfotericina B ou azólicos (CARRILLO-MUNOZ et al., 2006; DENNING et al., 2010; GOPINATHAN et al., 2013).

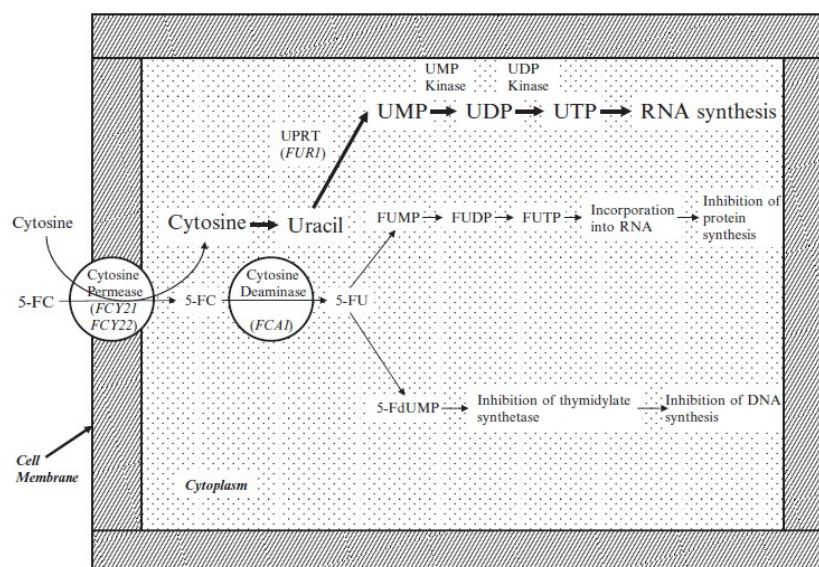
Figura 5 – Estrutura química da flucitosina



Fonte: MAYERS (2009).

Trata-se quimicamente de uma pirimidina fluorada, a qual dentro das células fúngicas sofre uma desaminação, responsável por sua ativação, transformando-se em 5-fluoruracil (5-FU) a partir da ação da citosina desaminase. A fluoruracil é inicialmente metabolizada a monofosfato de 5-fluoruracil ribose (5-FUMP) pela enzima fosforribosil transferase (UPRTase). A 5-FUMP é em seguida incorporada ao RNA ou metabolizada a 5-fluoro-2-desoxiuridina-5-monofosfato (5-FdUMP). Como resultado dessa reação, ocorre inibição da síntese proteica fúngica substituindo, no RNA, a uracila pelo 5-FU e comprometimento da síntese do DNA fúngico durante a replicação do DNA (Figura 6). A 5FC pode ser administrada por via oral ou intravenosa e exibe alta atividade frente a *C. parapsilosis*, com concentração inibitória mínima para 90% das cepas (CIM<sub>90</sub>) de 0,25 µg/mL (PFALLER et al., 2002).

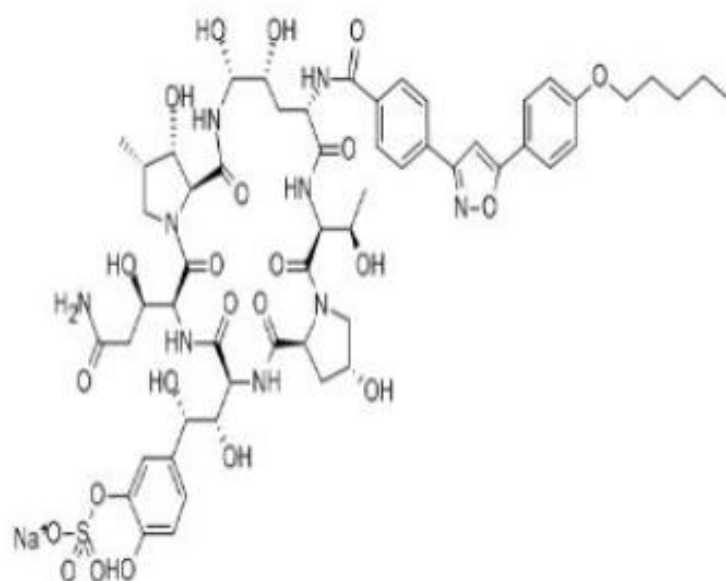
Figura 6 – Mecanismo de ação da flucitosina.



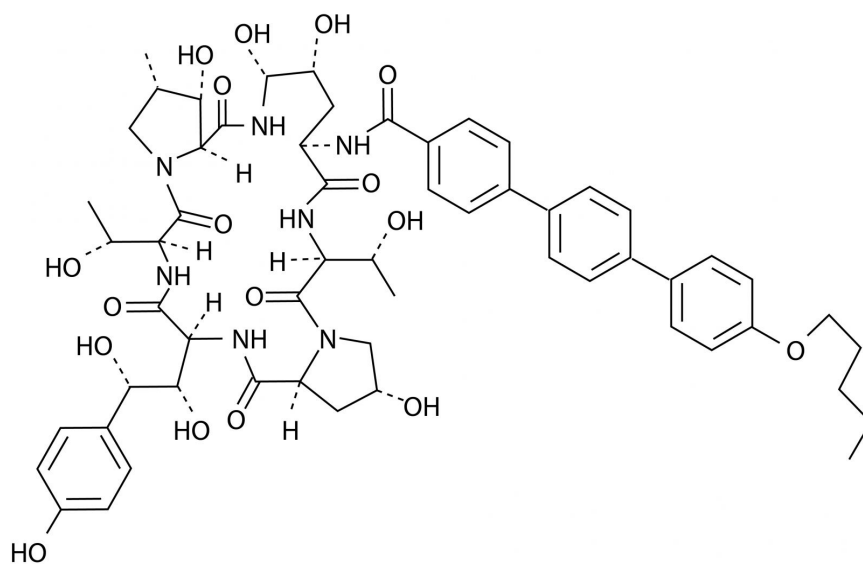
Fonte: MAYERS (2009).



## Micafungina



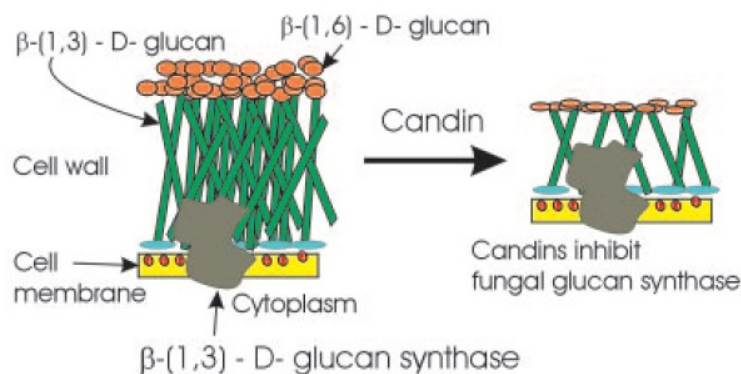
## Anidulafungina



Fonte: KOFLA et al. (2011).



Figura 8 – Mecanismo de ação das equinocandinas.



As equinocandinas inibem a síntese da  $\beta$ -1,3-D-glucana, comprometendo desta forma a integridade da parede celular da célula fúngica.

Fonte: MUKHERJEE et al. (2005).

A toxicidade deste grupo de antifúngicos é limitada. Possuem um amplo espectro de atividade fungicida contra espécies de *Candida* azóis-resistentes tornando-os a terapia de escolha para muitas formas de candidíase invasiva, principalmente em pacientes oncológicos (PAPPAS et al., 2009; KULLBERG et al., 2011; CORNELLY et al., 2012).

A caspofungina emergiu como a primeira equinocandina a ser comercializada no Brasil no ano de 2000. Possui ação fungicida e demonstrou ser tão eficaz quanto, e menos tóxica do que, anfotericina B no tratamento de doença invasiva causada por *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica* e *C. rugosa* (MORA-DUARTE et al., 2002; SPELLBERG et al., 2006), incluindo amostras resistentes ao fluconazol e à anfotericina B. DEORUKHKAR et al. (2016) descreveram a atividade positiva da caspofungina frente a espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol.

Metabolizada por hidrólise hepática e N-acetilação, seus metabólitos inativos são eliminados pela urina. Assim, a disfunção hepática severa, deve ser considerada para diminuição da dose de caspofungina durante o tratamento. A caspofungina possui interação com agentes que são metabolizados pelo sistema citocromo P450 e, seu nível sérico é reduzido na presença de rifampicina (ASHLEY et al., 2006).

A anidulafungina foi introduzida no Brasil no ano de 2009, como um antifúngico para o tratamento de candidíase invasiva em doentes adultos não-neutropênicos. Apresenta atividade antifúngica *in vitro* contra uma ampla gama de espécies de *Candida*, incluindo *C. krusei* e *C. glabrata*, as quais possuem resistência inata ou induzida aos azólicos, ou *C. lusitaniae* que é pouco sensível à anfotericina B.

A via de eliminação da anidulafungina é representada por uma lenta degradação química no sangue sem metabolismo hepático ou depuração renal (DOWELL et al., 2004). Esta é uma diferença fundamental das outras moléculas da mesma classe. Possui uma meia-vida longa, o que permite uma única administração diária e também possui perfil farmacocinético linear proporcional à dose. Não necessita de ajuste de dosagem para pacientes com função renal e hepática reduzida (DOWELL et al., 2005).

Em 2010, no Brasil, a micafungina foi aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Indicada para tratamento de candidíase invasiva, profilaxia em indivíduos submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas, tratamento de infecções por *Aspergillus* e terapia empírica de febre neutropênica para adultos e crianças (BORMANN et al., 2009). A micafungina apresenta atividade fungicida contra a maioria das espécies *Candida*. Metabolizada no fígado via citocromo P450 e excretada como metabólito inativo pela bile e urina (<1 %). O percentual da forma não metabolizada eliminada nas fezes e na urina é de 43,8 e 7,4%, respectivamente. Em idosos não há alteração no padrão farmacocinético. Em pacientes com insuficiência hepática, não há alteração na concentração plasmática máxima (C<sub>máx</sub>) tão pouco na sua depuração. A insuficiência renal grave não afeta a farmacocinética da micafungina, não sendo necessário o ajuste de dose (NISHIYAMA et al., 2002).

A combinação das equinocandinas com outros agentes antifúngicos é uma opção que está ganhando importância como terapia alternativa para micoses causadas por fungos não suscetíveis à terapia antifúngica padrão ou em determinadas infecções associadas aos biofilmes (KUHN et al., 2002; YUSTES et al., 2005; SEIDLER et al., 2006; CATEAU et al., 2008). Diversos estudos *in vitro* têm mostrado atividade sinérgica, onde micafungina é combinada com anfotericina B, fluconazol, itraconazol ou voriconazol contra isolados de diferentes espécies de *Aspergillus*, *Candida*, *Scedosporium* e *Fusarium* (PASTOR et al., 2009).

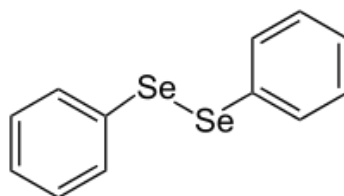
A combinação de caspofungina e anfotericina B é significativamente sinérgica tanto *in vitro* quanto *in vivo* em modelo murino para infecção sistêmica por *C.*

*parapsilosis* (BARCHIESI et al., 2007). Dados clínicos detalhando a eficácia da terapia de combinação são raros. Alguns estudos relatam que a monoterapia com caspofungina, em paciente com endocardite por *C. parapsilosis*, é falha, porém pode ser recuperada quando tratada com caspofungina e voriconazol (LOPEZ-CIUDAD et al., 2006).

### 1.2.6 Disseleneto de difenila

O disseleneto de difenila ( $\text{PhSe}_2$ ) (Figura 9) é um organocomposto de selênio (OS) simples, estável e altamente lipofílico, amplamente usado como um intermediário em sínteses orgânicas (MORO et al., 2005) que reage de forma muito eficaz com hidroperóxidos e peróxidos orgânicos. A reação é similar àquela catalisada pela enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px) (NOGUEIRA et al., 2004).

Figura 9 – Estrutura Química do disseleneto de difenila



Fonte: NOGUEIRA et al. (2004).

Muitos estudos têm demonstrado que o  $(\text{PhSe})_2$  possui inúmeras propriedades farmacológicas, tais como antioxidante (PRIGOL et al., 2009), antinociceptiva (SAVEGNAGO et al., 2008), anti-inflamatória (NOGUEIRA et al., 2003), antiúlcera (SAVEGNAGO et al., 2006), hepatoprotetora (WILHELM et al., 2009), antidepressiva (ACKER et al., 2009), ansiolítica (GHISLENI et al., 2008), neuroprotetora (POSSER et al., 2008), anti-hiperglicêmica (BARBOSA et al., 2008), antigenotóxico e antimutagênico (ROSA et al., 2007), podendo apresentar atividade complexante em animais expostos ao cádmio (SANTOS et al., 2005). Ademais, estudos têm focado em efeitos toxicológicos e farmacológicos do  $(\text{PhSe})_2$  em diferentes modelos biológicos (*in vitro* e em modelos animais), como descrito por NOGUEIRA et al. (2004) e ROSA et al. (2007), tornando este composto um bom candidato para uso terapêutico.

A atividade antifúngica do (PhSe)<sub>2</sub> tem sido demonstrada para cepas de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., e de oomycete *Pythium insidiosum* (LORETO et al., 2011; LORETO et al., 2012; DENARDI et al., 2013; ROSSETI et al., 2015). De acordo com ROSSETI et al. (2015) foi observado que (PhSe)<sub>2</sub> pode diminuir o crescimento e formação de biofilme de *C. albicans* através de mecanismos envolvendo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e permeabilidade da membrana. As ROS podem promover danos ao DNA, proteínas, e membranas celulares, levando à morte celular (IMLAY, 2003). O (PhSe)<sub>2</sub> pode atuar como um pró-oxidante em leveduras pela interação não enzimática com o grupo tiol da glutationa (GSH) e consequente redução dos níveis de GSH celular (importante na defesa antioxidante da célula), provavelmente através da formação de adutos, reduzindo a defesa celular não enzimática e assim sensibilizando a célula aos danos provocados pelas ROS (MOREIRA ROSA et al., 2005). Outra hipótese para o mecanismo biológico da atividade antifúngica do (PhSe)<sub>2</sub>, envolve a sua interação com grupos sulfidríla de biomoléculas presente em células fúngicas, similar ao mecanismo proposto para benzisosenazol-3(2H)-ones (MUGESH et al., 2001; WOJTOWICZ et al., 2004).

Devido aos efeitos colaterais indesejáveis de muitos antifúngicos atuais e da emergência de resistência antifúngica, a busca de novos agentes antifúngicos é um assunto relevante e digno de investigação. Em contraste com a atividade do (PhSe)<sub>2</sub>, pouca atenção tem sido dada para sua atividade e estrutura-atividade relacionada aos fungos (WOJTOWICZ et al., 2003), principalmente para *C. parapsilosis* equinocandina-resistente.

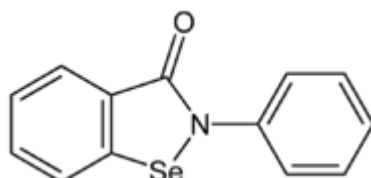
### 1.2.7 Ebselen

Nas últimas décadas, o interesse em desenvolver compostos orgânicos de selênio sintéticos aumentou consideravelmente, uma vez que alguns destes compostos apresentam propriedades antioxidantes químicas e biológicas (MULLER et al., 1984; SIES, 1993; PARNHAM et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2004; ROSA et al., 2007).

O ebselen (2-phenyl-1,2-benzisosenazol-3(2H)-one, PZ51) é um composto orgânico heterocíclico de selênio (C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>NOSe) (Figura 10) sintético com ação anti-inflamatória, antioxidante, antiaterosclerótica e atividade citoprotetora (MULLER et al., 1984; MAIORINO et al., 1992; SCHEWE, 1995; AZAD et al., 2014). Cataliticamente inativa peróxidos *in vitro* de um modo semelhante à glutationa peroxidase (GSH-Px)

(PARNHAM et al., 1987), sendo capaz de prevenir lesões celulares induzidas por ROS podendo reagir também com peroxinitrito (SCHEWE, 1995).

Figura 10 – Estrutura química do ebselen



Fonte: BATNA et al. (1997)

O ebselen, é conhecido por ser clinicamente seguro, apresenta um perfil farmacológico conhecido e atualmente está sendo submetido a ensaios clínicos para prevenção e tratamento de várias desordens tais como: doenças cardiovasculares, artrite, acidente vascular cerebral, aterosclerose e câncer (HANDA et al., 2000; KOBAYASHI et al., 2001; PARNHAM et al., 2013; SINGH et al., 2013; AZAD et al., 2014). Sua baixa toxicidade pode ser devido ao selênio não ser liberado da molécula ebselen durante a biotransformação e, deste modo, não é metabolizado pelo organismo como os outros compostos onde o selênio está mais disponível (SCHEWE, 1995; NOGUCHI, 2016). Em adição, propriedades antifúngicas do ebselen também têm sido exploradas.

As propriedades antifúngicas do ebselen parecem estar relacionadas à habilidade de inibir a atividade da proteína  $H^+$ -ATPase (Pma1p) na membrana plasmática fúngica (SOTEROPOULOS et al., 2000; CHAN et al., 2007), interferindo na regulação do pH intracelular e estabilização do gradiente de prótons através da membrana plasmática necessários para a absorção de nutrientes (SERRANO et al., 1986; MONK et al., 1994). Logo, a inibição da  $H^+$ -ATPase é suficiente para bloquear o crescimento celular de fungos (SOTEROPOULOS et al., 2000). A inibição da  $H^+$ -ATPase pelo ebselen pode resultar da interação com os grupos sulfidrilo de um ou mais resíduos de L-cisteína críticos para a atividade normal desta proteína (CHAN et al., 2007). SOTEROPOULOS et al. (2000) relataram que o ebselen reduz a atividade da ATPase em fungos não patogênicos como *S. cerevisiae*, bem como em fungos oportunistas e agentes

patogênicos, tais como *C. neoformans* e *C. albicans*. BILLACK et al. (2009) observaram a potente atividade *in vitro* do ebselen frente a cepas *C. albicans* resistentes ao fluconazol.

Apesar das ações benéficas do ebselen descritas, a avaliação da atividade antifúngica deste composto sobre *C. parapsilosis* é pertinente, sobretudo para cepas equinocandina-resistentes.

### 1.2.8 Resistência aos antifúngicos

A resistência aos antifúngicos pode ser classificada em três categorias principais: resistência primária ou intrínseca, adquirida e clínica. A resistência intrínseca ocorre sem a exposição aos antifúngicos enquanto que a resistência adquirida é desenvolvida durante o tratamento e muitas vezes, ocorre como resultado de uma ou de várias mutações genéticas (MASIA CANUTO et al., 2002). A resistência clínica, isto é, a falha da terapia antifúngica, é multifatorial e depende de uma variedade de fatores tais como: o estado do sistema imunológico do paciente, farmacocinética do agente antifúngico e a espécie do fungo infectante (PATERSON et al., 2003).

#### 1.2.8.1 Resistência aos poliênicos

Apesar de historicamente a anfotericina B ser o antifúngico mais utilizado, estudos têm demonstrado redução na sensibilidade e possível emergência da resistência em isolados de *Candida*, como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (TUNKEL et al., 1993; YALAZ et al., 2006). Assim como, resistência *in vitro* de *C. parapsilosis* a anfotericina B, a uma taxa de 2 a 3% (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003). A resistência intrínseca à anfotericina B é rara entre fungos que infectam seres humanos e a resistência adquirida à terapia é ainda menos comum (SANGLARD, 2002; ANTONIADOU et al., 2003; DANNAOUI et al., 2004).

Mesmo com poucos relatos de resistência à anfotericina B, pode ocorrer resistência a este fármaco devido a uma alteração dos lipídios na membrana celular do fungo (NENOFF et al., 1999). Ou seja, cepas resistentes à anfotericina B substituem o ergosterol por determinados esteróis precursores, conferindo assim, resistência ao fármaco (BRUNTON et al., 2012). Estudos em *C. albicans* e *S. cerevisiae* têm

demonstrado que alterações genéticas na via de biossíntese do ergosterol (genes ERG) têm sido responsáveis pela diminuição da sensibilidade aos polienos e azóis (GABER et al., 1989; ARTHINGTON et al., 1991; SANGLARD et al., 2003).

#### 1.2.8.2 Resistência aos azólicos

Embora *C. parapsilosis* seja normalmente sensível aos azólicos, tem sido documentada a resistência desta levedura ao fluconazol (MOUDGAL et al., 2005; SARVIKIVI et al., 2005; TUMBARELLO et al., 2007; PFALLER, M. A. et al., 2014; ZICCARDI et al., 2015), assim como resistência *in vitro* entre *Candida* não-*albicans*, particularmente *C. glabrata* e *C. krusei* (PFALLER et al., 1998; TORTORANO et al., 2003; FLECK et al., 2007). Testes de suscetibilidade *in vitro* demonstraram uma frequência de resistência ao fluconazol variando de 0 a 20% para espécies de *Candida* e de 2,5% para *C. parapsilosis* (ARIAS et al., 1994; PFALLER et al., 1998; OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003; PFALLER et al., 2003b; PFALLER et al., 2007b; PFALLER et al., 2015). Contudo, a resistência ao fluconazol pós-exposição tem sido associada à superexpressão de proteínas transportadoras de membrana e mutações, principalmente nos genes ERG11 (codifica a enzima 14- $\alpha$ -demetilase), CDR1 e menos frequentemente MDR1 que codificam bombas de efluxo do fármaco (SOUZA et al., 2015).

Os relatos sobre o perfil de suscetibilidade do voriconazol mostram que a resistência *in vitro* ao voriconazol ainda é rara (PFALLER et al., 2003a). Em uma análise de 9.371 isolados de *C. parapsilosis*, apenas 1,9% foram resistentes ao voriconazol e 36,7% dos isolados resistentes ao fluconazol foram suscetíveis ao voriconazol (PFALLER et al., 2007b) e em outro estudo, foi demonstrada a baixa sensibilidade de *C. parapsilosis* ao fluconazol e voriconazol (37%) sendo que 44% dos isolados resistentes ao fluconazol apresentaram resistência ao voriconazol (GOVENDER et al., 2016). Isto demonstra que a resistência cruzada ocorre para os azóis. Além disso, a resistência ao voriconazol desenvolve-se entre isolados clínicos previamente expostos ao fluconazol (MUGGE et al., 2006), e isolados com sensibilidade reduzida tanto para fluconazol e voriconazol foram identificados (CLARK et al., 2004). Desta forma, a baixa frequência de resistência antifúngica aos azólicos é comumente descrita em isolados clínicos do complexo *C. parapsilosis*.

### 1.2.8.3 Resistência à flucitosina

A utilização clínica de flucitosina é limitada, em parte, pela alta frequência de resistência inicial e desenvolvimento de resistência secundária durante monoterapia de candidíase (GOPINATHAN et al., 2013). Estudos relatam taxas de resistência *in vitro* de flucitosina de 2% a 6,4% para *C. parapsilosis* (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003; QUINDOS et al., 2004; ASADZADEH et al., 2008).

O mecanismo dessa resistência pode consistir na perda da permease necessária para o transporte da citosina ou na redução da atividade da enzima UPRTase ou da citosina desaminase. Para *C. albicans*, a substituição da timina por timidina no nucleotídeo 301 do gene que codifica a UPRTase, faz com que uma cisteína seja substituída por uma arginina, aumentando moderadamente a resistência à flucitosina (DODGSON et al., 2004). Mutações no gene *5-fluorouridine resistant* (FUR1) representam a causa mais comum de resistência à flucitosina em *C. glabrata* (VANDEPUTTE et al., 2011).

### 1.2.8.4 Resistência às equinocandinas

A resistência às equinocandinas foi relatada pela primeira vez em 2005 para *Saccharomyces cerevisiae*, *C. albicans* e *C. krusei* por PARK et al. (2005). A resistência a esta classe de antifúngicos permanece relativamente baixa, <3% para *C. albicans* e outras espécies de *Candida* (CASTANHEIRA et al., 2010; PFALLER et al., 2011b) com exceção para *C. glabrata* que apresenta uma taxa de resistência de 1,3 – 12,3 % (PFALLER et al., 2012; ALEXANDER et al., 2013; PFALLER et al., 2015). Observam-se casos raros de resistência às equinocandinas, contudo, passíveis de ocorrer durante a terapia antifúngica (WIEDERHOLD et al., 2003; FLEVARI et al., 2013). Estudos descreveram o desenvolvimento de resistência à caspofungina e micafungina durante o tratamento de endocardite (MOUDGAL et al., 2005), em pacientes transplantados (TAVERNIER et al., 2015) e à caspofungina durante o tratamento de esofagite (HERNANDEZ et al., 2004) evidenciando a emergência de espécies de *Candida* resistentes às equinocandinas. ZICCARDI et al. (2015) também relataram resistência *in vitro* à caspofungina para *C. parapsilosis*.

As equinocandinas demonstram redução da atividade *in vitro* contra *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (PFALLER et al., 2008), logo, falhas no tratamento com



este grupo de fármacos foram relatadas em *C. parapsilosis* (SIPSAS et al., 2009; SUN et al., 2010). Também foi relatada falha clínica em pacientes recebendo caspofungina, devido a espécies de *Candida* resistentes a este antifúngico (MOUDGAL et al., 2005; CHEUNG et al., 2006).

Recentemente, foi avaliada a epidemiologia, de janeiro de 2007 a dezembro de 2013, de candidemias em um hospital em Madri, pela identificação dos isolados em nível molecular e testes de suscetibilidade a antifúngicos. Dentre os 613 isolados, a taxa de resistência às equinocandinas foi de 4,4%, ocorrendo principalmente em espécies de *Candida* não-*albicans* intrinsecamente resistentes. Este índice de resistência às equinocandinas foi considerado baixo e não demonstrou sinais de aumento durante o período estudado (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014).

A anidulafungina, por sua vez, mantém atividade *in vitro* contra a maioria de isolados de *C. parapsilosis* resistentes à caspofungina e à micafungina, sendo recomendada para o tratamento de candidíase invasiva por *C. parapsilosis* (PFALLER et al., 2011; SALAS et al., 2011). Tendo em vista a sensibilidade reduzida às equinocandinas por isolados de *C. parapsilosis*, surgem preocupações quanto ao regime antifúngico ideal para o tratamento de candidemias causadas por esta levedura. Entretanto, um estudo populacional prospectivo multicêntrico sobre candidemia na Espanha em um período de 12 meses em 29 hospitais constatou que, o uso inicial de um regime baseado em equinocandinas não teve qualquer impacto sobre o risco de fracasso clínico em infecções por *C. parapsilosis* na corrente sanguínea (FERNANDEZ-RUIZ et al., 2014a).

Apesar disso, a resistência cruzada *in vitro* entre micafungina e caspofungina em isolados clínicos de *Candida* já foi previamente descrita por PFALLER et al. (2008) e PFALLER et al. (2011). A relevância clínica da resistência cruzada tem sido documentada em estudos de mecanismos de resistência do gene Glucana Sintase (*FKS*) (GARCIA-EFFRON et al., 2009a; PERLIN, 2011), bem como em modelos animais de candidíase invasiva (ARENDRUP et al., 2012; LEPAK et al., 2012) e, em pacientes imunocomprometidos com um alto nível de exposição prévia às equinocandinas. Neste caso, a resistência clinicamente significativa de uma ou mais equinocandinas é marcada pela aquisição de uma mutação no gene de resistência *FKS* (ARENDRUP et al., 2009; ALEXANDER et al., 2013; SHIELDS et al., 2013).

Desta forma, a emergência de resistência às equinocandinas em *C. parapsilosis* deve ser cuidadosamente ponderada sobre as vantagens desta classe de antifúngicos ao

escolher a terapia antimicótica ideal, uma vez que demonstra um índice terapêutico elevado com grande eficácia, perfil de segurança e tolerabilidade excelentes, baixo potencial de interações medicamentosas e eventos adversos relacionados. (BORMANN et al., 2009; SUCHER et al., 2009; GOTO et al., 2010; FERNANDEZ-RUIZ et al., 2014a). Combinações entre antifúngicos frente a isolados de *Candida parapsilosis* resistentes às equinocandinas ainda não foram testadas.

#### 1.2.8.4.1 Mecanismo de resistência *FKS*

As equinocandinas - anidulafungina, caspofungina e micafungina são efetivas e largamente usadas para o tratamento de candidíase invasiva. Todavia, isolados de *Candida* spp. com sensibilidade reduzida a esses fármacos são cada vez mais encontrados (HAKKI et al., 2006; DESNOS-OLLIVIER et al., 2008; GARCIA-EFFRON et al., 2009a; GARCIA-EFFRON et al., 2009b; ZIMBECK et al., 2010). Recentemente, em uma coleção de 133 cepas de *Candida* abrangendo seis espécies, 2,9% dos isolados foram considerados resistentes com base no critério de mecanismo *FKS* (CASTANHEIRA et al., 2010).

Os fungos possuem mecanismos adaptativos que ajudam a proteger contra agressões celulares, tais como aquelas encontradas após a inibição da síntese de glucano pelas equinocandinas. Estas respostas adaptativas frente ao estresse podem resultar em valores elevados de concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para as equinocandinas (PERLIN, 2007; COWEN, 2009), como determinado *in vitro*, mas que normalmente, não são associados com o fracasso clínico (KARTSONIS et al., 2005; PFALLER et al., 2005; PFALLER et al., 2008; DIMOPOULOU et al., 2014). Este fato é conhecido como “efeito paradoxal das equinocandinas” onde o fungo é inibido por concentrações baixas, mas cresce frente a elevadas concentrações do fármaco. Por outro lado, a resistência às equinocandinas resultando em falha clínica, está associada a mutações em duas regiões *hot spot* altamente conservadas do gene *FKS1* para espécies de *Candida* e *FKS1* e *FKS2* para *C. glabrata* (PARK et al., 2005; PERLIN, 2007; GARCIA-EFFRON et al., 2009b; ZIMBECK et al., 2010). As substituições de nucleotídeos no gene *FKS* alteram a sensibilidade da enzima  $\beta$ -1,3-glucana sintase para as equinocandinas e conferem resistência cruzada entre esta classe de antifúngicos (PERLIN, 2007).

A suscetibilidade reduzida de *C. parapsilosis* para as equinocandinas tem sido relacionada com o polimorfismo no gene *FKS1* (PERLIN, 2007; GARCIA-EFFRON et

al., 2008; SUN et al., 2010). *C. parapsilosis* é intrinsecamente menos sensível à caspofungina devido à presença do aminoácido alanina ocorrendo naturalmente na posição 660 da enzima  $\beta$ -1,3-glucana sintase, em substituição ao aminoácido prolina encontrado em outras espécies de *Candida* (GARCIA-EFFRON et al., 2008).

Este espectro limitado de mutação *FKS* em espécies de *Candida* relaciona-se com a suscetibilidade reduzida ao longo de toda a classe de equinocandinas, o que torna este mecanismo de resistência adequado para triagem através de testes moleculares (PERLIN, 2009). SHIELDS et al. (2015), relatam baixas taxas globais de mutação no gene *FKS* entre isolados clínicos de *Candida* (*C. glabrata* = 4%; outras espécies <1%). Entretanto, estas taxas são mais elevadas quando há exposição prévia às equinocandinas, chegando a valores superiores a 50% entre *C. glabrata* e *C. albicans*. O monitoramento da sensibilidade de *C. parapsilosis* e de outras espécies de *Candida* frente às equinocandinas é crucial para o entendimento do fenômeno da resistência nesta espécie e, desta forma, auxilia na definição de terapias antifúngicas mais efetivas no tratamento das candidíases invasivas (REX et al., 2000; PAPPAS et al., 2004).

### 1.2.9 Combinação entre antifúngicos

O interesse pelo uso de combinações terapêuticas antifúngicas tem crescido consideravelmente ao longo dos últimos anos, dado que as infecções por fungos oportunistas resistentes aos antifúngicos tornam-se cada vez mais comuns e o arsenal antimicótico para o tratamento continua sendo limitado (RODLOFF et al., 2011; COSTE et al., 2015). A combinação entre agentes antifúngicos de diferentes classes pode determinar melhor eficácia no tratamento quando o sinergismo é observado (JOHNSON et al., 2004).

A terapia baseada em combinações entre agentes antifúngicos pode constituir-se num benefício em potencial para o tratamento de candidíases, à medida que aumenta a eficácia, permite o uso de doses mais baixas de agentes tóxicos (tal como a anfotericina B) ou minimiza o tempo de duração da terapia. Outras vantagens incluem a expansão do espectro de atividade dos agentes antifúngicos, os perfis farmacocinéticos complementares ou ainda, redução do aparecimento de resistência (KARLOWSKY et al., 2006).

O antagonismo entre agentes antifúngicos pode ocorrer como consequência das ações de duas classes de antifúngicos por um mesmo sítio de ação, tal como proposto

para os azólicos e anfotericina B. Os azóis bloqueiam a síntese do ergosterol, e assim reduzem os sítios de ação para anfotericina B na membrana citoplasmática (SUGAR, 1991; SCHEVEN et al., 1995a; SCHEVEN et al., 1996). Ademais, os azóis lipofílicos podem ainda ficar adsorvidos na célula fúngica e impedir a ligação da anfotericina B com os esteróis da membrana (SCHEVEN et al., 1995a; SCHEVEN et al., 1995b).

Entre os vários mecanismos sinérgicos propostos entre antifúngicos, encontra-se o potencial de sinergismo entre azóis ou anfotericina B e flucitosina, caso em que os azóis ou polienos atuam na membrana celular fúngica favorecendo o transporte da flucitosina para o interior da célula (YAMAMOTO et al., 1997; BARCHIESI et al., 2001).

Combinações entre anfotericina B e flucitosina têm sido estudadas, com resultados mistos, dependendo das condições do isolado e do teste empregado. A interação predominante tem sido o sinergismo (MONTGOMERIE et al., 1975; WENTWORTH et al., 1982; LEWIS et al., 2002); no entanto, indiferença também tem sido observada (MARTIN et al., 1994; KEELE et al., 2001). Além disso, a flucitosina quando utilizada na monoterapia está associada com o rápido desenvolvimento de resistência, favorecendo assim, a sua utilização na terapia combinada (VANDEPUTTE et al., 2011). Resultados mistos também são encontrados para combinações de azóis e flucitosina, exemplo disso, são as interações sinérgicas encontradas para *C. neoformans* (SCHWARZ et al., 2003) e antagônicas para *C. glabrata*, sendo o último efeito mediado pelo gene CgCDR1 devido a sua indução pela flucitosina (STEIER et al., 2013).

Desta forma, o elevado número de possíveis combinações de fármacos que podem ser testadas e as particularidades de cada espécie de fungos são desafios na descoberta de combinações sinérgicas entre os fármacos, especialmente em relação à *C. parapsilosis* equinocandina-resistente.

### 1.3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de *C. parapsilosis* equinocandina-sensíveis e equinocandina-resistentes aos antifúngicos de diferentes classes e frente às combinações de fármacos e mais especificamente:

- Avaliar a suscetibilidade de isolados clínicos de *C. parapsilosis* frente à anidulafungina, caspofungina e micafungina;
- Verificar a evolução e a efetividade da resistência as equinocandinas desenvolvida *in vitro* em *C. parapsilosis*.
- Avaliar o fenômeno de resistência cruzada entre as equinocandinas para *C. parapsilosis* resistente;
- Comparar a suscetibilidade de *C. parapsilosis* equinocandina-sensíveis e *C. parapsilosis* equinocandina-resistentes frente à anfotericina B, ao fluconazol, à flucitosina e ao voriconazol;
- Avaliar a atividade das combinações entre agentes antifúngicos frente aos isolados equinocandina-sensíveis e, aos isolados equinocandina-resistentes;
- Avaliar a suscetibilidade de *C. parapsilosis* equinocandina-sensíveis e equinocandina-resistentes frente ao disseleneto de difenila e ao ebselen.
- Avaliar a expressão dos genes *FKS* em isolados de *C. parapsilosis* equinocandina-resistentes;

## 1.4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.4.1 Micro-organismos

Foram analisados 30 isolados clínicos de *C. parapsilosis* provenientes do banco de leveduras do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria – Rio Grande do Sul. Estes isolados foram identificados através de métodos clássicos (KURTZMAN et al., 1998) e, métodos moleculares (WHITE, 2003; TAVANTI et al., 2005; WHITE et al., 2006; TAVANTI et al., 2007). Os isolados encontram-se estocados em água destilada com glicerol a 10% a -80°C, no banco de leveduras do LAPEMI.

Uma cepa padrão de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e uma de *C. krusei* ATCC 6258 foram incluídas em alguns ensaios para o controle de qualidade conforme recomendado nos documentos M27-A3 (CLSI, 2008) e M27-S4 (CLSI, 2012). Após a indução da resistência foram formados os seguintes grupos: Grupo anidulafungina-resistente (ANF-R) (n=14), caspofungina-resistente (CSF-R) (n=19) e micafungina-resistente (MCF-R) (n=18).

#### 1.4.1.1 Identificação molecular

As leveduras foram reativadas em caldo Sabouraud dextrose (CSD) e em seguida cultivadas, *overnight* a 25°C em CSD. O DNA genômico foi extraído como descrito por CHONG et al. (2003). A concentração do DNA foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260nm (SAMBROOK et al., 2001) e a pureza (260/280) determinada. O DNA extraído foi diluído para 25ng/μl e estocado à -20°C. A integridade do DNA extraído foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 0,7% com tampão TBE 1X (Tris-base 90 mM; Ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM pH 8,0).

A técnica de PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) foi utilizada para a confirmação da espécie, entre seis espécies de *Candida* mais comuns. A região do espaçador transcrito interno (ITS) do rDNA ITS1, 5.8S-ITS2, foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR), com os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE, 2003; WHITE et al., 2006). Os produtos

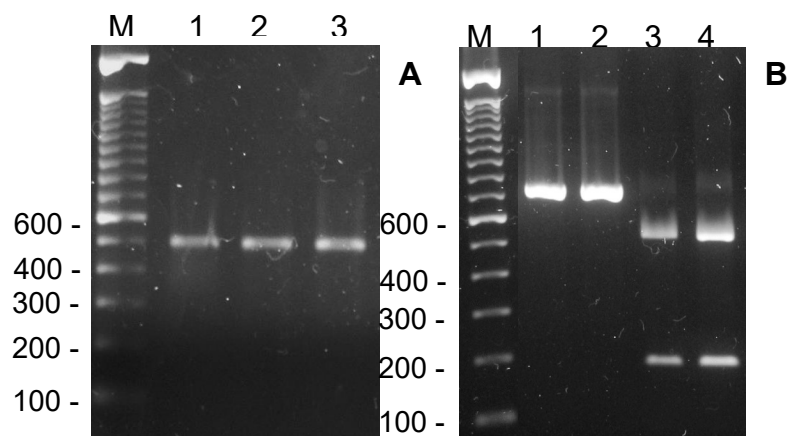
de amplificação foram clivados com a enzima de restrição *MspI* (New England Biolabs), segundo MIRHENDI et al. (2006). As condições de PCR foram: um primeiro ciclo de 5 min a 95°C, seguido por 30 ciclos de 1 min a 95°C, 30 s a 60°C, 1 min a 72°C e, como passo final de extensão, 10 min a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel agarose 1,5% em tampão TBE 1X. Na região de 520 pares de base (pb) ITS1-4 de *C. parapsilosis*, não existe qualquer local de reconhecimento para a enzima *MspI*. Foi utilizado padrão de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen®) (Figura 11-A).

Para a identificação de *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* realizou-se a PCR a partir do DNA extraído diretamente da colônia isolada, após cultivo em ágar Sabouraud e incubação a 37°C por 24 h (MIRHENDI et al., 2007). Utilizou-se os *primers* S1F (5'-TTGATGCTGTTGGATTGT-3') e S1R (5'-CAATGCCAAATCTCCCAA-3') para amplificação da região *secondary alcohol dehydrogenase-encoding gene* (SADH) (TAVANTI, 2005; TAVANTI, 2007).

As condições de amplificação foram as seguintes: um primeiro ciclo de 5 min a 95°C seguido por 40 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 45°C, 1 min a 68°C e, como passo final de extensão, 10 min a 68°C. Em seguida, realizou-se a clivagem do *amplicon* (716 pb) com a enzima de restrição *BanI* (New England BioLabs, Ipswich, MA) em um volume de 15µL, contendo 5µL do produto da PCR e 0,5µL da enzima *BanI* (10 U), incubou-se por 2h a 37°C. Posteriormente, realizou-se a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X (0,89 M Tris-borate, 0,89 M ácido bórico e 0,02 M EDTA). Foi utilizado o padrão de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®).

Os isolados foram identificados pela diferença no número de fragmentos de restrição da região SADH amplificada, sendo: *C. parapsilosis stricto sensu* com um sítio de restrição no gene (gerando dois fragmentos de 521 e 196 bp) (Figura 11-B), *C. orthopsilosis* sem nenhum sítio de restrição e *C. metapsilosis* com três sítios de restrição no gene (gerando quatro fragmentos de 370, 188, 93 e 60 pb).

Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose de produtos da PCR para caracterização de *C. parapsilosis*. **A)** ITS1-4 amplificação mostrando amplicon de 520 pb (linhas 1-3) de três amostras de *C. parapsilosis*. **B)** Amplificação da região SADH de amplicon de 716 pb (linhas 1 e 2) e SADH-RFLP mostrando os produtos de restrição (521 e 196 pb) após clivagem com *BanI* de duas amostras de *C. parapsilosis* (linhas 3 e 4). M: Padrão de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen®).

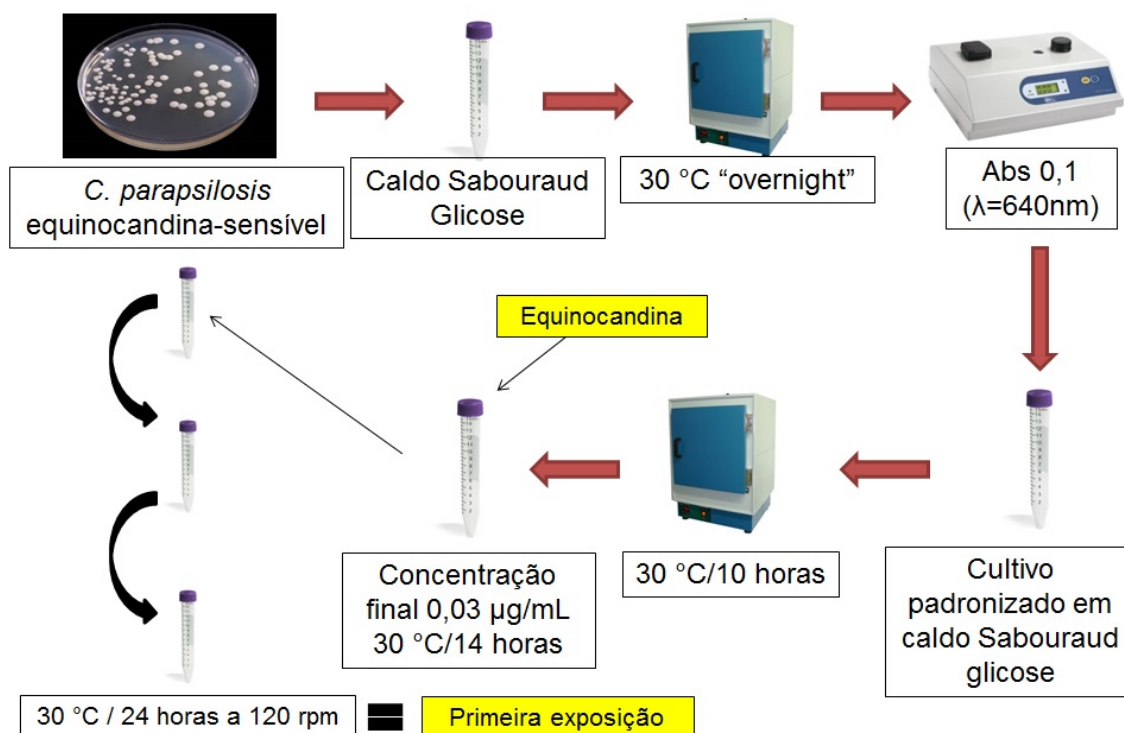


#### 1.4.2 Indução de resistência as equinocandinas

A partir do grupo de isolados clínicos de *C. parapsilosis*, considerados sensíveis as equinocandinas pelos testes de suscetibilidade, induziu-se a resistência, isoladamente, à anidulafungina, caspofungina e micafungina através do método FEKETE-FORGACS et al. (2000), como segue: as culturas de *C. parapsilosis* ES foram semeadas em tubos contendo CSD e incubadas a 30°C “overnight”. As concentrações das culturas foram, em seguida, padronizadas em novos cultivos de CSD com base na turvação medida em espectrofotômetro para uma absorbância final de 0,1 ( $\lambda = 640$  nm). Os cultivos padronizados foram incubados a 30°C e, após 10 horas foi acrescentado o fármaco com o qual se desejou induzir a resistência, resultando uma concentração final de 0,03  $\mu\text{g/mL}$  para cada equinocandina. Decorridas 14 horas de incubação, as células da cultura contendo o fármaco desejado, foram subcultivadas três vezes consecutivamente em CSD contendo 0,03  $\mu\text{g/mL}$  de cada equinocandina e incubadas a 30°C sob agitação de 120 rpm, durante 24 horas (primeira exposição) (Figura 12).



Figura 12 – Processo de indução de resistência as equinocandinas.



Após a terceira incubação, as células foram transferidas para novos tubos contendo CSD e o fármaco desejado na concentração de 0,03 µg/mL, a fim de que se obtivesse, em espectrofotômetro, uma absorbância de final de 0,1 a 640 nm. Depois de 10 horas de incubação, foi adicionado o fármaco suficiente para a duplicação da concentração inicial (0,06 µg/mL) e após 14 horas de incubação, as células das culturas foram subcultivadas três vezes consecutivamente em CSD contendo 0,06 µg/mL de cada equinocandina e incubados a 30°C por 24 horas sob agitação de 120 rpm (segunda exposição). As exposições foram repetidas consecutivamente duplicando-se a concentração de cada equinocandina até que, a concentração final atingisse 8 µg/mL. Ocasionalmente, quando não houvesse crescimento da cultura a uma determinada concentração das equinocandinas, introduziu-se uma concentração intermediária de exposição. Como controle de crescimento, ao final de cada exposição as equinocandinas, as leveduras foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) contendo a respectiva concentração do fármaco e incubadas a 30°C por 24 horas. Caso o crescimento não fosse detectado (pela turbidimetria seguida pelo cultivo) a exposição era repetida. As cepas foram categorizadas como sensíveis ( $\leq 2$  µg/mL), intermediárias

(4 µg/mL) ou resistentes ( $\geq 8$  µg/mL) às equinocandinas de acordo com os *breakpoints* do documento M27-S4 (CLSI, 2012). Após o cultivo, as cepas que revelarem resistência às equinocandinas, foram mantidas em água destilada com glicerol a 10% a uma concentração de 8 µg/mL para cada equinocandina a -80°C. Um controle livre de equinocandinas foi incluído em cada experimento sendo que as CIMs não apresentaram alterações (CIM = 1 µg/mL). Ao final de todas as exposições, células das culturas foram semeadas em ASD e uma única colônia considerada resistente foi isolada para posterior estudo da suscetibilidade aos outros fármacos isolados (anfotericina B, fluconazol, flucitosina e voriconazol) e em combinação.

### 1.4.3 Agentes antifúngicos

Os agentes antifúngicos - anfotericina B e 5-flucitosina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), fluconazol, voriconazol e anidulafungina (Pfizer Pharmaceutical Group, New York, NY), caspofungina (Merck, Darmstadt, Germany) e micafungina (Astelas, Chuo, tokyo, Japan) - foram obtidos de seus respectivos fabricantes na forma de pó puro ou soluções intravenosas de potência conhecida. As soluções-estoque de anfotericina B, anidulafungina, caspofungina, micafungina e voriconazol foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO); enquanto que as soluções de fluconazol e 5-flucitosina foram preparadas em água destilada estéril. As soluções intermediárias foram realizadas em caldo RPMI 1640 tamponado com ácido morfolino propanossulfônico (MOPS) de acordo com as diretrizes dos documentos M27-A3 (CLSI, 2008) e M27-S4 (CLSI, 2012) do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

### 1.4.4 Testes de suscetibilidade *in vitro*

A suscetibilidade dos isolados de *C. parapsilosis* foi determinada pelo método de microdiluição em caldo RPMI 1640, de acordo com as normas de padronização publicadas no documento M27-A3 (CLSI, 2008), levando em consideração as atualizações do documento M27-S4 (CLSI, 2012). As faixas de concentrações testadas para cada agente antifúngico estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1 – Faixa de concentração testada para cada agente antifúngico.

<b>Agentes antifúngicos</b>	<b>Faixa de concentração (µg/mL)</b>
Anidulafungina	0,06-8,00
Casposfungina	0,06-8,00
Micafungina	0,06-8,00
Anfotericina B	0,12-16,00
Fluconazol	0,50-64,00
Flucitosina	0,25-32,00
Voriconazol	0,06-8,00

#### 1.4.4.1 *Preparação do inóculo*

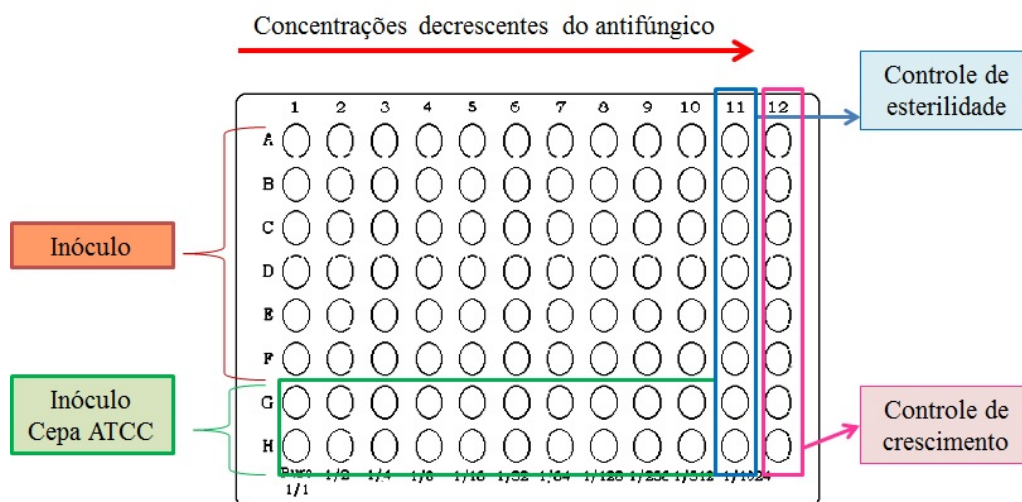
Os isolados foram subcultivados em tubos contendo ASD e incubados a 35°C por 24 horas. Para a preparação dos inóculos, as colônias de 24 horas foram suspensas em solução salina estéril a 0,85%. A suspensão resultante foi colocada em agitador vórtex durante 15 segundos e a densidade celular, ajustada em espectrofotômetro para obter a transmitância de uma solução padrão de McFarland 0,5 em comprimento de onda de 530 nm. Esse procedimento forneceu uma suspensão-padrão de levedura contendo  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células por mL. A partir desta suspensão, uma suspensão de trabalho foi preparada fazendo-se uma diluição 1:50 seguida de uma diluição 1:20 em meio RPMI 1640, resultando em uma concentração de  $1 \pm 1,5 \times 10^3$  células por mL (CLSI, 2010).

#### 1.4.4.2 *Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs)*

Para o ensaio da determinação das CIMs foram utilizadas microplacas de poliestireno contendo 96 poços com fundo chato, descartáveis (Figura 13). Inicialmente foram adicionados 100 µL do antifúngico nas diferentes concentrações, distribuídos de forma seriada nos poços das fileiras de 1 a 10 das microplacas. As fileiras 11 e 12 representam os controles negativo e positivo, respectivamente. Posteriormente foram adicionados 100 µL do inóculo previamente ajustado e diluído em RPMI. Visto que há uma diluição 1:2 do antifúngico quando combinado com o inóculo, as concentrações

iniciais destes agentes serão duas vezes mais concentradas do que as concentrações finais desejadas.

Figura 13 – Representação esquemática de uma placa de microdiluição utilizada para determinação das concentrações inibitórias mínimas.



As CIMs para os agentes antifúngicos foram determinadas após 24 e 48 horas de incubação em estufa a 35°C. Os valores de CIMs foram determinados visualmente como a concentração mais baixa do fármaco que causou os níveis de redução de crescimento significativa, comparado ao seu controle positivo. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Os critérios de suscetibilidade aos antifúngicos testados foram definidos conforme o documento M27-A3 (CLSI, 2008) levando em consideração o documento M27-S4 (CLSI, 2012). Os *breakpoints* dos fármacos encontram-se descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - *Breakpoints* para interpretação dos testes de suscetibilidade de *C. parapsilosis* frente aos antifúngicos testados, conforme documentos M27-A3 (CLSI, 2008) e M28-S4 (CLSI, 2012).

Antifúngicos	CIM (µg/mL)			
	Sensível	Sensível Dose Dependente	Intermediário	Resistente
Anidulafungina	≤2	-	4	≥8
Micafungina	≤2	-	4	≥8
Caspofungina	≤2	-	4	≥8
Anfotericina B	≤1	-	-	>1
Fluconazol	≤2	4	-	≥8
Flucitosina	≤4	8-16	-	≥32
Voriconazol	≤0,12	0,25-0,5	-	≥1

#### 1.4.5 Atividade *in vitro* das combinações entre agentes antifúngicos

Os agentes antifúngicos anfotericina B, fluconazol, flucitosina e voriconazol foram associados entre si conforme demonstrado no Quadro 3.

Quadro 3 – Combinações entre agentes antifúngicos.

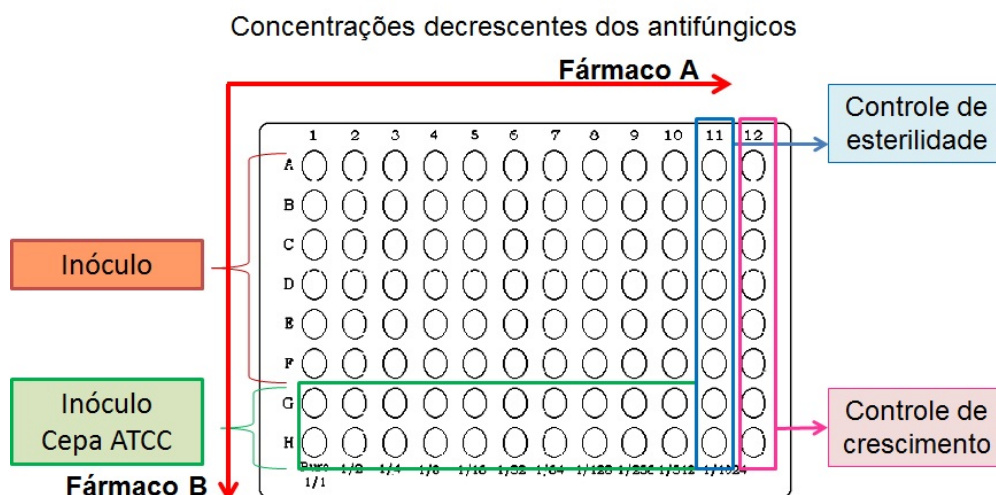
Antifúngico 1	Antifúngico 2
Anfotericina B	Fluconazol Flucitosina Voriconazol
Fluconazol	Anfotericina B Flucitosina Voriconazol
Flucitosina	Anfotericina B Fluconazol Voriconazol
Voriconazol	Anfotericina B Fluconazol Flucitosina

### 1.4.5.1 Avaliação das combinações

A avaliação da atividade antifúngica *in vitro* foi obtida pelo método de *checkerboard*, com base no documento M27-A3 (CLSI, 2008), a partir da menor concentração inibitória fracionária (CIF) de todos os poços não turvos ao longo da turbidez (ANON, 1992), com posterior determinação do índice de concentração inibitória fracionária (CIFI) (JOHNSON et al., 2004). Os testes foram realizados em caldo RPMI 1640 tamponado em pH 7,0 com MOPS.

As diluições dos antifúngicos resultaram em uma concentração quatro vezes maior que a concentração final desejada. Isto se deve ao fato de que 50  $\mu$ L de cada diluição de um determinado agente foram combinados a outros 50  $\mu$ L de cada diluição do segundo agente; a este volume foi somado 100  $\mu$ L de inóculo em caldo RPMI 1640 depositados em cada poço da microplaca (Figura 14). As faixas de concentração dos agentes antifúngicos foram as mesmas utilizadas para o teste de suscetibilidade. Após 24 e 48 horas de incubação das placas, a 35°C, foram realizadas as leituras.

Figura 14 – Representação esquemática de uma placa de microdiluição utilizada para avaliação das combinações de antifúngicos *in vitro* pelo método *checkerboard*.



Para avaliar a interação entre os agentes, a CIF foi calculada para cada combinação. As CIFs foram calculadas para cada agente pela divisão da concentração inibitória (ou efetiva) de cada agente na combinação, pela concentração inibitória (ou efetiva) do agente sozinho. Os valores de CIF foram então somados para definir o CIFI

resultante da combinação, como mostra a fórmula abaixo. Sinergismo foi definido como  $CIFI \leq 0,5$ . A indiferença foi considerada quando  $0,5 < CIFI \leq 4$ , enquanto que antagonismo foi definido quando  $CIFI > 4$  (JOHNSON et al., 2004).

$$CIFI = \frac{\text{CIM fármaco A em combinação} + \text{CIM da fármaco B em combinação}}{\text{CIM fármaco A sozinho} \quad \text{CIM fármaco B sozinho}}$$

#### 1.4.6 Análise da expressão do gene *FKS* de *C. parapsilosis*

Para a análise da expressão do gene *FKS*, foram selecionadas dez cepas de cada grupo equinocandina-resistente (ANF-R, n = 10; CSF-R, n = 10; MCF-R, n = 10) e suas respectivas cepas sensíveis de cada grupo (anidulafungina-sensível (ANF-S), n = 10; caspofungina-sensível (CSF-S), n = 10; micafungina-sensível (MCF-S), n = 10), totalizando 6 grupos.

##### 1.4.6.1 Extração do RNA e síntese do cDNA

As cepas de *C. parapsilosis*, dos 6 grupos, foram cultivadas em caldo YPD (2% extrato de levedura, 4% peptona Bacto e 4% dextrose) e incubadas *overnight* a 37°C a 150 rpm por 16 horas. O RNA total foi extraído usando reagente Trizol (Invitrogen®). Foram adicionadas pérolas de vidro e solução ácida de lavagem (Sigma) e em seguida agitado em vortex por 10 minutos com intervalos de 30 segundos em gelo. Mini kit RNeasy® (Qiagen, Alemanha) foi usado para purificação. A concentração e pureza do RNA foi avaliada com NanoDrop (Thermo Scientific 200c). O cDNA foi obtido usando o kit Superscript III RT® Supermix (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante.

##### 1.4.6.2 Detecção dos genes *FKS1*, *FKS2* e *FKS3*

Para a detecção dos genes *FKS1*, *FKS2* e *FKS3*, *primers* específicos foram projetados. Os *primers* utilizados na PCR em tempo real (q-PCR) estão listados no Quadro 4. As sequências completas dos genes *FKS1*, *FKS2*, e *FKS3* para *C. parapsilosis* foram obtidas a partir da base de dados *GenBank* (*GenBank* acesso nº EU221325, EU221326 e EU221327, respectivamente). Os genes *URA3p* (*GenBank*

acesso nº XP\_721787.1) e *ACT1p* (*GenBank* acesso nº AJ508485.1) foram usados para a normalização da expressão (ROSSIGNOL et al., 2007). Os *primers* foram projetados usando *software* disponível no site IDT *Integrated DNA Technologies* (<http://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR>), utilizando critérios tais como o tamanho dos oligonucleotídeos (20-25 pb), o tamanho do fragmento resultante (70-110 pb), temperatura de anelamento igual para todos os *primers* (60°C), porcentagem da base guanina e citosina entre 40 e 60%, e baixa porcentagem de dímeros. As sequências foram comparadas com a base de dados de *C. parapsilosis* usando BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para determinar sua especificidade. Foram excluídos iniciadores com sinais não específicos. Para validar a especificidade de cada par de *primers* para seus correspondentes genes *FKS1*, *FKS2* e *FKS3*, os produtos da PCR foram amplificados a partir do DNA genômico de *C. parapsilosis*. Reações de PCR contendo 0,4uM de cada *primer*, 200uM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), 0,8x Taq polimerase tampão (Invitrogen®), 2,5 unidades de Taq polimerase (Invitrogen®) e 50 ng de DNA genômico. Os produtos da PCR foram determinados em gel de agarose 2% e visualizados por coloração com brometo de etídio. Os amplicons produzidos para cada par de *primers* específicos do gene correspondeu ao fragmento (banda) de tamanho esperado e validou a especificidade dos *primers* frente ao genoma de *C. parapsilosis*. Cada par de *primer* somente amplificou seu gene específico não sendo observada reatividade cruzada, demonstrando assim a especificidade dos pares de *primer* entre os genes *FKS1*, *FKS2* e *FKS3*.

Quadro 4 - *Primers* usados para a análise da expressão dos genes *FKS1*, *FKS2*, and *FKS3* pela q-PCR.

	Target	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<b><i>FKS</i> gene</b>	<i>FKS1</i>	TGGGTGCTAGATTGAT GTTGATTT	ATATGGGTTAAAGAT GAATGGCGA
	<i>FKS2</i>	TGCCTCATATACTTGAC TAACTTGGTGT	GCGTCCAAATAGAAA CCCCAA
	<i>FKS3</i>	TGCTGCCTCTGTTTCAA CTAACG	CTACCTCCACTTGATT TGCTTGATC
<b>Housekeeping gene</b>	<i>ACT1p</i>	TGGCTGGTAGAGATTT GACTGACTACT	GCAACATAACACAAT TTCTCCTTGA
	<i>URA3p</i>	GGAGCTCAAGAAACCA CTGATGAA	ACTCCCCGTATGCTAA AGAGCC



#### 1.4.6.3 Eficiência dos primers

A verificação da eficiência dos *primers* gerados foi realizada com titulação variando de 100-600 nM a fim de avaliar a concentração ótima do *primer* para gerar um Ct mais baixo, a maior  $\Delta R_n$  e ausência de dímeros. Após avaliar a concentração ótima dos *primers*, foram realizadas diluições seriadas de cDNA de diferentes amostras para verificar a eficiência do experimento, esta é indicada pela inclinação da curva padrão. A eficiência ideal usada foi de 100% (90-100%) e a curva padrão com inclinação de -3,32.

#### 1.4.6.4 Expressão dos genes *FKS*

A fim de avaliar a expressão de *FKS1*, *FKS2* e *FKS3*, foi utilizada a q-PCR. Para 10 cepas de cada grupo: ANF-R, CSF-R e MCF-R e suas respectivas cepas sensíveis, q-PCR (CF X 48 *Real-time PCR System, Applied Biosystems*) foi usada para determinar os níveis relativos de RNAm transcritos de *FKS1*, *FKS2* e *FKS3*, com *ACT1p* e *URA3p* como genes *housekeeping* de referência para normalização. Cada reação consistiu de 10  $\mu$ L de SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR Master Mix, 300 nM *forward* e *reverse primers*, 3  $\mu$ L de água e 1  $\mu$ L de cDNA em um reação com volume final de 20  $\mu$ L. Controles negativos foram incluídos em cada placa de reação. A quantificação relativa da expressão dos genes *FKS1*, *FKS2* e *FKS3* foi realizada pelo método DDCT. Cada reação foi efetuada em triplicata e os valores médios da expressão relativa de cada gene foram determinados.

**1 ARTIGO 1****Exploring the *in vitro* resistance of *Candida parapsilosis* to echinocandins**

Francieli Chassot <sup>a#</sup>, Tarcieli Pozzebon Venturini <sup>a</sup>, Fernanda Baldissera Piasentin <sup>a</sup>,  
Luana Rossato <sup>a</sup>, Adriana Fiorini <sup>b</sup>, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski <sup>b</sup>, Sydney Hartz  
Alves <sup>a</sup>



## Exploring the In Vitro Resistance of *Candida parapsilosis* to Echinocandins

Francieli Chassot · Tarcieli Pozzebon Venturini · Fernanda Baldissera Piasentin ·  
Luana Rossato · Adriana Fiorini · Terezinha Inez Estivalet Svidzinski · Sydney Hartz Alves

Received: 21 October 2015 / Accepted: 9 June 2016  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

**Abstract** The naturally high minimum inhibitory concentration exhibited by echinocandins against *Candida parapsilosis* has been known since the first introduction of these antifungal agents. Despite this awareness, clinical failures have not been reported; consequently, the resistance of *C. parapsilosis* to echinocandins remains unexplored. We exposed 30 isolates of *C. parapsilosis* to echinocandins (caspofungin, micafungin, and anidulafungin) in vitro and studied the effects of this exposure. After 60 exposures, 80, 67, and 60 % of the isolates changed from susceptible to non-susceptible to caspofungin, micafungin, and anidulafungin, respectively. In addition, four strains exhibited cross-resistance to all three echinocandins. Based on the M27-A3 (CLSI, 2008) and M27-S4 (CLSI, 2012) techniques, the susceptibility of the resistant strains to other antifungal agents

was assayed. All of the tested echinocandin-resistant strains were susceptible to amphotericin B, and the resistance rate to fluconazole, voriconazole, and flucytosine was 73.3, 43.3, and 20 %, respectively. The exposure of *C. parapsilosis* to the three echinocandins generated cross-resistant strains and an unexpected in vitro resistance to azoles and flucytosine.

**Keywords** *Candida parapsilosis* · Echinocandins · Antifungal drug resistance · Susceptibility tests

### Introduction

*Candida parapsilosis* is one of the most common causative agents of candidemia, an invasive candidiasis (IC), worldwide [1]. In Latin American countries, this species is most frequently observed among cases of non-*albicans* *Candida* IC [2, 3].

Echinocandins are recommended as the first line of treatment for invasive candidemia [4]. Echinocandins act by inhibiting the  $\beta$ -(1,3)-D-glucan synthase (GS) complex, which is encoded by three related genes (*FKS1*, *FKS2*, and *FKS3*) and a regulatory subunit, Rho1p [5, 6]. The increased use of echinocandins has been linked to an increasing incidence of candidemia due to *C. parapsilosis* [7, 8]. At the same time, there is an increasing number of reports of echinocandin resistance (ER) in *Candida* spp., especially in isolates

---

F. Chassot · T. P. Venturini · F. B. Piasentin ·  
L. Rossato · S. H. Alves  
Health Sciences Centre, Federal University of Santa  
Maria, Santa Maria, RS, Brazil

A. Fiorini · T. I. E. Svidzinski  
Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State  
University of Maringá, Maringá, PR, Brazil

F. Chassot (✉)  
Departamento de Microbiologia e Parasitologia,  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av.  
Roraima n° 1000, Prédio 20, Sala 4139, Santa Maria,  
RS CEP 97105-900, Brazil  
e-mail: francielichassot@gmail.com

from immunocompromised patients treated with these antifungal agents over a long period of time [9, 10]. The echinocandins demonstrate reduced in vitro activity against *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* [11], and treatment failures with echinocandins have been reported for *C. parapsilosis* infections [12, 13].

The present study aims to evaluate whether *C. parapsilosis* acquires in vitro resistance against the echinocandins, how rapidly the resistance develops against each the echinocandins, the cross-resistance among the echinocandins, and the impact of echinocandin resistance on the susceptibility to amphotericin B, fluconazole, voriconazole, and flucytosine.

## Materials and Methods

### Isolates

Thirty clinical isolates of *Candida parapsilosis* were analysed. All isolates were originally echinocandin susceptible (ES), and they were obtained from the Mycological Research Laboratory (LAPEMI) of the Federal University of Santa Maria, Brazil.

### Identification of Isolates

Phenotypic identification followed standard methods [14]. Molecular identification was based on PCR-RFLP method [15–17] and *C. parapsilosis* sensu stricto through PCR [18] using the primers S1F (5'-TTGATGCTGTTGGATTGT-3') and S1R (5'-CAATGCCAAATCTCCCAA-3') to amplify the secondary alcohol dehydrogenase-encoding gene (*SADH*) [19, 20].

### Antifungal Agents

Antifungal agents were obtained as standard powders as follows: Amphotericin B and flucytosine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); fluconazole, voriconazole and anidulafungin (ANF) (Pfizer Pharmaceutical Group, New York, NY); caspofungin (CSF) (Merck, Darmstadt, Germany) and micafungin (MCF) (Astellas, Chuo, Tokyo, Japan). Stock solutions were prepared for susceptibility testing, as described in the M27-A3 [21] and M27-S4 [22] testing standards obtained from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

### Exposure to Echinocandins

Each isolate was challenged to grow at increasing concentrations of ANF, CSF, or MCF, based on the method described by Fekete-Forgács et al. [23], as follows: Initially, the ES strains were cultured in Sabouraud glucose broth (SDB) overnight at 30 °C. A volume of 10 mL of broth culture of ES strains was transferred to a new flask in order to adjust the cells concentration to an absorbance of 0.1 ( $\lambda = 640$ ) and incubated at 30 °C for 10 h. After this time, each echinocandin was added separately in each culture at a final concentration of 0.03 µg/mL. After 14 h of further incubation, the cells of the echinocandin-containing culture were subcultured three times consecutively into fresh SDB containing 0.03 µg/mL of echinocandin and each case was incubated at 30 °C with shaking for 24 h (first exposure). After the third incubation, cells were added to flasks containing 20 mL of SDB echinocandin 0.03 µg/mL to achieve an absorbance of 0.1. After 10 h of incubation, each echinocandin was added at a concentration of 0.06 µg/mL, and after 14 h of further incubation, the cells of this culture were subcultured three times into fresh SDB containing echinocandin 0.06 µg/mL and incubated in each case at 30 °C with shaking for 24 h (second exposure). These exposures were then repeated consecutively, and the concentration of each echinocandin was always duplicated under the procedure until it reached 8 µg/mL. Occasionally, when the growth was not obtained at one concentration, we introduced an intermediate concentration. As a growth control, at the end of each exposure to echinocandins, the cells were plated in Sabouraud glucose agar (SDA) containing the respective concentration of the drug at 30 °C for 24 h. If the growth was not detected (by turbidity followed by plating), the exposure was repeated. At the end of all exposures, cells from these cultures were plated, and single colony was designated isolate ER. Strains were categorized as susceptible, intermediate or resistant to echinocandins according to the interpretative breakpoints of CLSI M27-S4 criteria ( $\leq 2$  µg/mL; 4 µg/mL; or  $\geq 8$  µg/mL), respectively. A drug-free control was included in each experiment, and the MICs did not show changes (MIC = 1 µg/mL). After culture, resistance-revealed isolates were maintained in distilled water with 10 % glycerol at the

concentration of resistance ( $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ ) for each echinocandin at  $-80^\circ\text{C}$ .

### Antifungal Susceptibility Testing

The broth microdilution testing was performed in accordance with the guidelines of M27-A3 and M27-S4 from the CLSI [21, 22], using RPMI 1640 medium with 0.2 % glucose and an inoculum of  $0.5 \times 10^3$  cells/mL, incubated aerobically at  $35^\circ\text{C}$ . The minimum inhibitory concentration (MIC) values were determined after 24 h of incubation, and the readings were similar to those described for MIC determination [21, 22]. In all instances, the MIC trays were prepared using reagent-grade powders, as directed by CLSI. The breakpoints ( $\mu\text{g/mL}$ ) used to define susceptibility and resistance for each drug, respectively, were: for echinocandins and fluconazole, MICs  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$  was defined as susceptibility and MICs  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$  as resistance [22]; for amphotericin B, MICs  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$  as susceptibility and  $>1 \mu\text{g/mL}$  for resistance [24]; for 5FC, the breakpoints for susceptibility and resistance were  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$  and  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ , respectively [21]; and for voriconazole, the susceptibility was defined for MICs  $\leq 0.12 \mu\text{g/mL}$  and the resistance by MICs  $\geq 1 \mu\text{g/mL}$  [22]. All assays were performed in duplicate. *Candida parapsilosis* strain ATCC 22019 and *C. krusei* strain ATCC 6258 were used as quality controls.

### Statistical Analyses

The MICs were analysed by comparing the susceptible groups and the groups exposed to echinocandins using the nonparametric Wilcoxon paired *t* test. The nonparametric Kaplan–Meier test was used to assess the proportion of time (in days) required to the generation of resistant cells at each of the echinocandins. The GraphPad Prism software (GraphPad Software version 6.01, CA, USA) was used, and the significance level was 0.05.

## Results

### Exposure to Echinocandins

After 21 exposures to increasing concentrations of each echinocandin for 49 days, we detected the first

three cases of resistance (two strains resistant to CSF and one resistant to MCF). Exposure to CSF and MCF led to resistance in 19 and 18 resistant strains, respectively. The ANF took the longest to show resistance; the first resistant isolate was observed after 63 days and 25 exposures to increasing ANF concentrations. It is important to note that from the concentration of  $0.12 \mu\text{g/mL}$  of ANF, the strains had a delay in their growth, requiring more time for the visualization of growth; the same delay was observed for MCF and CSF at concentrations  $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ . However, analysis of the Kaplan–Meier test shows that there is no significant difference ( $P = 0.427$ ) in the time of generation of resistant cells to echinocandins between groups exposed to ANF, CSF, and MCF. After 60 exposures, 270 days after the beginning of the experiment, it was possible to define three new groups of strains based on the susceptibility to echinocandins: anidulafungin-after exposure (ANF-AE), caspofungin-after exposure (CSF-AE), and micafungin-after exposure (MCF-AE) (Table 1).

Based on the MIC range, breakpoints, and geometric mean (GM) of the MICs, 63.3, 60 and 46.6 % of the strains were found resistant to the CSF, MCF, and ANF at the end of the experiments, respectively. The highest geometric mean for resistant strains was seen for CSF (GM =  $4.2 \mu\text{g/mL}$ ), followed by MCF (GM =  $3.7 \mu\text{g/mL}$ ), and ANF (GM =  $2.4 \mu\text{g/mL}$ ) (Table 1).

By comparison, the numbers of “non-susceptible” strains (intermediated and resistant) were as follows: 24 (80 %) for the CSF-AE group, 20 (67 %) for the MCF-AE group, and 18 (60 %) for the ANF-AE group.

### Cross-Resistance Among Echinocandins

Only four isolates showed simultaneous resistance to all three echinocandins. Table 2 shows the percentage of *C. parapsilosis* isolates resistant to the different echinocandins and the cross-resistance. For the caspofungin-resistant (CSF-R) group, 15 of the strains (78.9 %) showed cross-resistance to MCF, and eight of the strains (42.1 %) showed cross-resistance to ANF. For the anidulafungin-resistant (ANF-R) group, six strains (42.8 %) showed cross-resistance to CSF and four strains (28.6 %) showed cross-resistance to MCF. For the micafungin-resistant (MCF-R) group, five strains (27.7 %) showed resistance to ANF, and

**Table 1** In vitro susceptibility of 30 clinical isolates of *Candida parapsilosis* before and after exposure to echinocandins

Antifungal agents	<i>C. parapsilosis</i>	MIC range ( $\mu\text{g/mL}$ )	Geometric mean	N° (%) of isolates in category <sup>a</sup>		
				S	I	R
Anidulafungin	ES	0.03–2.0	0.64	30 (100)	–	–
	ANF-AE	0.06–8.0	2.4	12 (40.0)	4 (13.3)	14 (46.6)
Caspofungin	ES	0.03–1.0	0.38	30 (100)	–	–
	CSF-AE	0.25–8.0	4.2	6 (20.0)	5 (16.6)	19 (63.3)
Micafungin	ES	0.06–2.0	0.60	30 (100)	–	–
	MCF-AE	0.06–8.0	3.7	10 (33.3)	2 (6.6)	18 (60.0)

MIC Minimum inhibitory concentration; ES echinocandins susceptible; ANF-AE anidulafungin-after exposure; CSF-AE caspofungin-after exposure; MCF-AE micafungin-after exposure

<sup>a</sup> S Susceptible; I intermediate; R resistant

**Table 2** Cross-resistance to echinocandins for anidulafungin-, caspofungin-, and micafungin-resistant groups of *C. parapsilosis*

Groups	Echinocandins	Number of isolates resistant (%) <sup>a</sup>
ANF-R ( $n = 14$ ) <sup>b</sup>	Caspofungin	3 (21.4)
	Micafungin	1 (7.1)
	Caspofungin plus micafungin	3 (21.4)
CSF-R ( $n = 19$ )	Anidulafungin	4 (21.0)
	Micafungin	11 (57.9)
	Anidulafungin plus micafungin	4 (21.0)
MCF-R ( $n = 18$ ) <sup>c</sup>	Anidulafungin	3 (16.6)
	Caspofungin	10 (55.5)
	Anidulafungin plus caspofungin	2 (11.1)

ANF-R Anidulafungin resistant; CSF-R caspofungin resistant; MCF-R micafungin resistant

<sup>a</sup> Anidulafungin, caspofungin, and micafungin MIC,  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$

<sup>b</sup> Seven (50 %) isolates resistant to anidulafungin showed susceptible or intermediate profile to the other echinocandin

<sup>c</sup> Three (16.6 %) isolates resistant to micafungin showed susceptible or intermediate profile to the other echinocandin

12 strains (66.6 %) showed resistance to CSF (Table 2). A total of 10 strains (33.3 %) became “non-susceptible” simultaneously to the three echinocandins.

#### In Vitro Susceptibility of Echinocandin-Susceptible and Echinocandin-Resistant *C. parapsilosis* to Other Antifungal Agents

Table 3 shows the sensitivity of the ten strains from the original ES group compared with their corresponding echinocandin-resistant strains to azoles, flucytosine, and amphotericin B. The echinocandin-

resistant group remained susceptible to amphotericin B, and the resistance rate to fluconazole, voriconazole, and flucytosine was 73.3 % (22/30), 43.3 % (13/30), and 20 % (6/30), respectively.

The ANF-R and MCF-R groups exhibited reduced susceptibility to fluconazole compared with the original isolates (ES) ( $P < 0.05$ ), which was not observed in the CSF-R group. The CSF-R group remained 100 % susceptible to voriconazole, whereas a reduced sensitivity of the ANF-R and MCF-R groups was also detected ( $P < 0.05$ ). Only the ANF-R group was less susceptible to flucytosine compared with the original group (ES) ( $P = 0.01$ ).

**Table 3** Comparison of the susceptibility of *C. parapsilosis* susceptible and resistant to antifungal agents

Antifungal agents	Group of isolates (n = 10)	MIC range (µg/mL)	MIC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIC <sub>90</sub> (µg/mL)	Geometric mean	Percentage sensibility <sup>a</sup>
Amphotericin B	ANF-S	0.06–1.0	0.5	1.0	0.4	100
	ANF-R	0.25–1.0	0.25	0.50	0.37	100
	CSF-S	0.12–1.0	0.25	0.5	0.35	100
	CSF-R	0.03–0.25	0.06	0.25	0.09	100
	MCF-S	0.12–0.5	0.25	0.5	0.3	100
	MCF-R	0.03–0.5	0.5	0.5	0.3	100
Fluconazole	ANF-S	0.5–2.0	1.0	2.0	0.93	100
	ANF-R	1.0–8.0	8.0	8.0	5.65	20
	CSF-S	0.5–2.0	1.0	2.0	1.00	100
	CSF-R	0.5–8.0	2.0	4.0	1.62	40
	MCF-S	0.5–2.0	1.0	2.0	1.07	100
	MCF-R	1.0–8.0	8.0	8.0	5.27	20
Flucytosine	ANF-S	0.06–0.25	0.06	0.25	0.09	100
	ANF-R	0.06–32.0	0.12	32.0	0.43	80
	CSF-S	0.06–0.25	0.06	0.25	0.08	100
	CSF-R	0.06–32.0	0.25	32.0	0.75	70
	MCF-S	0.06–0.25	0.06	0.25	0.08	100
	MCF-R	0.06–32	0.06	1.00	0.15	90
Voriconazole	ANF-S	0.01–0.12	0.01	0.03	0.02	100
	ANF-R	0.01–0.5	0.06	0.5	0.12	50
	CSF-S	0.01–0.12	0.01	0.06	0.02	100
	CSF-R	0.01–0.06	0.03	0.06	0.03	100
	MCF-S	0.01–0.12	0.01	0.06	0.02	100
	MCF-R	0.01–8.0	0.50	8.00	0.71	20

ANF-S Anidulafungin susceptible; ANF-R anidulafungin resistant; CSF-S caspofungin susceptible, CSF-R caspofungin resistant; MCF-S micafungin susceptible; MCF-R micafungin resistant

MIC<sub>50</sub> Minimal inhibitory concentration for 50 % of strains

MIC<sub>90</sub> Minimal inhibitory concentration for 90 % of strains

<sup>a</sup> Amphotericin B MIC, ≤1 µg/ml; fluconazole MIC, ≤2 µg/mL; flucytosine MIC, ≤4 µg/mL; voriconazole MIC, ≤0.12 µg/mL

## Discussion

To our knowledge, the present study is the first to show that *C. parapsilosis* acquires resistance to echinocandins after in vitro exposure across all three echinocandins. We also showed acquiring echinocandin resistance affects the fluconazole, voriconazole, and flucytosine susceptibility profiles.

Recent guidelines recommend the use of echinocandins as the primary therapy for invasive candidiasis, even if the *Candida* species involved is unknown [25, 26]. This practice has favoured the emergence of *C. parapsilosis*, particularly in Latin American hospitals [8, 12, 26], and created a need to study *C. parapsilosis* susceptibility to echinocandins.

*C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* exhibit higher MICs compared with other species, although this does not necessarily indicate a reduced efficiency of these drugs [26, 27]. The document M27-S4 (CLSI, 2012)

corrected the breakpoints of *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii*, considering the specific characteristics of these species (MIC ≥ 8 µg/mL for resistance). Reports of *C. parapsilosis*-associated treatment failure and resistance to echinocandins are rare [13, 28–31], which prevents the full characterization of the phenomenon of resistance to echinocandins in this species.

Although resistance in vitro does not develop rapidly, 80 % of the strains we exposed to CSF changed from susceptible to non-susceptible. The strong capability of *C. parapsilosis* to acquire in vitro resistance to CSF is consistent with clinical observations reported by Forrest et al. [8] and Sipsas et al. [12].

Our cross-resistance results complement previous findings demonstrating in vitro *Candida* spp. cross-resistance between CSF and MCF and between ANF and CSF [11, 32, 33]. Among the *Candida* species,

cross-resistance to echinocandins is a well-characterized phenomenon and is related to mutations in the *FKS* gene [13, 34]. However, there are no reports showing *FKS* mutations among *C. parapsilosis* echinocandin-resistant isolates, other than the natural mutations discussing the elevated basal echinocandin MICs [30, 35]. Recently, Martí-Corrizosa et al. [35], studying *C. parapsilosis* echinocandin-resistant isolates, showed mutations out of HS1 or HS2 regions described as V595I and F1386S. Those authors suggested that other regions out of HS1 or HS2 could be related to the echinocandin resistance in *C. parapsilosis*.

Biochemical changes in the composition of cell walls exposed to echinocandins, such as thinning of the inner glucan and an increase in the inner chitin, can reduce the susceptibility to echinocandins [36–38]. Although not yet studied in the context of *C. parapsilosis*, sphingolipids can modulate the echinocandin–*FKS* interactions in *C. glabrata* and can change the susceptibility of these organisms to echinocandins [39]. These phenomena could explain the low cross-resistance observed in the present study. The clinical relevance of cross-resistance between the echinocandins is an important therapeutic obstacle. Therefore, studies using susceptibility testing to MCF [33] or to ANF [40] as markers of this resistance are in course. The inter-laboratory variability observed in tests with CSF does not apply to *C. parapsilosis* [41], which allows the use of CSF as a resistance marker. Applying these concepts to this study, the CSF would be a safer marker to use. Further studies using these markers are necessary to better define these issues.

As for the impact of the susceptibility of *C. parapsilosis* echinocandin-resistant strains, compared to the other classes of antifungal agents, our results detected the development of multiple resistance involving flucytosine and azoles. To our knowledge, there is only one previously reported case of multiple resistance involving echinocandins and azoles for *C. parapsilosis* [28], a phenomenon that seems to be more frequent in *C. glabrata* [42–44]. The evolution towards multidrug resistance involving echinocandins and azoles has been well documented in *C. glabrata*. This species has a haploid genome, which allows the resistance-conferring *FKS* mutations to be more easily expressed compared with diploid *Candida* species [30]. The resistance of *C. glabrata* to azoles is a known characteristic of this species [42]. Therefore, the

growing problem of multidrug resistance in *C. glabrata* can be well understood. The present study reports that multidrug resistance involving echinocandins and flucytosine can also occur in *C. parapsilosis*, although previous studies have only reported this phenomenon for *C. glabrata* [45].

The in vitro multidrug resistance in *C. parapsilosis* reported here is surprising and provokes more questions than answers. This resistance is probably caused by unknown mechanisms; however, the mutations described by Martí-Corrizosa et al. [35] may play a role. The implications of changes in the susceptibility of *C. parapsilosis* to azoles or flucytosine are unknown, and further studies are needed to assess the mechanisms and the impact on existing treatments. The failure to detect *C. parapsilosis* multidrug resistance to amphotericin B and echinocandins corroborates previous studies reporting the potent in vitro activity of amphotericin B [28].

Based on our findings and on the potential possibility of emergence of echinocandins-resistant *C. parapsilosis*, our results may ground future in vitro or experimental studies, thus contributing to better knowledge of the phenomenon of resistance to echinocandins. However, in the current scenario, the frequent monitoring of the susceptibility of *C. parapsilosis* to antifungals is essential to demonstrate these challenging issues.

**Acknowledgments** This study was funded by the National Council for Scientific and Technological Development—(CNPq; process #470229/2012-8) and by CAPES (Brazil).

## References

1. Peman J, Canton E, Linares-Sicilia MJ, Rosello EM, Borrell N, Ruiz-Perez-de-Pipaon MT, et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in pediatric patients: a Spanish multicenter prospective survey. *J Clin Microbiol*. 2011;49(12):4158–63.
2. Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(4):606–25.
3. Doi AM, Pignatari AC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LF, Siqueira RA, et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian National surveillance program. *PLoS ONE*. 2016;11(1):e0146909.
4. Ullmann AJ, Akova M, Herbrecht R, Viscoli C, Arendrup MC, Arian-Akdagli S, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after



- haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(Suppl 7):53–67.
5. Douglas CM, Foor F, Marrinan JA, Morin N, Nielsen JB, Dahl AM, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* *FKS1* (*ETG1*) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(26):12907–11.
  6. Kartsonis NA, Nielsen J, Douglas CM. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. *Drug Resist Updates.* 2003;6(4):197–218.
  7. Arendrup MC. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(Suppl 6):42–8.
  8. Forrest GN, Weekes E, Johnson JK. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. *J Infect.* 2008;56(2):126–9.
  9. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol.* 2010;36(1):1–53.
  10. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jimenez-Ortigosa C, Catania J, Booker R, et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of *FKS* mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis.* 2013;56(12):1724–32.
  11. Pfaller MA, Diekema DJ, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Alexander BD, Andes D, et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. *J Clin Microbiol.* 2008;46(8):2620–9.
  12. Sipsas NV, Lewis RE, Tarrand J, Hachem R, Rolston KV, Raad II, et al. Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001–2007): stable incidence but changing epidemiology of a still frequently lethal infection. *Cancer.* 2009;115(20):4745–52.
  13. Perlin DS. Echinocandin resistance, susceptibility testing and prophylaxis: implications for patient management. *Drugs.* 2014;74(14):1573–85.
  14. Kurtzman C, Fell JW. The yeasts: a taxonomic study. 4th ed. Amsterdam: Elsevier; 1998.
  15. White PL, Barton R, Guiver M, Linton CJ, Wilson S, Smith M, et al. A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis? A United Kingdom Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections. *J Mol Diagn.* 2006;8(3):376–84.
  16. White PL. Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. *J Med Microbiol.* 2003;52(3):229–38.
  17. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. *Jpn J Med Mycol.* 2006;47(3):225–9.
  18. Mirhendi H, Diba K, Rezaei A, Jalalizand N, Hosseinpour L, Khodadadi H. Colony-PCR is a rapid and sensitive method for DNA amplification in yeasts. *Iran J Public Health.* 2007;36(1):40–4.
  19. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):284–92.
  20. Tavanti A, Hensgens LA, Ghelardi E, Campa M, Senesi S. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *J Clin Microbiol.* 2007;45(5):1455–62.
  21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. 3rd ed. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
  22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 4th informational supplement. CLSI document M27-S4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
  23. Fekete-Forgacs K, Gyure L, Lenkey B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses.* 2000;43(7–8):273–9.
  24. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol.* 2012;50(9):2846–56.
  25. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48(5):503–35.
  26. Glockner A. Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis with anidulafungin, caspofungin and micafungin: review of the literature. *Eur J Med Res.* 2011;16(4):167–79.
  27. Kale-Pradhan PB, Morgan G, Wilhelm SM, Johnson LB. Comparative efficacy of echinocandins and nonechinocandins for the treatment of *Candida parapsilosis* Infections: a meta-analysis. *Pharmacotherapy.* 2010;30(12):1207–13.
  28. Moudgal V, Little T, Boikov D, Vazquez JA. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):767–9.
  29. Kabbara N, Lacroix C, Peffault de Latour R, Socie G, Ghannoum M, Ribaud P. Breakthrough *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* blood stream infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients receiving long-term caspofungin therapy. *Haematologica.* 2008;93(4):639–40.
  30. Pfeiffer CD, Garcia-Effron G, Zaas AK, Perfect JR, Perlin DS, Alexander BD. Breakthrough invasive candidiasis in patients on micafungin. *J Clin Microbiol.* 2010;48(7):2373–80.
  31. Cheung C, Guo Y, Gialanella P, Feldmesser M. Development of candidemia on caspofungin therapy: a case report. *Infection.* 2006;34(6):345–8.
  32. Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR, et al. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updates.* 2011;14(3):164–76.
  33. Pfaller MA, Messer SA, Diekema DJ, Jones RN, Castanheira M. Use of micafungin as a surrogate marker to predict

- susceptibility and resistance to caspofungin among 3,764 clinical isolates of *Candida* by Use of CLSI methods and interpretive criteria. *J Clin Microbiol.* 2014;52(1):114.
34. Arendrup MC, Perlin DS. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? *Curr Opin Infect Dis.* 2014;27(6):484–92.
  35. Marti-Carrizosa M, Sanchez-Reus F, March F, Canton E, Coll P. Implication of *Candida parapsilosis* *FKS1* and *FKS2* mutations in reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3570–3.
  36. Lee KK, Maccallum DM, Jacobsen MD, Walker LA, Odds FC, Gow NA, et al. Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(1):208–17.
  37. Bizerra FC, Melo AS, Katchburian E, Freymuller E, Straus AH, Takahashi HK, et al. Changes in cell wall synthesis and ultrastructure during paradoxical growth effect of caspofungin on four different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(1):302–10.
  38. Walker LA, Gow NA, Munro CA. Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):146–54.
  39. Healey KR, Katiyar SK, Raj S, Edlind TD. CRS-MIS in *Candida glabrata*: sphingolipids modulate echinocandin-Fks interaction. *Mol Microbiol.* 2012;86(2):303–13.
  40. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Castanheira M. Use of anidulafungin as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to caspofungin among 4,290 clinical isolates of *Candida* by using CLSI methods and interpretive criteria. *J Clin Microbiol.* 2014;52(9):3223–9.
  41. Espinel-Ingroff A, Arendrup MC, Pfaller MA, Bonfietti LX, Bustamante B, Canton E, et al. Interlaboratory variability of Caspofungin MICs for *Candida* spp. Using CLSI and EUCAST methods: should the clinical laboratory be testing this agent? *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(12):5836–42.
  42. Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in intensive care unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38(1):65–9.
  43. Cho EJ, Shin JH, Kim SH, Kim HK, Park JS, Sung H, et al. Emergence of multiple resistance profiles involving azoles, echinocandins and amphotericin B in *Candida glabrata* isolates from a neutropenia patient with prolonged fungaemia. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(4):1268–70.
  44. Wang E, Farmakiotis D, Yang D, McCue DA, Kantarjian HM, Kontoyiannis DP, et al. The ever-evolving landscape of candidaemia in patients with acute leukaemia: non-susceptibility to caspofungin and multidrug resistance are associated with increased mortality. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(8):2362–8.
  45. Chapeland-Leclerc F, Hennequin C, Papon N, Noel T, Girard A, Socie G, et al. Acquisition of flucytosine, azole, and caspofungin resistance in *Candida glabrata* bloodstream isolates serially obtained from a hematopoietic stem cell transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):1360–2.

**2 MANUSCRITO 1****Activity of antifungal agentes alone and in combination against echinocandin-susceptible and –resistant *Candida parapsilosis* strains**

Francieli Chassot <sup>a,\*</sup>, Tarcieli Pozzebon Venturini <sup>a</sup>, Fernanda Baldissera Piasentin <sup>a</sup>,  
Janio Morais Santurio <sup>b</sup>, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski <sup>c</sup>, Sydney Hartz Alves <sup>a</sup>

**TITLE:** Activity of antifungal agents alone and in combination against echinocandin-susceptible and -resistant *Candida parapsilosis* strains

**TITULO:** Actividad de los agentes antifúngicos solo y en combinación frente a cepas de *Candida parapsilosis* equinocandinas-susceptibles y -resistentes

Francieli Chassot <sup>a,\*</sup>, Tarcieli Pozzebon Venturini <sup>a</sup>, Fernanda Baldissera Piasentin <sup>a</sup>, Janio Morais Santurio <sup>b</sup>, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski <sup>c</sup>, Sydney Hartz Alves <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil; <sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil; <sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Biociências aplicada à Farmácia, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil.

**\*Address for correspondence:**

Francieli Chassot

*Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Av. Roraima n° 1000, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria- CEP 97105-900, RS, Brazil. Tel./fax: +55 55 3220-8906. E-mail: francielichassot@gmail.com*

## ABSTRACT

*Background:* *Candida parapsilosis* may acquire resistance to echinocandins, thus prompting the search for new therapeutic options.

*Aims:* The present study aimed to evaluate the *in vitro* activity of antifungal agents, alone and in combination, against four groups of *C. parapsilosis* strains: 1) echinocandin-susceptible (ES) clinical isolates, 2) anidulafungin-resistant strains, 3) caspofungin-resistant strains, and 4) micafungin-resistant strains.

*Methods:* Antifungal interactions were evaluated by a checkerboard micro-dilution method that also included determination of the MIC for each drug according to the Clinical and Laboratory Standards Institute documents M27-A3 (2008) and M27-S4 (2012).

*Results:* The echinocandins-resistant (ER) derivatives were less susceptible to the tested antifungals than the ES strains, except amphotericin B, for which the ER groups remained susceptible. For ES and ER strains, the main interaction demonstrate was the indifferent activity and, in most cases, a percentage of antagonism was evidenced primarily for ER strains.

*Conclusions:* Most combinations showed indifferent interactions. The use of antifungals alone still seems the best option, based on this *in vitro* test. As resistance to echinocandins is an emergent phenomenon, further studies are required to provide clearer information on the susceptibility differences between strains to these antifungals agents.

*Keywords:* *Candida parapsilosis*, antifungal drug resistance, antifungal agents, echinocandins.

## RESUMEN

*Antecedentes:* *Candida parapsilosis* puede adquirir resistencia a las equinocandinas, lo que requiere la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas.

*Objetivos:* El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad *in vitro* de los antifúngicos solo y en combinación contra cuatro grupos de cepas de *C. parapsilosis*: 1) equinocandina-susceptible (ES) aislamientos clínicos, 2) cepas anidulafungina-resistente, 3) cepas caspofungina-resistente, y 4) cepas micafungina-resistente.

*Métodos:* interacciones antifúngicas fueron evaluadas según el método de microdilución en tablero de ajedrez que también incluía la determinación de la CMI de cada antifúngico de acuerdo con los guidelines del *Clinical and Laboratory Standards Institute* M27-A3 (2008) y M27-S4 (2012).

*Resultados:* Las cepas equinocandina-resistente (ER) fueron menos susceptibles a los antifúngicos probados que las cepas ES, a excepción de la anfotericina B, pues los grupos ER permanecieron susceptibles a esta. Para las cepas ES y ER, la principal interacción demostrada fue la actividad indiferente, además, en la mayoría de los casos, un porcentaje de antagonismo se evidenció, principalmente, para las cepas ER.

*Conclusiones:* La mayoría de las combinaciones evidenciaron interacciones indiferentes. El uso de solo un antimicótico parece la mejor opción. Como la resistencia a las equinocandinas es un fenómeno emergente, se requieren estudios adicionales con el fin de proporcionar una información más clara acerca de las diferencias de susceptibilidad entre las cepas a esos agentes antifúngicos.

*Palabras clave:* *Candida parapsilosis*, resistencia a los fármacos antifúngicos, agentes antifúngicos, equinocandinas.

## Introduction

*Candida parapsilosis* is one of the most common non-*albicans* *Candida* species isolated in Latin America, Europe, and Asia<sup>5, 9, 18</sup>. Echinocandins are recommended as the first-line treatment for invasive candidemia<sup>19, 25</sup>. However, *C. parapsilosis* naturally requires higher concentrations of echinocandins for treatment than other species, and has additionally been reported to gain resistance after continuous treatment with these drugs<sup>17</sup>. The substantial increase in fungal infections that are refractory to current therapy has aroused a great interest in combinatorial treatment with antifungal agents<sup>12</sup>. However, the activities of antifungal combinations against echinocandins-resistant (ER) *C. parapsilosis* strains have not been studied yet.

In this study, we evaluated the *in vitro* activity of amphotericin B, flucytosine, fluconazole, and voriconazole, alone and in combination, against echinocandin-susceptible and -resistant *C. parapsilosis* strains.

## Materials and methods

We studied four groups of *C. parapsilosis* strains: the first included 30 clinical echinocandin-susceptible (ES) isolates obtained from the Mycological Research Laboratory at the Federal University of Santa Maria, Brazil, identified by standard methods<sup>14</sup> and molecular methods<sup>24</sup>. The second group was named anidulafungin-resistant (AR; n = 10), the third group was caspofungin-resistant (CR; n = 10), and the fourth group was micafungin-resistant (MR; n = 10). The resistant strains were obtained from susceptible isolates after successive exposure to echinocandins, following the method described by Fekete-Forgács et al.<sup>7</sup>.

Amphotericin B (AMB), flucytosine (5FC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); fluconazole (FLZ), voriconazole (VCZ), and anidulafungin (Pfizer Pharmaceutical Group, New York, NY); caspofungin (Merck, Darmstadt, Germany), and micafungin (Astellas, Chuo, Tokyo, Japan) were obtained as standard powders and were prepared in accordance with the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>10, 11</sup>. Susceptibility tests were performed according to the CLSI M27-A3 micro-dilution technique and the results were interpreted as described in the M27-S4 document<sup>10, 11</sup>. Antifungal interactions were evaluated by the broth micro-dilution checkerboard method<sup>12</sup>. A synergistic interaction was defined as fractional inhibitory concentration index (FICI)  $\leq 0.5$ , indifference  $0.5 < \text{FICI} \leq 4.0$  and, antagonism  $\text{FICI} > 4.0$ <sup>15</sup>. The *C. parapsilosis* strain ATCC 22019 and the *C. krusei* strain ATCC 6258 were used as quality controls. All assays were performed in duplicate. MICs were analyzed by the non-parametric Wilcoxon's paired t-test.

## Results

The susceptibilities described for the ES and ER groups are presented in Table 1. ER derivatives were statistically less susceptible to 5FC and azoles than the ES strains ( $P < 0.05$ ). The only exception was the CR group, which did not show any change in susceptibility profile to VCZ. All ER strains remained susceptible to AMB.

Table 2 shows the percentages of antifungal agents interactions, against the ES and ER groups of *C. parapsilosis*. Indifferent activity was the main interaction shown for the ES and ER strains. Against ES strains, the interactions of 5FC with AMB or VCZ and FLZ+VCZ did not exhibit antagonism and showed similar percentages of synergism and indifference. Antagonistic interactions were demonstrated by the



combinations AMB+FLZ (53.3%), AMB+VCZ (50%), and FLZ+5FC (13.3%). All combinations for the ER group showed percentages of antagonism, except the combination AMB+FLZ against the AR group which showed synergism (30%) and indifference (70%).

## Discussion

Resistance to echinocandins is an emerging and alarming phenomenon in *C. parapsilosis*, because these strains may show resistance to azole and other antifungals, resulting in the emergence of multi-drug resistant strains and difficulties for antifungal therapy. Combined antifungal therapy can be a potential strategy to improve the prognosis of some fungal infections.

The ES *C. parapsilosis* showed marked sensitivity to all the antifungal agents tested alone, as previously described<sup>1, 3, 20, 21</sup>. ER derivatives were less susceptible to the antifungals tested than the sensitive strains, except AMB, for which the ER groups remained susceptible. To our knowledge, there is only one reported case of multiple resistance involving echinocandins and azoles for *C. parapsilosis*<sup>17</sup>. This study shows that multidrug resistance involving echinocandins and 5FC can also occur in *C. parapsilosis*, whereas previous studies have reported that this phenomenon is emerging for *C. glabrata*<sup>6</sup>. Failure in the detection of *C. parapsilosis* multi-drug resistance involving AMB and echinocandins corroborates previous studies that confirm the potent *in vitro* activity of AMB<sup>17</sup>.

Investigation of the combination of AMB with 5FC has yielded mixed results, depending on the conditions and test employed. The predominant interaction observed in the *Candida* species is synergism<sup>15, 16</sup>; however, indifference has also been observed

by Kelle et al.<sup>13</sup>. Our results showed predominance of indifference for the ES, AR, and CR groups and antagonism for the MR group. The mechanism of the antagonistic effect to polyenes and 5FC is still unknown. Shadomy et al.<sup>22</sup> suggested that antagonistic interactions between these agents might be related to changes in fungal cell membrane functions due to the effects of AMB.

The combination of 5FC with VCZ or FLZ showed increased antagonism against the ER strains than against the ES strains. *In vitro* testing of VCZ+5FC by Barchiesi et al.<sup>4</sup> showed 5% synergy, 95% indifference, and no antagonism against *C. glabrata* isolates. Steier et al.<sup>23</sup> observed that mitochondrial dysfunction resulting in Pdr1 (Positive regulator of proteins involved in permeability) activation is the likely basis for 5FC antagonism of azole activity versus *C. glabrata*.

Although the majority of reports mentions antagonism between AMB and azoles, data from *in vitro* studies remain controversial, as indifferent, additive and antagonistic interactions have also been described<sup>2, 4</sup>. Here, the combination of AMB and azoles resulted in antagonism against the ES groups and mostly indifference against the ER groups. The combination of FLZ+VCZ against the ER group showed increased antagonism and the indifference percentage in the ES group (86.66%) was higher to that found by Ghannoum and Isham<sup>8</sup> (42%) against *Candida* isolates.

In summary, the combined activities of antifungal agents against of *C. parapsilosis* were disappointing if we consider that a high percentage of indifference was observed in most cases and that in some of these cases, the antagonism was quite high. The use of antifungal agents alone seems to be the best option currently, however, as resistance to echinocandins and cross-resistance to some antifungals increase, the treatment of infections by such isolates will be more daunting. Further *in vivo* studies

are required to elucidate the susceptibility differences between strains that are susceptible or resistant to echinocandins.

#### **CONFLICT OF INTEREST**

All authors agree that no conflict of interest exists for the publication of this paper.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – (CNPq; process #470229/2012-8) and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES).

## REFERENCES

1. Altuncu E, Bilgen H, Soysal A, Ozek E. Successful Treatment of *Candida parapsilosis* Fungemia in Two Preterms with Voriconazole. *Case Rep Pediatr.* 2015;2015.
2. Alves IA, Bandeira LA, Mario DA, Denardi LB, Neves LV, Santurio JM, et al. Effects of antifungal agents alone and in combination against *Candida glabrata* strains susceptible or resistant to fluconazole. *Mycopathologia.* 2012;174(3):215-21.
3. Arora N, Parihar M, Mishra D, Bhattacharya S, Chakrapani A. *Candida parapsilosis* in peripheral blood. *Indian J Pathol Microbiol.* 2014;57(4):645.
4. Barchiesi F, Spreghini E, Maracci M, Fothergill AW, Baldassarri I, Rinaldi MG, et al. In vitro activities of voriconazole in combination with three other antifungal agents against *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(9):3317-22.
5. Caggiano G, Coretti C, Bartolomeo N, Lovero G, De Giglio O, Montagna MT. *Candida* Bloodstream Infections in Italy: Changing Epidemiology during 16 Years of Surveillance. *Biomed Res Int.* 2015;2015:256580.
6. Chapeland-Leclerc F, Hennequin C, Papon N, Noel T, Girard A, Socie G, et al. Acquisition of flucytosine, azole, and caspofungin resistance in *Candida glabrata* bloodstream isolates serially obtained from a hematopoietic stem cell transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):1360-2.
7. Fekete-Forgacs K, Gyure L, Lenkey B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses.* 2000;43(7-8):273-9.
8. Gahannoum M, Isham N. Abstr. 29th Annu. Meet. Eur. Group Blood and Marrow Transplant. 2003.

9. Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20 Suppl 6:5-10.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. 3rd ed. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 4th informational supplement. CLSI document M27-S4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
12. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(3):693-715.
13. Keele DJ, DeLallo VC, Lewis RE, Ernst EJ, Klepser ME. Evaluation of amphotericin B and flucytosine in combination against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001;41(3):121-6.
14. Kurtzman C, Fell JW. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 4rd ed. Amsterdam: Elsevier; 1998.
15. Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, Klepser ME. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49(2):345-51.
16. Montgomerie JZ, Edwards JE, Jr., Guze LB. Synergism of amphotericin B and 5-fluorocytosine for *Candida* species. *J Infect Dis*. 1975;132(1):82-6.
17. Moudgal V, Little T, Boikov D, Vazquez JA. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(2):767-9.

18. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One*. 2013;8(3):e59373.
19. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Jr., Calandra TF, Edwards JE, Jr., et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48(5):503-35.
20. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ng KP, Colombo A, et al. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol*. 2008;46(3):842-9.
21. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Rice C, Tendolkar S, et al. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;48(3):201-5.
22. Shadomy S, Wagner G, Espinel-Ingroff E, Davis BA. In vitro studies with combinations of 5-fluorocytosine and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 1975;8(2):117-21.
23. Steier Z, Vermitsky JP, Toner G, Gyax SE, Edlind T, Katiyar S. Flucytosine antagonism of azole activity versus *Candida glabrata*: role of transcription factor Pdr1 and multidrug transporter Cdr1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(11):5543-7.
24. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):284-92.

25. Ullmann AJ, Akova M, Herbrecht R, Viscoli C, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin Microbiol Infect.* 2012;18 Suppl 7:53-67.

Table 1 – *In vitro* susceptibility ( $\mu\text{g/mL}$ ) of echinocandin-susceptible and echinocandin-resistant *C. parapsilosis* strains to amphotericin B (AMB), flucytosine (5FC), fluconazole (FLZ) and voriconazole (VCZ).

Antifungal Agents	Groups	MIC echinocandins ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC Range	Geometric mean	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Percentage sensibility <sup>a</sup>
AMB	ES	$\leq 2$	0.03-1.00	0.24	0.25	0.50	100
	AR	$\geq 8$	0.25-1.00	0.37	0.25	0.50	100
	CR	$\geq 8$	0.03-0.25	0.09	0.06	0.25	100
	MR	$\geq 8$	0.03-0.50	0.30	0.50	0.50	100
5FC	ES	$\leq 2$	0.06-32.0	0.16	0.06	0.25	100
	AR*	$\geq 8$	0.06-32.0	0.43	0.12	32.0	80
	CR*	$\geq 8$	0.06-32.0	0.75	0.25	32.0	70
	MR*	$\geq 8$	0.06-32.0	0.15	0.06	1.00	90
FLZ	ES	$\leq 2$	0.05-8.00	1.25	1.00	2.00	100
	AR*	$\geq 8$	1.00-8.00	5.65	8.00	8.00	20
	CR*	$\geq 8$	0.50-8.00	1.62	2.00	4.00	40
	MR*	$\geq 8$	1.00-8.00	5.27	8.00	8.00	20
VCZ	ES	$\leq 2$	0.01-0.12	0.02	0.01	0.06	100
	AR*	$\geq 8$	0.01-0.50	0.12	0.06	0.50	50
	CR	$\geq 8$	0.01-0.06	0.03	0.03	0.06	100
	MR*	$\geq 8$	0.01-8.00	0.71	0.50	8.00	20

ES: echinocandin-susceptible (n=30), AR: anidulafungin-resistant (n=10); CR: caspofungin-resistant (n=10); MR: micafungin-resistant (n=10);

MIC<sub>50</sub> = Minimal inhibitory concentration for 50% of strains;

MIC<sub>90</sub> = Minimal inhibitory concentration for 90% of strains;

<sup>a</sup>Amphotericin B MIC,  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ ; fluconazole MIC,  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ ; flucytosine MIC,  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ ; voriconazole MIC,  $\leq 0.12 \mu\text{g/mL}$ .

\*ER derivatives were statistically less susceptible to 5FC and azoles than the ES strains ( $P < 0.05$ ).



Table 2 – *In vitro* antifungal interactions of amphotericin B (AMB), flucytosine (5FC), fluconazole (FLZ) and voriconazole (VCZ) against echinocandin-susceptible and echinocandin-resistant *C. parapsilosis* strains.

Antifungal Combinations	Group of isolates	Interaction (%)		
		Synergy	Indifference	Antagonism
AMB + 5FC	ES	30	69.99	0
	AR	20	60	20
	CR	0	70	30
	MR	10	10	80
AMB + FLZ	ES	0	46.66	53.33
	AR	30	70	0
	CR	0	70	30
	MR	0	90	10
AMB + VCZ	ES	0	49.99	50
	AR	0	90	10
	CR	0	40	60
	MR	0	70	30
FLZ + 5FC	ES	3.33	83.33	13.33
	AR	20	60	20
	CR	0	80	20
	MR	10	10	80
FLZ + VCZ	ES	13.33	86.66	0
	AR	40	50	10
	CR	0	80	20
	MR	70	10	20
VCZ+5FC	ES	26.66	73.33	0
	AR	10	70	20
	CR	0	70	30
	MR	10	10	80

ES: echinocandin-susceptible, AR: anidulafungin-resistant; CR: caspofungin-resistant; MR: micafungin-resistant.

### 3 MANUSCRITO 2

**Antifungal activities of diphenyl diselenide and ebselen against echinocandin-susceptible and –resistant strains of *Candida parapsilosis***

Francieli Chassot <sup>a\*</sup>, Tarcieli Pozzebon Venturini <sup>a</sup>, Fernanda Baldissera Piasentin <sup>a</sup>,  
Janio Morais Santurio <sup>c</sup>, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski <sup>b</sup>, Sydney Hartz Alves <sup>a</sup>

**Title:** Antifungal activities of diphenyl diselenide and ebselen against echinocandin-susceptible and -resistant strains of *Candida parapsilosis*

**Authors:** Francieli Chassot <sup>a\*</sup>, Tarcieli Pozzebon Venturini <sup>a</sup>, Fernanda Baldissera Piasentin <sup>a</sup>, Janio Morais Santurio <sup>b</sup>, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski <sup>c</sup>, Sydney Hartz Alves <sup>a</sup>

**Affiliations:** <sup>a</sup>Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Centre, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil; <sup>b</sup>Postgraduate Program in Pharmacology, Health Sciences Centre, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil; <sup>c</sup>Postgraduate Program in Biosciences and Pathophysiology, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringa, PR, Brazil.

**\*Address for correspondence:**

Francieli Chassot

*Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Av. Roraima n° 1000, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria- CEP 97105-900, RS, Brazil. Tel./fax: +55 55 3220-8906. E-mail: francielichassot@gmail.com*

## ABSTRACT

We evaluated the *in vitro* antifungal activity of diphenyl diselenide and ebselen against echinocandin-susceptible and -resistant strains of *Candida parapsilosis* using the broth microdilution method. Diphenyl diselenide (MIC range=1-8 $\mu$ g/mL) and ebselen (MIC range=0.25-4 $\mu$ g/mL) showed *in vitro* activity against echinocandin-susceptible isolates. However, ebselen also showed the highest antifungal activity against echinocandin-resistant strains (MIC range=0.06-4 $\mu$ g/mL). This study demonstrated that the antifungal potential of diphenyl diselenide and ebselen deserves further investigation using *in vivo* experimental protocols.

## SHORT COMMUNICATION

*C. parapsilosis* is the second most common agent of fungal infection in South American, Mediterranean, and Asian countries (Guinea, 2014; Montagna et al., 2014; Wu et al., 2014; Doi et al., 2016). However, it naturally requires higher concentrations of echinocandins for treatment than other species, and has additionally been reported to develop resistance against echinocandins after continuous treatment (Moudgal et al., 2005). In order to overcome the concern of fungal resistance, *in vitro* evaluation of new candidates is required. The organoselenium compounds diphenyl diselenide ([PhSe]<sub>2</sub>) and ebselen deserve attention because their antifungal activity has been scarcely tested, but the reported results were encouraging. As far as we know, the effect of (PhSe)<sub>2</sub> and ebselen against echinocandin-resistant *C. parapsilosis* has not been previously demonstrated. This study aims to evaluate the *in vitro* activity of two organoselenium

compounds, (PhSe)<sub>2</sub> and ebselen, against echinocandin-susceptible and echinocandin-resistant *C. parapsilosis* isolates.

We studied four groups of *C. parapsilosis* strains: the first included thirty clinical echinocandin-susceptible (ES) isolates obtained from the Mycological Research Laboratory (LAPEMI) of the Federal University of Santa Maria, Brazil. These isolates were identified by standard methods (Kurtzman and Fell, 1998) and molecular methods (Tavanti et al., 2005; Tavanti et al., 2007). The echinocandin-resistant (ER) group included three subgroups - (a) anidulafungin-resistant strains (AR) (n=14), (b) caspofungin-resistant strains (CR) (n=19) and, (c) micafungin-resistant strains (MR) (n=18) - all of which were obtained from susceptible isolates by exposing them to increasing concentrations of echinocandins using the *in vitro* method described by Fekete-Forgács et al. (2000).

Diphenyl diselenide ([PhSe]<sub>2</sub>) was synthesised according to the method described by Paulmier (Paulmier, 1986). Ebselen (2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3[2H]-one) was synthesised according to the method of Engman & Hallberg (Lars and Anders, 1989). Spectral analysis of the <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR were in accordance with the assigned structure. The chemical purity of the compounds (99.9%) was determined by gas chromatography/high-performance liquid chromatography (GC/HPLC). Susceptibility tests were performed according to the CLSI M27-A3 microdilution method and were interpreted by the M27-S4 document (CLSI, 2008; CLSI, 2012). *C. parapsilosis* strain ATCC 22019 and *C. krusei* strain ATCC 6258 were used as quality controls. All assays were performed in triplicate.

The results of the tests of the *in vitro* susceptibility of *C. parapsilosis* isolates to (PhSe)<sub>2</sub> and ebselen are described in Table 1. Based on susceptibility parameters (MIC range, MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>, and geometric mean), the ES *C. parapsilosis* group was very

susceptible to ebselen, showing an MIC<sub>90</sub> of 1µg/mL and a geometric mean (GM) of 0.54µg/mL. For inhibition, the MR group required higher concentrations of ebselen, with an MIC<sub>90</sub> of 2µg/mL and a geometric mean of 0.70µg/mL. The AR and CR groups showed an MIC<sub>90</sub> of 0.5 and 2µg/mL and a geometric mean of 0.26 and 0.33µg/mL, respectively.

Susceptibility tests of the ES group to (PhSe)<sub>2</sub> showed an MIC<sub>90</sub> of 8µg/mL and a geometric mean of 2µg/mL. On the contrary, most strains of the AR, CR, and MR groups were less susceptible to (PhSe)<sub>2</sub> than ebselen, as demonstrated by an MIC<sub>90</sub> of 64µg/mL and geometric means varying from 46.08 to 61.58µg/mL.

In this study, we observed the *in vitro* antifungal activity of (PhSe)<sub>2</sub> and ebselen against ES *C. parapsilosis*, with MIC ranges (GM) of 2-8µg/mL (2.0) and 0.5-1µg/mL (0.54), respectively. Our results partially confirm the antifungal properties of these compounds previously noted in other studies, where (PhSe)<sub>2</sub> exhibited antifungal activity toward selected strains of *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., and the oomycete *Pythium insidiosum* (Loreto et al., 2011; Loreto et al., 2012; Denardi et al., 2013; Rosseti et al., 2015). Resembling (PhSe)<sub>2</sub>, the synthetic organoselenium compound ebselen has also shown potential antifungal activity against *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *A. niger*, *Microsporium gypseum*, *P. chrysogenum*, and *Penicillium citrinum* (Soteropoulos et al., 2000; Wojtowicz et al., 2004; Moreira Rosa et al., 2005; Chan et al., 2007; Billack et al., 2009). Previously, it was observed in experimental studies that subcutaneous or oral administration of (PhSe)<sub>2</sub> had no acute lethal toxic effects in rodents (Meotti et al., 2003; Luchese et al., 2007; Wilhelm et al., 2009; Nogueira and Rocha, 2011). For ER strains (groups AR, CR, and MR), only ebselen showed effective antifungal activity. Billack et al. (2009) observed the potent *in vitro*

activity of ebselen against fluconazole-resistant strains of *C. albicans*. Until now, the efficacy of (PhSe)<sub>2</sub> and ebselen on echinocandin-resistant fungi remains unknown.

Diphenyl diselenide is a simple, stable, and highly lipophilic organoselenium compound that is widely used as an intermediate in organic synthesis. The biological mechanism of the antifungal activity of (PhSe)<sub>2</sub> and ebselen involves their interactions with the sulfhydryl groups of the biomolecules present in fungal cells (Mugesh et al., 2001; Wojtowicz et al., 2004). Moreira Rosa et al. (2005) showed that *in vitro* assays of (PhSe)<sub>2</sub> interacts non-enzymatically with the thiol group of glutathione, and according to Wojtowicz et al. (2003), the portion Se-Se is capable of covalently interact with these groups. Similarly, the biological mechanism of the antifungal activity of ebselen involves their interactions of selenenamide Se–N moiety with sulfhydryl groups of biomolecules present in the living cells (Parnham and Graf, 1991; Mugesh et al., 2001). Probably the observed differences in the activity to the diselenide and the ebselen resulted from different polarity and shape of these compound molecules. According to Rosseti et al. (2015) it was observed that (PhSe)<sub>2</sub> can decrease both growth and biofilm formation of *C. albicans* through mechanisms involving increase in reactive oxygen species (ROS) production and membrane permeability. The ROS can promote damage to DNA, proteins, and cell membranes, leading to cell death (Imlay, 2003). The (PhSe)<sub>2</sub> can act as a pro-oxidant in yeasts by reducing the levels of cellular glutathione (GSH), which plays an important role in the antioxidant defence of the cell (Moreira Rosa et al., 2005). The antifungal properties of ebselen appear to be partly related to its ability to inhibit the fungal plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase (Pma1p) (Soteropoulos et al., 2000; Chan et al., 2007), an enzyme used by yeast to establish proton gradients across the plasma membrane and to maintain a proper intracellular pH (Serrano et al., 1986; Monk and Perlin, 1994). Interference of the function of H<sup>+</sup>ATPase in fungi by antagonists will

lead to cell death. Thus, use of the plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase as a molecular target for antifungal drug therapy is an attractive possibility, provided that inhibition of the enzyme activity correlates with the cessation of cell growth. The antifungal activity of ebselen could be due to its ability to interact with the sulfhydryl group of one or more L-cysteine residues within Pma1p that are critical for H<sup>+</sup> transport (Chan et al., 2007). Billack et al. (2009) suggested that the ebselen may serve as a useful agent in the treatment of infections caused by fluconazole-resistant fungi due at least in part to inhibition of Pma1p, and Monk et al. (1993) previously demonstrated that the inhibition of *C. albicans* growth was correlated with the inhibition of the H<sup>+</sup>ATPase of this organism.

In conclusion, our findings demonstrated that (PhSe)<sub>2</sub> and ebselen exhibit *in vitro* antifungal activity towards *C. parapsilosis*, highlighting that ebselen, by its ability to inhibit the growth of echinocandin-resistant strains, presents significant potential as a candidate antifungal agent for future experimental studies.



## REFERENCES

- BILLACK B., SANTORO M., LAU-CAM C. (2009). Growth inhibitory action of ebselen on fluconazole-resistant *Candida albicans*: role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Microb Drug Resist.* 15, 77-83.
- CHAN G., HARDEJ D., SANTORO M., LAU-CAM C., BILLACK B. (2007). Evaluation of the antimicrobial activity of ebselen: role of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biochem Mol Toxicol.* 21, 252-64.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. 3rd ed. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (2012). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 4th informational supplement. CLSI document M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA.
- DENARDI L.B., MARIO D.A., DE LORETO E.S., NOGUEIRA C.W., SANTURIO J.M., ALVES S.H. (2013). Antifungal activities of diphenyl diselenide alone and in combination with fluconazole or amphotericin B against *Candida glabrata*. *Mycopathologia.* 176, 165-9.
- DOI A.M., PIGNATARI A.C., EDMOND M.B., MARRA A.R., CAMARGO L.F., SIQUEIRA R.A., DA MOTA V.P., COLOMBO A.L. (2016). Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoS One.* 11, e0146909.
- FEKETE-FORGACS K., GYURE L., LENKEY B. (2000). Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses.* 43, 273-9.
- GUINEA J. (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect.* 20 Suppl 6, 5-10.
- IMLAY J.A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol.* 57, 395-418.
- KURTZMAN C., FELL J.W. *The Yeasts: A Taxonomic Study.* 4rd. Amsterdam: Elsevier, 1998.
- LARS E., ANDERS H. (1989). Expedient synthesis of ebselen and related compounds. *The Journal of Organic Chemistry.* 54, 2966.
- LORETO E.S., ALVES S.H., SANTURIO J.M., NOGUEIRA C.W., ZENI G. (2012). Diphenyl diselenide *in vitro* and *in vivo* activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. *Vet Microbiol.* 156, 222-6.

LORETO E.S., MARIO D.A., SANTURIO J.M., ALVES S.H., NOGUEIRA C.W., ZENI G. (2011). *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationship of diphenyl diselenide and synthetic analogues. *Mycoses*. 54, e572-6.

LUCHESE C., BRANDAO R., DE OLIVEIRA R., NOGUEIRA C.W., SANTOS F.W. (2007). Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. *Toxicol Lett*. 173, 181-90.

MEOTTI F.C., BORGES V.C., ZENI G., ROCHA J.B., NOGUEIRA C.W. (2003). Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicol Lett*. 143, 9-16.

MONK B.C., NIIMI M., SHEPHERD M.G. (1993). The *Candida albicans* plasma membrane and H<sup>+</sup>-ATPase during yeast growth and germ tube formation. *J Bacteriol*. 175, 5566-74.

MONK B.C., PERLIN D.S. (1994). Fungal plasma membrane proton pumps as promising new antifungal targets. *Crit Rev Microbiol*. 20, 209-23.

MONTAGNA M.T., LOVERO G., BORGHI E., AMATO G., ANDREONI S., CAMPION L., LO CASCIO G., LOMBARDI G., LUZZARO F., MANSO E., MUSSAP M., PECILE P., PERIN S., TANGORRA E., TRONCI M., IATTA R., MORACE G. (2014). Candidemia in intensive care unit: a nationwide prospective observational survey (GISIA-3 study) and review of the European literature from 2000 through 2013. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 18, 661-74.

MOREIRA ROSA R., DE OLIVEIRA R.B., SAFFI J., BRAGA A.L., ROESLER R., DAL-PIZZOL F., FONSECA MOREIRA J.C., BRENDEL M., PEGAS HENRIQUES J.A. (2005). Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions. *Life Sci*. 77, 2398-411.

MOUDGAL V., LITTLE T., BOIKOV D., VAZQUEZ J.A. (2005). Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*. 49, 767-9.

MUGESH G., DU MONT W.W., SIES H. (2001). Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. *Chem Rev*. 101, 2125-79.

NOGUEIRA C.W., ROCHA J.B. (2011). Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol*. 85, 1313-59.

PARNHAM M.J., GRAF E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. In: (Ed.). *Progress in Drug Research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/Progrès des recherches pharmaceutiques*: Birkhäuser Basel, 1991.

PAULMIER C. Selenium reagents and intermediates in organic synthesis. 1st. Oxford Oxfordshire; New York: Pergamon, 1986.

ROSSETI I.B., ROCHA J.B., COSTA M.S. (2015). Diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub> inhibits biofilm formation by *Candida albicans*, increasing both ROS production and membrane permeability. *J Trace Elem Med Biol.* 29, 289-95.

SERRANO R., KIELLAND-BRANDT M.C., FINK G.R. (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Nature.* 319, 689-93.

SOTEROPOULOS P., VAZ T., SANTANGELO R., PADERU P., HUANG D.Y., TAMAS M.J., PERLIN D.S. (2000). Molecular characterization of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, an antifungal target in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44, 2349-55.

TAVANTI A., DAVIDSON A.D., GOW N.A., MAIDEN M.C., ODDS F.C. (2005). *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol.* 43, 284-92.

TAVANTI A., HENSGENS L.A., GHELARDI E., CAMPA M., SENESI S. (2007). Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *J Clin Microbiol.* 45, 1455-62.

WILHELM E.A., JESSE C.R., NOGUEIRA C.W., SAVEGNAGO L. (2009). Introduction of trifluoromethyl group into diphenyl diselenide molecule alters its toxicity and protective effect against damage induced by 2-nitropropane in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 61, 197-203.

WOJTOWICZ H., CHOJNACKA M., MLOCHOWSKI J., PALUS J., SYPER L., HUDECOVA D., UHER M., PIASECKI E., RYBKA M. (2003). Functionalized alkyl and aryl diselenides as antimicrobial and antiviral agents: synthesis and properties. *Farmaco.* 58, 1235-42.

WOJTOWICZ H., KLOC K., MALISZEWSKA I., MLOCHOWSKI J., PIETKA M., PIASECKI E. (2004). Azaanalogues of ebselen as antimicrobial and antiviral agents: synthesis and properties. *Farmaco.* 59, 863-8.

WU Z., LIU Y., FENG X., LIU Y., WANG S., ZHU X., CHEN Q., PAN S. (2014). Candidemia: incidence rates, type of species, and risk factors at a tertiary care academic hospital in China. *Int J Infect Dis.* 22, 4-8.

TABLE 1- Susceptibility ( $\mu\text{g/mL}$ ) *in vitro* of echinocandin-susceptible and -resistant strains of *Candida parapsilosis* to diphenyl diselenide and ebselen.

Agents	Group of isolates (n)	MIC echinocandins ( $\mu\text{g/mL}$ )	Range	Geometric Mean	MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
Diphenyl Diselenide	ES (30)	$\leq 2$	1-8	2	2	8
	AR(14)	$\geq 8$	16-64	49.96	64	64
	CR(19)	$\geq 8$	16-64	46.08	64	64
	MR(18)	$\geq 8$	32-64	61.58	64	64
Ebselen	ES (30)	$\leq 2$	0.25-4	0.54	0.5	1
	AR(14)	$\geq 8$	0.06-4	0.26	0.25	0.5
	CR(19)	$\geq 8$	0.06-4	0.33	0.25	2
	MR(18)	$\geq 8$	0.06-4	0.7	0.5	2

ES=echinocandin-susceptible, AR=anidulafungin-resistant, CR=caspofungin-resistant and MR=micafungin-resistant;  
 MIC<sub>50</sub>=Minimal inhibitory concentration for 50% of strains;  
 MIC<sub>90</sub>=Minimal inhibitory concentration for 90% of strains.

#### 4 MANUSCRITO 3

***Candida parapsilosis*: the impact of resistance to echinocandins on the  
expression of *FKS* genes**

Francieli Chassot <sup>a#</sup>, Tarcieli Pozzebon Venturini <sup>a</sup>, Fernanda Baldissera Piasentin <sup>a</sup>,  
Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça <sup>b</sup>, Flávia Kelly Tobaldini <sup>b</sup>, Janio Morais Santurio  
<sup>c</sup>, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski <sup>b</sup>, Sydney Hartz Alves <sup>a</sup>.

**Title:** *Candida parapsilosis*: the impact of resistance to echinocandins in changing the expression of *FKS* genes

**Authors:** Francieli Chassot <sup>a#</sup>, Tarcieli Pozzebon Venturini <sup>a</sup>, Fernanda Baldissera Piasentin <sup>a</sup>, Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça <sup>b</sup>, Flávia Kelly Tobaldini <sup>b</sup>, Janio Morais Santurio <sup>c</sup>, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski <sup>b</sup>, Sydney Hartz Alves <sup>a</sup>.

**Affiliations:** <sup>a</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Centre, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil; <sup>b</sup> Postgraduate Program in Biosciences and Pathophysiology, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringa, PR, Brazil; <sup>c</sup> Postgraduate Program in Pharmacology, Health Sciences Centre, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

**\*Address for correspondence:**

Francieli Chassot

*Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Av. Roraima n° 1000, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria- CEP 97105-900, RS, Brazil. Tel./fax: +55 55 3220-8906. E-mail: francielichassot@gmail.com*

## Abstract

In the present study we used six groups of *C. parapsilosis* strains: one containing echinocandin-susceptible clinical isolates and others containing anidulafungin-resistant, caspofungin-resistant, micafungin-resistant laboratory derivative from the former. The aim was to evaluate whether changes in expressions of *FKS* genes accompanying the development of resistance to echinocandin. Our findings suggest that the resistance to echinocandin influence on higher or lower expression of *FKS* genes, both *FKS1* and *FKS2* were expressed at greater levels than *FKS3*.

**Keywords:** *Candida parapsilosis*, antifungal drug resistance, *FKS* genes, echinocandin.

## 1. Introduction

Echinocandins are recommended as the first-line treatment for invasive candidemia (PAPPAS et al., 2009; ULLMANN et al., 2012). Echinocandins act by inhibiting the  $\beta$ -(1,3)-D-glucan synthase (GS) complex which is encoded by three related genes (*FKS1*, *FKS2*, and *FKS3*) and a regulatory subunit, Rho1p (DOUGLAS et al., 1994; KARTSONIS et al., 2003). However, there are increasing reports of echinocandin-resistance in *Candida* spp., especially of those isolated from immunocompromised patients who were treated long-term with these antifungal agents (PFALLER et al., 2010; ALEXANDER et al., 2013).

Resistance to echinocandins is associated with mutations in two highly conserved regions of *FKS1p*, known as hot spot 1 and hot spot 2 (PARK et al., 2005; PERLIN, 2007). A naturally occurring amino acid polymorphism in the highly conserved *FKS1p* hot spot 1 region from *Candida parapsilosis* relative to other *Candida* species has been suggested to be responsible for the reduced echinocandin susceptibilities of these species (PERLIN, 2007).

*C. parapsilosis* is the second most common agent of fungal infection in South American, Mediterranean, and Asian countries (GUINEA, 2014; MONTAGNA et al., 2014; WU et al., 2014; DOI et al., 2016). Naturally requires higher concentrations of echinocandins for treatment than other species, and has additionally been reported to become resistant against echinocandins after patients have been treated continuously

with these drugs (MOUDGAL et al., 2005). However, this fact and the motives for resistance development have not yet been completely elucidated.

The aim of this study was to evaluate *in vitro* whether the emergence of resistance to echinocandin in *C. parapsilosis* induces changes in expressions of *FKS* genes.

## 2. Materials and Methods

We studied six groups of *C. parapsilosis* strains. The first three groups included clinical isolates anidulafungin-sensitive (AS) (n = 10), caspofungin-sensitive (CS) (n = 10) and, micafungin-sensitive (MS) (n = 10) obtained from the Mycological Research Laboratory (LAPEMI) of the Federal University of Santa Maria, Brazil. These isolates were identified by standard and molecular methods (KURTZMAN et al., 1998; WHITE et al., 2003; WHITE et al., 2006). The others groups included anidulafungin-resistant (AR) (n = 10), caspofungin-resistant (CR) (n = 10) and, micafungin-resistant (MR) (n = 10), derivatives obtained from susceptible isolates through an *in vitro* method of echinocandin resistance induction described by FEKETE-FORGACS et al. (2000) and CHASSOT et al. (2016). Anidulafungin (Pfizer Pharmaceutical Group, New York, NY); caspofungin (Merck, Darmstadt, Germany) and micafungin (Astellas, Chuo, Tokyo, Japan) were obtained as standards powders and were prepared in accordance with the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2008; 2012). All of the yeasts were tested by the broth microdilution method in accordance with the guidelines of M27-A3 and M27-S4 from the CLSI (CLSI, 2008; 2012). All assays were performed in duplicate.

Each strain of the echinocandin resistant groups (AR, CR, and MR) and their susceptible isolates were analyzed was the *FKS* gene expression. Total RNA was extracted using Trizol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen) and RNeasy<sup>®</sup> Mini kit (Qiagen, Germany) was used for purification. The concentration and purity of RNA was evaluated with NanoDrop (Thermo Scientific 200c) spectrophotometer and the cDNA was obtained using Superscript III RT<sup>®</sup> Supermix kit (Invitrogen), according to the kit manufacturer.

For *FKS* gene expression analysis in Real-Time PCR, specific pairs primers were designed. The primers used in Real-Time PCR (q-PCR) are listed in Table 1. The complete gene sequences of *FKS1*, *FKS2* and *FKS3* genes for *C. parapsilosis* were obtained from the GenBank database (GenBank accession n° EU221325, EU221326, and EU221327, respectively). The housekeeping gene *ACT1*pf:



TGGCTGGTAGAGATTTGACTGACTACT, *ACT1pr:*  
 GCAACATAACACAATTTCTCCTTGA, *URA3pf:*  
 GGAGCTCAAGAAACCACTGATGAA and *URA3pr:*

ACTCCCCGTATGCTAAAGAGCC *Ura3* (GenBank accession n°XP\_721787.1) and *ACT1p* genes were used for normalization of expression (ROSSIGNOL et al., 2007). The primers were designed using software available on the website IDT Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR>). The sequences were compared with those of the *C. parapsilosis* database, using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), to determine their specificity. To validated the specificity of each primer pair for its corresponding *FKS1*, *FKS2* and *FKS3* gene, PCR products were amplified from *C. parapsilosis* genomic DNA. The amplicons produced for each gene-specific primer pair corresponds to the fragment (band) of expected size, and the specificity of the primers was validated against the *C. parapsilosis* genome.

Real-time PCR (CF X 48 Real-time PCR System, Applied Biosystems) was used to determine the relative levels of *FKS1*, *FKS2* and *FKS3* mRNA transcripts. Negative controls were included in each run. The relative quantification of each gene expression was performed by the comparative Ct (DDCt) method. Each reaction was performed in triplicate and mean values of relative expression were determined for each gene.

As the quality control of real-time PCR assays, the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analysis indicated that each primer pair was specific for a particular *C. parapsilosis* gene, and would not cross-react with sequences from other organisms. PCR efficiencies ranged between 90% and 110% for each of the primer pairs, indicating that all real-time assays had similar efficiencies. Gel electrophoresis and melting curve analysis confirmed the presence of the expected PCR products only, and the absence of unwanted non-specific products, confirming that each primer pair was specific for its corresponding *C. parapsilosis* gene. Using the optimized real-time PCR assays, we found that the *FKS* genes were expressed in most strains of *C. parapsilosis* subjected to the process of induction of resistance echinocandins, as shown by the detectable Ct value (Ct < 35).

The non-parametric Wilcoxon paired t-test was used to analyze the MICs, comparing the susceptible groups and resistant groups. The expression of *FKS* genes was analyzed by comparing the susceptible and resistant groups, and the expressions of *FKS1*, *FKS2*, and *FKS3* in echinocandin-resistant groups, with the Anova test, followed

by the Bonferroni post hoc using GraphPad Prism (GraphPad Software version 6.01, CA, USA). The significance level was 0.05.

### 3. Results

The results of the susceptibility test before and after induction of resistance for the *C. parapsilosis* strain groups are presented in Table 2. Each group of isolates was separately exposed to growing concentrations of each echinocandin according FEKETE-FORGACS et al. (2000) and CHASSOT et al. (2016) method acquired resistance to anidulafungin (AR), caspofungin (CR) and/or micafungin (MR); the minimal inhibitory concentrations (MICs) to echinocandin in the resistant groups was  $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ .

The *FKS* gene expression was performed with 10 strains from each group (CR, AR, and MR) and their susceptible strains. Real-time PCR evaluated the transcription levels for the three different *FKS* genes. Figure 1 indicates that, after the induction of resistance to echinocandins, was observed a significant higher expression levels of genes *FKS1*, *FKS2*, and *FKS3* in strains of *C. parapsilosis* resistant compared their susceptible strains ( $p = 0.005$ ). There was no significant difference in the expression levels between of these three genes in echinocandin-resistant strains. The change in expression of the *FKS1* gene was detected in 18 (60%) resistant strains [AR ( $n = 6$ ), MR ( $n = 6$ ) and CR ( $n = 6$ )]. The change in expression of the *FKS2* gene was detected in 17 (56.6%) resistant strains [AR ( $n = 6$ ), MR ( $n = 6$ ) and CR ( $n = 5$ )]. The change in expression of the *FKS3* gene was detected in 13 (43.3%) resistant strains [AR ( $n = 4$ ), MR ( $n = 5$ ) and CR ( $n = 4$ )] (Figure 1). Of the four strains that were resistant to the three echinocandins, two showed change in expression of the three *FKS1*, *FKS2*, and *FKS3* genes. A third strain changed the expression only of the *FKS1* and *FKS2* genes, and the fourth strain was not shown change in expression any of the three genes. Table 3 indicates that both *FKS1* and *FKS2* were expressed at greater levels than *FKS3* and the *FKS2* was expressed at a higher level than *FKS1* in *C. parapsilosis* echinocandin-resistant.

#### 4. Discussion and Conclusion

Although echinocandin is the class antifungals used for the treatment of *C. parapsilosis*, little is known about your resistance development mechanism these yeast to echinocandins. We seek to demonstrate whether acquired resistance *in vitro* to echinocandins changes the expression levels of *FKS* genes in *C. parapsilosis* clinical isolates.

Several studies have linked mutations in the *FKS1* gene with an increase in MIC values and confer cross-resistance of *Candida* spp. to echinocandins (PARK et al., 2005; BALASHOV et al., 2006; PERLIN, 2007). In *Candida* species, amino acid substitutions occurs in two highly conserved regions of *FKS1p* (hot spot1 and hot spot 2) or its *paralog FKS2p* (PERLIN, 2007). Resistance to echinocandin in *C. parapsilosis* is associated with amino acid substitutions, an Ala at position 660 (P660A) in conserved hot spot 1 region of *FKS1p* replaces the Pro (GARCIA-EFFRON et al., 2008). However, MARTI-CARRIZOSA et al. (2015), showed mutations in the outside HS1 or HS2 regions described as V595I and F1386S to *C. parapsilosis* echinocandin-resistant. These authors suggested that other regions out of HS1 or HS2 could be related to the echinocandin resistance in *C. parapsilosis*.

In *C. glabrata*, echinocandin resistance was also detected to be related to the expression of the *FKS1*, *FKS2*, and *FKS3* genes (GARCIA-EFFRON et al., 2009). In the present study, we detected change in expression of the *FKS1*, *FKS2*, and *FKS3* genes in echinocandin-resistant strain of *C. parapsilosis*, with higher levels of expression of the *FKS2* gene; GARCIA-EFFRON et al. (2008) also detected the expression of these genes, with higher levels to *FKS2*, in *C. parapsilosis* strains that were naturally resistant to echinocandins, however, the minimum expression of *FKS1* gene reported by the author was not confirmed in this study. The detection of an isolate of *C. parapsilosis* resistant to three echinocandins, without *FKS* gene change in expression, suggests that other methods of adaptive responses to stress may also occur, as observed in the paradoxical effect of the echinocandin susceptibility testing (STEVENS et al., 2006; PERLIN, 2014).

This study demonstrated that resistance *in vitro* to echinocandins can modify the expression levels of *FKS* genes in *C. parapsilosis* clinical isolates. Based on our findings, and the emergence of resistance to echinocandins in *C. parapsilosis*, future

studies should include DNA sequencing tests of the hot spot regions *FKS* mutants and beyond and, methods of adaptative response to stress for *C. parapsilosis*.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was funded by the National Council for Scientific and Technological Development – (CNPq; process #470229/2012-8) and by CAPES (Higher Education Personnel Training Coordination, Brazil).

## REFERENCES

- ALEXANDER, B. D. et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of *FKS* mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 12, p. 1724-1732, 2013.
- BALASHOV, S. V.; PARK S.; PERLIN D. S. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in *FKSI*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 2058-2063, 2006.
- CHASSOT, F. et al. Exploring the In Vitro Resistance of *Candida parapsilosis* to Echinocandins. **Mycopathologia**, 2016.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard**. 3rd ed. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. 4<sup>th</sup> informational supplement. CLSI document M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pennsylvania, USA, 2012.
- DOI, A. M. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.
- DOUGLAS, C. M. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* *FKSI* (*ETG1*) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 26, p. 12907-12911, 1994.
- FEKETE-FORGACS, K.; GYURE L.; LENKEY B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 43, n. 7-8, p. 273-279, 2000.
- GARCIA-EFFRON, G. et al. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in *Fks1p* in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2305-2312, 2008.
- GARCIA-EFFRON, G. et al. Effect of *Candida glabrata* *FKSI* and *FKS2* mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3690-3699, 2009.
- GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20 Suppl 6, n., p. 5-10, 2014.

- KARTSONIS, N. A.; NIELSEN J.; DOUGLAS C. M. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. **Drug resistance updates**, v. 6, n. 4, p. 197-218, 2003.
- KURTZMAN, C.; FELL J. W. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. 4rd ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. p.
- MARTI-CARRIZOSA, M. et al. Implication of *Candida parapsilosis* *FKS1* and *FKS2* mutations in reduced echinocandin susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3570-3573, 2015.
- MONTAGNA, M. T. et al. Candidemia in intensive care unit: a nationwide prospective observational survey (GISIA-3 study) and review of the European literature from 2000 through 2013. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 5, p. 661-674, 2014.
- MOUDGAL, V. et al. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 767-769, 2005.
- PAPPAS, P. G. et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 5, p. 503-535, 2009.
- PARK, S. et al. Specific substitutions in the echinocandin target *Fks1p* account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3264-3273, 2005.
- PERLIN, D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. **Drug Resistance Updates**, v. 10, n. 3, p. 121-130, 2007.
- PERLIN, D. S. Echinocandin resistance, susceptibility testing and prophylaxis: implications for patient management. **Drugs**, v. 74, n. 14, p. 1573-1585, 2014.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA D. J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1-53, 2010.
- ROSSIGNOL, T. et al. Transcriptional response of *Candida parapsilosis* following exposure to farnesol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 7, p. 2304-2312, 2007.
- STEVENS, D. A. et al. Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for beta-1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 3160-3161, 2006.
- ULLMANN, A. J. et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). **Clin Microbiol Infect**, v. 18 Suppl 7, n., p. 53-67, 2012.

WHITE, P. L. et al. A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis?: a United Kingdom-Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 8, n. 3, p. 376-384, 2006.

WHITE, P. L.; SHETTY A.; BARNES R. A. Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. Pt 3, p. 229-238, 2003.

WU, Z. et al. Candidemia: incidence rates, type of species, and risk factors at a tertiary care academic hospital in China. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n., p. 4-8, 2014.

Table 1 - Primers used for the real-time PCR analysis of *FKS1*, *FKS2*, and *FKS3* gene expression.

	<b>Target</b>	<b>Forward (5'→3')</b>	<b>Reverse (5'→3')</b>
<b><i>FKS</i> gene</b>	<i>FKS1</i>	TGGGTGCTAGATTGAT GTTGATTT	ATATGGGTTAAAGATGA ATGGCGA
	<i>FKS2</i>	TGCCTCATATACTTGA CTAACTTGGTGT	GCGTCCAAATAGAAACC CCAA
	<i>FKS3</i>	TGCTGCCTCTGTTTCA ACTAACG	CTACCTCCACTTGATTTG CTTGATC
<b>Housekeeping gene</b>	<i>ACT1p</i>	TGGCTGGTAGAGATTT GACTGACTACT	GCAACATAACACAATTC TCCTTGA
	<i>URA3p</i>	GGAGCTCAAGAAACC ACTGATGAA	ACTCCCCGTATGCTAAAG AGCC



Table 2 - Susceptibility ( $\mu\text{g/ml}$ ) of *Candida parapsilosis* strains to echinocandins before and after the induction of echinocandins resistance.

Group of isolates (n=10)	MIC range ( $\mu\text{g/ml}$ )	Geometric mean	MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
AS	0.12-2.00	0.77	1.00	1.00
AR	8.00-8.00	8.00	8.00	8.00
CS	0.25-1.00	0.46	0.25	1.00
CR	8.00-8.00	8.00	8.00	8.00
MS	0.25-1.00	0.66	0.50	1.00
MR	8.00-8.00	8.00	8.00	8.00

AS = anidulafungin-susceptible; AR = anidulafungin-resistant; CS = caspofungin-susceptible; CR = caspofungin-resistant; micafungin-susceptible; MR = micafungin-resistant.

MIC = Minimum Inhibitory Concentration

MIC<sub>50</sub> = Minimal inhibitory concentration for 50% of strains;

MIC<sub>90</sub> = Minimal inhibitory concentration for 90% of strains.

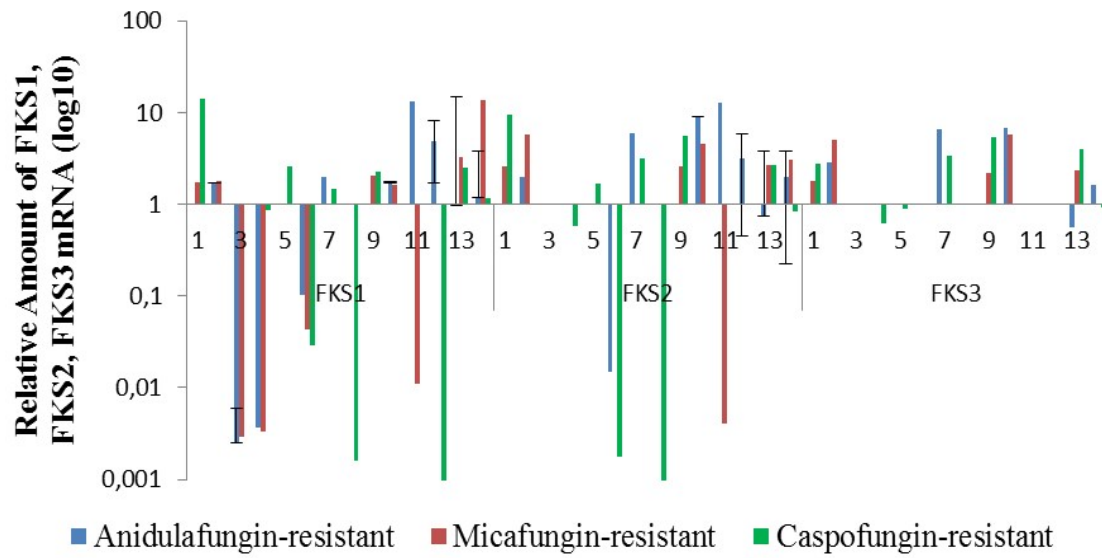
Table 3 – Relative expression ratios between *FKS* genes of *C. parapsilosis*.

Group	Expression Ratio <sup>a</sup>	
	<i>FKS1/FKS3</i>	<i>FKS2/FKS3</i>
AR	1.784	1.866
CR	1.042	1.073
MR	1.520	1.584

<sup>a</sup>Differences (*n*-fold) relative to *FKS3* levels.

AR = anidulafungin-resistant; CR = caspofungin-resistant and MR = micafungin-resistant.

Figure 1 - Expression of *FKS* genes in echinocandin-resistant *Candida parapsilosis* strains. Each number in the x-axis refers to a different strain.



## 5 DISCUSSÃO

As infecções fúngicas devido a espécies de *Candida* são associadas com significativa morbidade, hospitalização prolongada, alta mortalidade e aumento dos custos à saúde. Considerando-se estes fatores, o crescente aumento de candidemia devido à *C. parapsilosis*, a emergência de resistência desta espécie as equinocandinas e a disponibilidade limitada de fármacos antifúngicos, fica evidente a necessidade de estudos para o melhor entendimento do processo de resistência adquirida às equinocandinas e de possíveis alternativas de tratamento para infecções causadas por *C. parapsilosis*.

Estudos recentes recomendam o uso das equinocandinas como terapia primária (PAPPAS et al., 2009; GLOCKNER, 2011) ou como agentes potentes para profilaxia de candidíase invasiva (CHOU et al., 2007; SCOTT, 2012; DE LA TORRE et al., 2014). Estas práticas têm favorecido a emergência de resistência de *C. parapsilosis* em hospitais de várias partes do mundo, principalmente da América Latina (FORREST et al., 2008; SIPSAS et al., 2009; GLOCKNER, 2011). A caracterização do fenômeno de resistência às equinocandinas para *C. parapsilosis* no modelo proposto no artigo 1, revelou a importante capacidade desta espécie em desenvolver resistência *in vitro* as equinocandinas mediante exposição crescente de anidulafungina, caspofungina e micafungina. Interessantemente, não houve diferença significativa no tempo de geração de cepas resistentes entre os três fármacos. Estudos apontam que o desenvolvimento de resistência as equinocandinas em espécies de *Candida* geralmente requer uma exposição prolongada e/ou repetida dos fármacos (THOMPSON et al., 2008; FEKKAR et al., 2014), embora possa emergir rapidamente a partir do início da terapia antifúngica (FEKKAR et al., 2013; LEWIS et al., 2013). Segundo (PERLIN, 2015a) PERLIN (2015b), ampliando-se a exposição de pacientes as equinocandinas pode-se inadvertidamente promover a emergência de resistência.

Entre as espécies de *Candida* a resistência cruzada para as equinocandinas é um fenômeno bem caracterizado e é relacionado com mutações no gene *FKS* (ARENDRUP et al., 2014; PERLIN, 2014). A resistência cruzada *in vitro*, entre as equinocandinas, observada neste trabalho (artigo 1), complementa achados prévios que demonstram a resistência cruzada entre CSF e MCF e entre ANF e CSF para *Candida* spp. *in vitro* (PFALLER et al., 2008; PFALLER et al., 2011; PFALLER, MICHAEL A. et al., 2014). Além disso, mutações no gene *FKS* têm sido relacionadas com a capacidade deficiente

da enzima, alterações da composição da parede celular fúngica (redução de glucana e aumento de quitina), aumento da espessura da parede celular e dificuldade de filamentação, o que contribui para uma menor taxa de crescimento *in vitro* e *in vivo* em modelo de ratos e *Drosophila* (BEN-AMI et al., 2011; LEE et al., 2012; SINGH-BABAK et al., 2012). A resistência adquirida clinicamente em *Candida* está relacionada às mutações na região *hot spot* dos genes *FKS* (ARENDRUP et al., 2014).

A avaliação *in vitro* da atividade de anfotericina B, flucitosina, fluconazol e voriconazol frente à *C. parapsilosis* ES e ER (artigo 1), revelou que as cepas ER apresentaram diminuição da suscetibilidade para estes antifúngicos testados, exceto para a anfotericina B. A constatação do desenvolvimento de múltipla resistência envolvendo flucitosina e azóis para *C. parapsilosis* equinocandina-resistente, vai ao encontro do estudo de MOUDGAL et al. (2005) que demonstraram casos de múltipla resistência envolvendo equinocandinas e azóis para *C. parapsilosis*. Este fenômeno assim como a múltipla resistência envolvendo equinocandinas e flucitosina são mais frequentes em *C. glabrata* (CHAPELAND-LECLERC et al., 2010; PFALLER et al., 2011a; PHAM et al., 2014; CHO et al., 2015; WANG et al., 2015). A não observação de múltipla resistência entre anfotericina B e equinocandinas corroboram com estudos prévios que reportam a potente atividade *in vitro* da anfotericina B (MOUDGAL et al., 2005).

Os tratamentos para combater infecções antifúngicas geralmente são administrados como monoterapia. No entanto, devido aos poucos agentes antifúngicos disponíveis e o inevitável desenvolvimento de resistência fúngica, a terapia de combinação pode ser uma alternativa para aumentar a eficácia através de efeitos sinérgicos de fármacos existentes (COSTE et al., 2015). Apesar dos resultados promissores obtidos através de algumas associações antifúngicas frente à *Candida* spp. (MONTGOMERIE et al., 1975; LEWIS et al., 2002; ALVES et al., 2012), combinações de agentes antifúngicos frente à *C. parapsilosis* ER ainda não tinham sido testadas. A avaliação *in vitro* das combinações entre anfotericina B, flucitosina, fluconazol e voriconazol frente à *C. parapsilosis* ES e ER (manuscrito 1), demonstrou que a atividade indiferente predominou em ambos os grupos (ES e ER). Dados de estudos *in vitro* permanecem controversos, sinergismo, aditividade, indiferença e antagonismo têm sido descritos para combinações entre anfotericina B, flucitosina, fluconazol e voriconazol (KEELE et al., 2001; BARCHIESI et al., 2004; ALVES et al., 2012). Com o propósito de encontrar interações sinérgicas, futuros estudos *in vitro* podem ser realizados a fim de testar outras possibilidades de combinações entre os agentes

antifúngicos ou entre agentes antifúngicos e não antifúngicos frente à *C. parapsilosis* ES e ER.

A constatação da inibição *in vitro* de *C. parapsilosis* equinocandina-sensível pelo (PhSe)<sub>2</sub> e ebselen e da inibição *in vitro* de *C. parapsilosis* equinocandina-resistente pelo ebselen (manuscrito 2) sugere a potente atividade antifúngica do (PhSe)<sub>2</sub> mas principalmente do ebselen, o qual demonstrou maior eficácia frente à *C. parapsilosis* equinocandina-resistentes. Nossos resultados confirmam a propriedade antifúngica destes compostos previamente descritas para (PhSe)<sub>2</sub> frente à *Candida* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., e *Pythium insidiosum* (LORETO et al., 2011; LORETO et al., 2012; DENARDI et al., 2013; ROSSETI et al., 2015) e para o ebselen frente à *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. neoformans*, *A. niger*, *M. gypseum*, *P. chrysogenum* e *P. citrinum* (SOTEROPOULOS et al., 2000; WOJTOWICZ et al., 2004; MOREIRA ROSA et al., 2005; CHAN et al., 2007; BILLACK et al., 2009). A menor atividade antifúngica observada para o (PhSe)<sub>2</sub> pode ser devido à diferenças nas interações com as células fúngicas causadas por efeitos eletrônicos e esteroquímicos deste composto. Estudos experimentais *in vitro* que combinem antifúngicos convencionais e (PhSe)<sub>2</sub> ou ebselen com o objetivo de detectar potenciais atividades sinérgicas são necessários para a melhor compreensão da atividade antifúngica destes compostos, uma vez que, a importância da atividade antifúngica destes organocompostos de selênio não está somente na identificação de um agente antifúngico novo, mas também na possibilidade de auxiliar no tratamento de infecções fúngicas.

A demonstração de que a resistência as equinocandinas *in vitro* de *C. parapsilosis* pode modificar os níveis de expressão dos genes *FKS1*, *FKS2* e *FKS3* quando comparados à expressão destes genes em cepas *C. parapsilosis* equinocandina-sensíveis (manuscrito 3), representa um dos passos iniciais para o melhor entendimento da emergência de resistência às equinocandinas por esta espécie, uma vez que, estudos neste sentido ainda são escassos. Até onde sabemos, GARCIA-EFFRON et al. (2008) demonstraram que *FKS2* e *FKS3* foram expressos a níveis mais elevados que *FKS1* e que a ocorrência natural da substituição do aminoácido prolina pela alanina na posição 660 (P660A) na região *hot spot* 1 (HS1) do gene *FKS1p* de *C. parapsilosis*, é responsável pela redução da suscetibilidade para as equinocandinas. Todavia, MARTI-CARRIZOSA et al. (2015) sugerem que mutações em regiões diferentes das HS1 ou HS2 descritas como V595I e F1386S, podem estar relacionadas à resistência às equinocandinas em *C. parapsilosis*. Além disso, outros mecanismos envolvidos com o

stress celular, como o aumento compensatório na produção de quitina, podem também desempenhar papel importante na redução da suscetibilidade as equinocandinas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (WALKER et al., 2008; LEE et al., 2012; WALKER et al., 2013). Por conseguinte, futuros estudos como testes de sequenciamento das regiões *hot spot* dos genes *FKS* e métodos de resposta adaptativa ao stress celular de *C. parapsilosis* equinocandina-resistente são pertinentes.

Desta forma, a exposição *in vitro* a concentrações crescentes de equinocandinas é um fator importante para a emergência de resistência em *C. parapsilosis*, fenômeno este, que agrega consequências para o perfil de suscetibilidade desta espécie a outros agentes antifúngicos e OS. Os resultados apresentados neste trabalho podem auxiliar futuros estudos experimentais *in vitro* ou *in vivo* a fim de contribuir para um melhor entendimento da emergência de resistência às equinocandinas e das diferenças de suscetibilidade entre cepas *C. parapsilosis* sensíveis e resistentes às equinocandinas.

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste trabalho, podemos concluir que:

- Dentre os isolados de *C. parapsilosis* equinocandina-sensíveis, a caspofungina apresenta atividade antifúngica *in vitro* com menores CIMs em relação à micafungina e à anidulafungina;
- Não há diferença significativa no tempo de geração de cepas resistentes *in vitro* às equinocandinas entre os grupos de *C. parapsilosis* expostos à anidulafungina, caspofungina e micafungina;
- A exposição *in vitro* de *C. parapsilosis* a concentrações crescentes de equinocandinas separadamente, pode desenvolver resistência cruzada entre as equinocandinas para a maioria das cepas testadas;
- A anfotericina B, o fluconazol, a flucitosina e o voriconazol apresentam atividade antifúngica *in vitro* sobre *C. parapsilosis* equinocandina-sensível, enquanto que a anfotericina B mantém sua atividade antifúngica sobre *C. parapsilosis* equinocandina-resistente;
- A atividade das combinações *in vitro* entre a anfotericina B, o fluconazol, a flucitosina e o voriconazol apresenta, em sua maioria, interações com atividade indiferente sobre *C. parapsilosis* equinocandina-sensível e equinocandina-resistente;
- O disseleneto de difenila e ebselen apresentam atividade antifúngica *in vitro* sobre *C. parapsilosis* equinocandina-sensível sendo que o ebselen apresenta as menores CIMs sobre *C. parapsilosis* equinocandina-resistentes;
- A exposição *in vitro* de *C. parapsilosis* a concentrações crescentes de equinocandinas, influencia na maior ou menor expressão dos genes *FKS*.



## REFERÊNCIAS

ASHFORD, B, **Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 8, n. 6, p. 507-538.

ACKER, C. I. et al. Antidepressant-like effect of diphenyl diselenide on rats exposed to malathion: involvement of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase activity. **Neuroscience Letters**, v. 455, n. 3, p. 168-172, 2009.

AL-RAWAHI, G. N.; ROSCOE D. L. Ten-year review of candidemia in a Canadian tertiary care centre: Predominance of non-*albicans* *Candida* species. **Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, v. 24, n. 3, p. E65-E68, 2013.

ALEXANDER, B. D. et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of *FKS* mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 12, p. 1724-1732, 2013.

ALMIRANTE, B. et al. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1681-1685, 2006.

ALVES, I. A. et al. Effects of antifungal agents alone and in combination against *Candida glabrata* strains susceptible or resistant to fluconazole. **Mycopathologia**, v. 174, n. 3, p. 215-221, 2012.

ANAISSIE, E. J. et al. Correlation between in-Vitro and in-Vivo Activity of Antifungal Agents against *Candida* Species. **Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 2, p. 384-389, 1994.

ANDRIOLE, V. T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal therapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, n. 3, p. 317-321, 2000.

ANON. **Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods.** ed. Washington, DC.: 1992. 5.18.11-15.18.28 p.

ANTACHOPOULOS, C.; WALSH T. J. New agents for invasive mycoses in children. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 17, n. 1, p. 78-87, 2005.

ANTONIADOU, A. et al. Candidemia in a tertiary care cancer center: *in vitro* susceptibility and its association with outcome of initial antifungal therapy. **Medicine (Baltimore)**, v. 82, n. 5, p. 309-321, 2003.

ARENDRUP, M. C. et al. National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 325-334, 2011.

- ARENDRUP, M. C. et al. Breakthrough *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* Double Infection during Caspofungin Treatment: Laboratory Characteristics and Implication for Susceptibility Testing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 1185-1193, 2009.
- ARENDRUP, M. C.; PERLIN D. S. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? **Current Opinion Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 484-492, 2014.
- ARENDRUP, M. C. et al. Differential In Vivo Activities of Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin against *Candida glabrata* Isolates with and without FKS Resistance Mutations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2435-2442, 2012.
- ARIAS, A. et al. In vitro susceptibility of 545 isolates of *Candida* spp. to four antifungal agents. **Mycoses**, v. 37, n. 7-8, p. 285-289, 1994.
- ARTHINGTON, B. A. et al. Nucleotide sequence of the gene encoding yeast C-8 sterol isomerase. **Gene**, v. 107, n. 1, p. 173-174, 1991.
- ASADZADEH, M. et al. Antifungal susceptibility of clinical *Candida parapsilosis* isolates in Kuwait. **Mycoses**, v. 51, n. 4, p. 318-323, 2008.
- ASHFORD, B. K. Certain Conditions of the Gastro-Intestinal Tract in Porto Rico and their Relation to Tropical Sprue. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 6, p. 507-538, 1928.
- ASHLEY, E. S. D. et al. Pharmacology of systemic antifungal agents. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n., p. S28-S39, 2006.
- ATKINSON, B. A. et al. Comparison of Fluconazole, Amphotericin-B and Flucytosine in Treatment of a Murine Model of Disseminated Infection with *Candida glabrata* in Immunocompromised Mice. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, n. 5, p. 631-640, 1995.
- AZAD, G. K.; TOMAR R. S. Ebselen, a promising antioxidant drug: mechanisms of action and targets of biological pathways. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 8, p. 4865-4879, 2014.
- BADEN, L. R. et al. Salvage therapy with voriconazole for invasive fungal infections in patients failing or intolerant to standard antifungal therapy. **Transplantation**, v. 76, n. 11, p. 1632-1637, 2003.
- BARBOSA, N. B. et al. Acute diphenyl diselenide treatment reduces hyperglycemia but does not change delta-aminolevulinatase activity in alloxan-induced diabetes in rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 12, p. 2200-2204, 2008.
- BARCHIESI, F. et al. Interactions of posaconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 5, p. 1355-1359, 2001.

BARCHIESI, F. et al. *In vitro* activities of voriconazole in combination with three other antifungal agents against *Candida glabrata*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3317-3322, 2004.

BARCHIESI, F. et al. Caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida parapsilosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 51, n. 3, p. 941-945, 2007.

BASSETTI, M. et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, n., p. 21, 2006.

BATNA, A.; FUCHS C.; SPITELLER G. Lipid peroxidation in presence of ebselen. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 87, n. 2, p. 149-158, 1997.

BEN-AMI, R. et al. Fitness and virulence costs of *Candida albicans FKS1* hot spot mutations associated with echinocandin resistance. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 4, p. 626-635, 2011.

BENJAMIN, D. K., JR.; GARGES H.; STEINBACH W. J. *Candida* bloodstream infection in neonates. **Seminars in Perinatology**, v. 27, n. 5, p. 375-383, 2003.

BILLACK, B.; SANTORO M.; LAU-CAM C. Growth inhibitory action of ebselen on fluconazole-resistant *Candida albicans*: role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. **Microbial Drug Resistance**, v. 15, n. 2, p. 77-83, 2009.

BLYTH, C. C. et al. Not just little adults: candidemia epidemiology, molecular characterization, and antifungal susceptibility in neonatal and pediatric patients. **Pediatrics**, v. 123, n. 5, p. 1360-1368, 2009.

BONASSOLI, L. A.; BERTOLI M.; SVIDZINSKI T. I. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **Journal of Hospital Infection**, v. 59, n. 2, p. 159-162, 2005.

BONFIETTI, L. X. et al. Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* bloodstream isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 1003-1008, 2012.

BORGHI, E. et al. Characterization of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from invasive fungal infections. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** v. 30, n. 11, p. 1437-1441, 2011.

BORMANN, A. M.; MORRISON V. A. Review of the pharmacology and clinical studies of micafungin. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 3, n., p. 295-302, 2009.

BOUZA, E.; BURILLO A.; MUNOZ P. Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 5, p. 265-274, 2002.

- BOUZA, E.; MUNOZ P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n., p. S87-S91, 2008.
- BOWMAN, J. C. et al. The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 9, p. 3001-3012, 2002.
- BRIELMAIER, B. D. et al. Early clinical experience with anidulafungin at a large tertiary care medical center. **Pharmacotherapy**, v. 28, n. 1, p. 64-73, 2008.
- BRITO, L. R. et al. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v. 44, n. 3, p. 261-266, 2006.
- BRUNTON, L. L.; KNOLLMAN B. C.; CHABNER B. A. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12 ed. Rio de Janeiro: 2012. p.
- CAGGIANO, G. et al. *Candida* Bloodstream Infections in Italy: Changing Epidemiology during 16 Years of Surveillance. **BioMed Research International**, v. 2015, n., p. 256580, 2015.
- CANTON, E. et al. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5590-5596, 2011.
- CARRILLO-MUNOZ, A. J. et al. In vitro antifungal susceptibility testing of filamentous fungi with Sensititre Yeast One (TM). **Mycoses**, v. 49, n. 4, p. 293-297, 2006.
- CASSONE, A. et al. Biotype Diversity of *Candida parapsilosis* and Its Relationship to the Clinical Source and Experimental Pathogenicity. **Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 4, p. 967-975, 1995.
- CASTANHEIRA, M. et al. Low prevalence of fks1 hot spot 1 mutations in a worldwide collection of *Candida* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2655-2659, 2010.
- CATEAU, E.; RODIER M. H.; IMBERT C. *In vitro* efficacies of caspofungin or micafungin catheter lock solutions on *Candida albicans* biofilm growth. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 1, p. 153-155, 2008.
- CHAKRABARTI, A. et al. Recent experience with fungaemia: change in species distribution and azole resistance. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 41, n. 4, p. 275-284, 2009.
- CHAN, G. et al. Evaluation of the antimicrobial activity of ebselen: role of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 21, n. 5, p. 252-264, 2007.

CHAPELAND-LECLERC, F. et al. Acquisition of flucytosine, azole, and caspofungin resistance in *Candida glabrata* bloodstream isolates serially obtained from a hematopoietic stem cell transplant recipient. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1360-1362, 2010.

CHEUNG, C. et al. Development of candidemia on caspofungin therapy: a case report. **Infection**, v. 34, n. 6, p. 345-348, 2006.

CHO, E. J. et al. Emergence of multiple resistance profiles involving azoles, echinocandins and amphotericin B in *Candida glabrata* isolates from a neutropenia patient with prolonged fungaemia. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 70, n. 4, p. 1268-1270, 2015.

CHONG, P. P. et al. Genetic relatedness of *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. **J Med Microbiol**, v. 52, n. Pt 8, p. 657-666, 2003.

CHOU, L. S. et al. Caspofungin as primary antifungal prophylaxis in stem cell transplant recipients. **Pharmacotherapy**, v. 27, n. 12, p. 1644-1650, 2007.

CLARK, T. A. et al. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4468-4472, 2004.

CLERIHEW, L. et al. *Candida parapsilosis* infection in very low birthweight infants. **Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition**, v. 92, n. 2, p. F127-129, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard**. 3rd ed. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. 4<sup>th</sup> informational supplement. CLSI document M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pennsylvania, USA, 2012.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n., p. 599-607, 2003.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.

CORNELY, O. A. et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n., p. 19-37, 2012.

- COSTA-DE-OLIVEIRA, S. et al. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 365-374, 2008.
- COSTE, A. T.; VANDEPUTTE P. **Antifungals. From Genomic to Resistance and the Development of Novel Agents**. ed. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2015. p.
- COWEN, L. E. Hsp90 Orchestrates Stress Response Signaling Governing Fungal Drug Resistance. **Plos Pathogens**, v. 5, n. 8, p., 2009.
- DANNAOUI, E. et al. Susceptibility testing of sequential isolates of *Aspergillus fumigatus* recovered from treated patients. **J Med Microbiol**, v. 53, n. Pt 2, p. 129-134, 2004.
- DE LA TORRE, P.; REBOLI A. C. Micafungin: an evidence-based review of its place in therapy. **Core Evidence**, v. 9, n., p. 27-39, 2014.
- DENARDI, L. B. et al. Antifungal activities of diphenyl diselenide alone and in combination with fluconazole or amphotericin B against *Candida glabrata*. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1-2, p. 165-169, 2013.
- DENNING, D. W.; HOPE W. W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 195-204, 2010.
- DEORUKHKAR, S. C.; SAINI S. Echinocandin Susceptibility Profile of Fluconazole Resistant *Candida* Species Isolated from Blood Stream Infections. **Infectious Disorders Drug Targets**, v. 16, n. 1, p. 63-68, 2016.
- DERESINSKI, S. C.; STEVENS D. A. Caspofungin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 11, p. 1445-1457, 2003.
- DESNOS-OLLIVIER, M. et al. Mutations in the *fks1* gene in *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* correlate with elevated caspofungin MICs uncovered in AM3 medium using the method of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3092-3098, 2008.
- DIMOPOULOU, D. et al. Anidulafungin versus caspofungin in a mouse model of candidiasis caused by anidulafungin-susceptible *Candida parapsilosis* isolates with different degrees of caspofungin susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 229-236, 2014.
- DISMUKES, W. E. Introduction to antifungal drugs. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 4, p. 653-657, 2000.
- DODGSON, A. R. et al. Clade-specific flucytosine resistance is due to a single nucleotide change in the FURI gene of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2223-2227, 2004.

DOI, A. M. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.

DOTIS, J. et al. Epidemiology, risk factors and outcome of *Candida parapsilosis* bloodstream infection in children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 31, n. 6, p. 557-560, 2012.

DOWELL, J. A. et al. Population pharmacokinetic analysis of anidulafungin, an echinocandin antifungal. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 44, n. 6, p. 590-598, 2004.

DOWELL, J. A. et al. Assessment of the safety and pharmacokinetics of anidulafungin when administered with cyclosporine. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 45, n. 2, p. 227-233, 2005.

FEKETE-FORGACS, K.; GYURE L.; LENKEY B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 43, n. 7-8, p. 273-279, 2000.

FEKKAR, A. et al. Emergence of echinocandin-resistant *Candida* spp. in a hospital setting: a consequence of 10 years of increasing use of antifungal therapy? **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 9, p. 1489-1496, 2014.

FEKKAR, A. et al. Rapid emergence of echinocandin resistance during *Candida kefyr* fungemia treatment with caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2380-2382, 2013.

FERNANDEZ-RUIZ, M. et al. Initial Use of Echinocandins Does Not Negatively Influence Outcome in *Candida parapsilosis* Bloodstream Infection: A Propensity Score Analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 10, p. 1413-1421, 2014a.

FERNANDEZ-RUIZ, M. et al. Initial use of echinocandins does not negatively influence outcome in *Candida parapsilosis* bloodstream infection: a propensity score analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 10, p. 1413-1421, 2014b.

FLECK, R.; DIETZ A.; HOF H. In vitro susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and Etest. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 767-771, 2007.

FLEVARI, A. et al. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. **Clinical Interventions in Aging**, v. 8, n., p. 1199-1208, 2013.

FORREST, G. N.; WEEKES E.; JOHNSON J. K. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. **The Journal of infection**, v. 56, n. 2, p. 126-129, 2008.

FRIDKIN, S. K. et al. Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995-2004. **Pediatrics**, v. 117, n. 5, p. 1680-1687, 2006.

GABER, R. F. et al. The yeast gene ERG6 is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. **Mol Cell Biol**, v. 9, n. 8, p. 3447-3456, 1989.

GARCIA-EFFRON, G. et al. Epidemiology and echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu lato species isolated from bloodstream infections at a Spanish university hospital. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2739-2748, 2012.

GARCIA-EFFRON, G. et al. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in *Fks1p* in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2305-2312, 2008.

GARCIA-EFFRON, G. et al. Effect of *Candida glabrata* *FKS1* and *FKS2* mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3690-3699, 2009a.

GARCIA-EFFRON, G.; PARK S.; PERLIN D. S. Correlating Echinocandin MIC and Kinetic Inhibition of *fks1* Mutant Glucan Synthases for *Candida albicans*: Implications for Interpretive Breakpoints. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 112-122, 2009b.

GE, Y. P. et al. Characterization of the *Candida parapsilosis* complex in East China: species distribution differs among cities. **Medical Mycology**, v. 50, n. 1, p. 56-66, 2012.

GEORGOPAPADAKOU, N. H.; WALSH T. J. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 2, p. 279-291, 1996.

GHISLENI, G. et al. Diphenyl diselenide exerts anxiolytic-like effect in Wistar rats: putative roles of GABAA and 5HT receptors. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1508-1515, 2008.

GLOCKNER, A. Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis with anidulafungin, caspofungin and micafungin: review of the literature. **European Journal of Medical Research**, v. 16, n. 4, p. 167-179, 2011.

GOMEZ-LOPEZ, A. et al. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1506-1509, 2008.



GOPINATHAN, S. et al. Detection of FUR1 Gene in 5-Flucytosine Resistant *Candida* Isolates in Vaginal Candidiasis Patients. **Journal of Clinical and Diagnostic Research** v. 7, n. 11, p. 2452-2455, 2013.

GOTO, N. et al. Efficacy and safety of micafungin for treating febrile neutropenia in hematological malignancies. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 11, p. 872-876, 2010.

GOVENDER, N. P. et al. Emergence of azole-resistant *Candida parapsilosis* causing bloodstream infection: results from laboratory-based sentinel surveillance in South Africa. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 7, p. 1994-2004, 2016.

GRAYBILL, J. R. et al. Fluconazole, D0870, and Flucytosine Treatment of Disseminated *Candida tropicalis* Infections in Mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 4, p. 924-929, 1995.

GUARRO, J.; GENE J.; STCHIGEL A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

GUBBINS, P. O. et al. Characterizing and predicting amphotericin B-associated nephrotoxicity in bone marrow or peripheral blood stem cell transplant recipients. **Pharmacotherapy**, v. 22, n. 8, p. 961-971, 2002.

GUINEA, J. et al. Molecular identification and antifungal susceptibility of yeast isolates causing fungemia collected in a population-based study in Spain in 2010 and 2011. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1529-1537, 2014.

HAKKI, M.; STAAB J. F.; MARR M. A. Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 7, p. 2522-2524, 2006.

HANDA, Y. et al. Effect of an antioxidant, ebselen, on development of chronic cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in primates. **Surgical Neurology**, v. 53, n. 4, p. 323-329, 2000.

HERNANDEZ, S. et al. 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1382-1383, 2004.

IMLAY, J. A. Pathways of oxidative damage. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, n., p. 395-418, 2003.

JOHNSON, M. D. et al. Combination Antifungal Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

JOHNSON, R. H.; EINSTEIN H. E. Amphotericin B and coccidioidomycosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1111, n., p. 434-441, 2007.

JUYAL, D. et al. Emergence of non-*albicans* *Candida* species in neonatal candidemia. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 5, n. 9, p. 541-545, 2013.

KARLOWSKY, J. A. et al. In vitro interactions of anidulafungin with azole antifungals, amphotericin B and 5-fluorocytosine against *Candida* species. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 2, p. 174-177, 2006.

KARTSONIS, N. et al. Caspofungin susceptibility testing of isolates from patients with esophageal candidiasis or invasive candidiasis: Relationship of MIC to treatment outcome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 9, p. 3616-3623, 2005.

KARTSONIS, N. A.; NIELSEN J.; DOUGLAS C. M. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. **Drug resistance updates**, v. 6, n. 4, p. 197-218, 2003.

KATO, M. et al. Phylogenetic relationship and mode of evolution of yeast DNA topoisomerase II gene in the pathogenic *Candida* species. **Gene**, v. 272, n. 1-2, p. 275-281, 2001.

KEELE, D. J. et al. Evaluation of amphotericin B and flucytosine in combination against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 41, n. 3, p. 121-126, 2001.

KOBAYASHI, T.; OHTA Y.; YOSHINO J. Preventive effect of ebselen on acute gastric mucosal lesion development in rats treated with compound 48/80. **European Journal of Pharmacology**, v. 414, n. 2-3, p. 271-279, 2001.

KOFLA, G.; RUHNKE M. Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis: review of the literature. **European Journal of Medical Research**, v. 16, n. 4, p. 159-166, 2011.

KRCMERY, V.; BARNES A. J. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 4, p. 243-260, 2002.

KUHN, D. M. et al. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: Unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1773-1780, 2002.

KULLBERG, B. J. et al. European expert opinion on the management of invasive candidiasis in adults. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n., p. 1-12, 2011.

KURTZMAN, C. P.; FEEL F. W. **The yeast. A taxonomia study**. ed. Amsterdam: 1998. 891-913 p.

LANGERON, M.; TALICE R. Nouvelles méthodes d'étude et assai de classification des champignons levuriformes. **Annales de Parasitologie Humaine Comparée**, v. 10, n., p. 1-80, 1932.

LEE, K. K. et al. Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance *in vivo*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 208-217, 2012.

LEPAK, A. et al. Optimizing Echinocandin dosing and susceptibility breakpoint determination via *in vivo* pharmacodynamic evaluation against *Candida glabrata* with and without fks mutations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5875-5882, 2012.

LEWIS, J. S., 2ND et al. Rapid emergence of echinocandin resistance in *Candida glabrata* resulting in clinical and microbiologic failure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 9, p. 4559-4561, 2013.

LEWIS, R. E. et al. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 345-351, 2002.

LIN, D. et al. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 7, p. 1815-1821, 1995.

LOCKHART, S. R. et al. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2659-2664, 2008.

LOPEZ-CIUDAD, V. et al. Successful treatment of *Candida parapsilosis* mural endocarditis with combined caspofungin and voriconazole. **Bmc Infectious Diseases**, v. 6, n., p., 2006.

LORETO, E. S. et al. Diphenyl diselenide *in vitro* and *in vivo* activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v. 156, n. 1-2, p. 222-226, 2012.

LORETO, E. S. et al. *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationship of diphenyl diselenide and synthetic analogues. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. e572-576, 2011.

LOVERO, G. et al. Molecular Identification and Echinocandin Susceptibility of *Candida parapsilosis* Complex Bloodstream Isolates in Italy, 2007-2014. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0150218, 2016.

MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n., p. 1-10, 2004.

MAGANTI, H.; YAMAMURA D.; XU J. P. Prevalent nosocomial clusters among causative agents for candidemia in Hamilton, Canada. **Medical Mycology**, v. 49, n. 5, p. 530-538, 2011.

MAGILL, S. S. et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 13, p. 1198-1208, 2014.

MAIORINO, M.; ROVERI A.; URSINI F. Antioxidant effect of Ebselen (PZ 51): peroxidase mimetic activity on phospholipid and cholesterol hydroperoxides vs free radical scavenger activity. **Archives of Biochemistry and biophysics**, v. 295, n. 2, p. 404-409, 1992.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J. et al. Antifungal resistance to fluconazole and echinocandins is not emerging in yeast isolates causing fungemia in a Spanish tertiary care center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v., n., p., 2014.

MARTI-CARRIZOSA, M. et al. Implication of *Candida parapsilosis* *FKS1* and *FKS2* mutations in reduced echinocandin susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3570-3573, 2015.

MARTIN, E.; MAIER F.; BHAKDI S. Antagonistic Effects of Fluconazole and 5-Fluorocytosine on Candidacidal Action of Amphotericin-B in Human Serum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 6, p. 1331-1338, 1994.

MASIA CANUTO, M.; GUTIERREZ RODERO F. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 9, p. 550-563, 2002.

MAYERS, D. L. **Antimicrobial Drug Resistance. Mechanisms of Drug Resistance.** ed. New York, NY: 2009. 667 p.

MESSER, S. A. et al. Activity of contemporary antifungal agents, including the novel echinocandin anidulafungin, tested against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006 to 2007). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1942-1946, 2009.

MIRANDA, L. D. et al. *Candida parapsilosis* candidaemia in a neonatal unit over 7 years: a case series study. **Bmj Open**, v. 2, n. 4, p., 2012.

MIRHENDI, H. et al. Colony-PCR is a rapid and sensitive method for DNA amplification in yeasts. **Iranian Journal of Public Health**, v. 36, n. 1, p. 40-44, 2007.

MIRHENDI, H. et al. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 47, n. 3, p. 225-229, 2006.

MONK, B. C.; PERLIN D. S. Fungal plasma membrane proton pumps as promising new antifungal targets. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 209-223, 1994.

MONTGOMERIE, J. Z.; EDWARDS J. E.; GUZE L. B. Synergism of Amphotericin-B and 5-Fluorocytosine for *Candida* Species. **Journal of Infectious Diseases**, v. 132, n. 1, p. 82-86, 1975.

MORA-DUARTE, J. et al. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 25, p. 2020-2029, 2002.

MOREIRA ROSA, R. et al. Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions. **Life Sciences**, v. 77, n. 19, p. 2398-2411, 2005.

MORO, A. V. et al. Highly stereoselective one-pot procedure to prepare bis- and tris-chalcogenide alkenes via addition of disulfides and diselenides to terminal alkynes. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 13, p. 5257-5268, 2005.

MOUDGAL, V. et al. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 767-769, 2005.

MUGESH, G.; DU MONT W. W.; SIES H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 7, p. 2125-2179, 2001.

MUGGE, C.; HAUSTEIN U. F.; NENOFF P. Causative agents of onychomycosis-a retrospective study. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft** v. 4, n. 3, p. 218-228, 2006.

MUKHERJEE, P. K. et al. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 1, p. 163-194, 2005.

MULLER, A. et al. A novel biologically active seleno-organic compound--I. Glutathione peroxidase-like activity *in vitro* and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). **Biochemical pharmacology**, v. 33, n. 20, p. 3235-3239, 1984.

NEMETH, T. et al. Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis* sensu lato species. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68704, 2013.

NENOFF, P.; OSWALD U.; HAUSTEIN U. F. In vitro susceptibility of yeasts for fluconazole and itraconazole. Evaluation of a microdilution test. **Mycoses**, v. 42, n. 11-12, p. 629-639, 1999.

NISHIYAMA, Y.; UCHIDA K.; YAMAGUCHI H. Morphological changes of *Candida albicans* induced by micafungin (FK463), a water-soluble echinocandin-like lipopeptide. **Journal of Electron Microscopy**, v. 51, n. 4, p. 247-255, 2002.

NOGUCHI, N. Ebselen, a useful tool for understanding cellular redox biology and a promising drug candidate for use in human diseases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 595, n., p. 109-112, 2016.

NOGUEIRA, C. W. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflammation Research**, v. 52, n. 2, p. 56-63, 2003.

NOGUEIRA, C. W.; ZENI G.; ROCHA J. B. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 6255-6285, 2004.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59373, 2013.

O'GRADY, N. P. et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. **Am J Infect Control**, v. 39, n. 4 Suppl 1, p. S1-34, 2011.

OESER, C. et al. Neonatal invasive fungal infection in England 2004-2010. **Clinical Microbiology and Infection** v. 20, n. 9, p. 936-941, 2014.

ORSI, C. F.; COLOMBARI B.; BLASI E. Candida metapsilosis as the least virulent member of the *C. parapsilosis* complex. **Medical Mycology**, v. 48, n. 8, p. 1024-1033, 2010.

ORTEGA, M. et al. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. **Journal of Hospital Infection**, v. 77, n. 2, p. 157-161, 2011.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. et al. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3149-3154, 2003.

OURA, M.; STERNBERG T. H.; WRIGHT E. T. A new antifungal antibiotic, amphotericin B. **Antibiotics Annual**, v. 3, n., p. 566-573, 1955.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 5, p. 503-535, 2009.

PAPPAS, P. G. et al. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 2, p. 161-189, 2004.

PARK, S. et al. Specific substitutions in the echinocandin target *Fks1p* account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3264-3273, 2005.

PARNHAM, M.; SIES H. Ebselen: prospective therapy for cerebral ischaemia. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, n. 3, p. 607-619, 2000.

PARNHAM, M. J. et al. Ebselen: a new approach to the inhibition of peroxide-dependent inflammation. **International Journal of Tissue Reactions**, v. 9, n. 1, p. 45-50, 1987.

PARNHAM, M. J.; SIES H. The early research and development of ebselen. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 9, p. 1248-1253, 2013.

PASTOR, F. J.; GUARRO J. Micafungin: experimental therapy of fungal infections in animal models. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 26, n. 1, p. 42-48, 2009.

- PATERSON, P. J. et al. Treatment failure in invasive aspergillosis: susceptibility of deep tissue isolates following treatment with amphotericin B. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 873-876, 2003.
- PATTON, L. L.; BONITO A. J.; SHUGARS D. A. A systematic review of the effectiveness of antifungal drugs for the prevention and treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 92, n. 2, p. 170-179, 2001.
- PEMAN, J. et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: results of a 2-year multicentre study in Spain. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 24, n. 1, p. 23-30, 2005.
- PEMAN, J. et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in pediatric patients: a Spanish multicenter prospective survey. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 12, p. 4158-4163, 2011a.
- PEMAN, J. et al. Changes in the epidemiology of fungaemia and fluconazole susceptibility of blood isolates during the last 10 years in Spain: results from the FUNGEMYCA study. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 28, n. 2, p. 91-99, 2011b.
- PERFECT, J. R. et al. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 9, p. 1122-1131, 2003.
- PERLIN, D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. **Drug Resistance Updates**, v. 10, n. 3, p. 121-130, 2007.
- PERLIN, D. S. Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 22, n. 6, p. 568-573, 2009.
- PERLIN, D. S. Echinocandin-Resistant *Candida*: Molecular Methods and Phenotypes. **Current Fungal Infection Reports**, v. 5, n. 3, p. 113-119, 2011.
- PERLIN, D. S. Echinocandin resistance, susceptibility testing and prophylaxis: implications for patient management. **Drugs**, v. 74, n. 14, p. 1573-1585, 2014.
- PERLIN, D. S. Echinocandin Resistance in *Candida*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61 Suppl 6, n., p. S612-617, 2015a.
- PERLIN, D. S. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1354, n., p. 1-11, 2015b.
- PFALLER, M. A. et al. *In vitro* susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 760-763, 2006.
- PFALLER, M. A. et al. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1199-1203, 2012.

PFALLER, M. A. et al. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 68, n. 3, p. 278-283, 2010a.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007a.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA D. J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1-53, 2010b.

PFALLER, M. A. et al. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 3, p. 164-176, 2011.

PFALLER, M. A. et al. Effectiveness of anidulafungin in eradicating *Candida* species in invasive candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4795-4797, 2005.

PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1735-1745, 2007b.

PFALLER, M. A. et al. Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods: Report from the ARTEMIS global antifungal susceptibility program, 2001. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1440-1446, 2003a.

PFALLER, M. A. et al. In vitro activities of caspofungin compared with those of fluconazole and itraconazole against 3,959 clinical isolates of *Candida* spp., including 157 fluconazole-resistant isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 1068-1071, 2003b.

PFALLER, M. A. et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2620-2629, 2008.

PFALLER, M. A.; JONES R. N.; CASTANHEIRA M. Regional data analysis of *Candida non-albicans* strains collected in United States medical sites over a 6-year period, 2006-2011. **Mycoses**, v. 57, n. 10, p. 602-611, 2014.

PFALLER, M. A. et al. In vitro activities of 5-fluorocytosine against 8,803 clinical isolates of *Candida* spp.: global assessment of primary resistance using National Committee for Clinical Laboratory Standards susceptibility testing methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3518-3521, 2002.



PFALLER, M. A. et al. Use of Micafungin as a Surrogate Marker To Predict Susceptibility and Resistance to Caspofungin among 3,764 Clinical Isolates of *Candida* by Use of CLSI Methods and Interpretive Criteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 114, 2014.

PFALLER, M. A. et al. In vitro susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates to the new triazole antifungal agents BMS-207147, Sch 56592, and voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 12, p. 3242-3244, 1998.

PFALLER, M. A. et al. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 1, p. 65-69, 2011a.

PFALLER, M. A. et al. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 396-399, 2011b.

PFALLER, M. A. et al. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v., n., p., 2015.

PHAM, C. D. et al. Role of FKS Mutations in *Candida glabrata*: MIC values, echinocandin resistance, and multidrug resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 8, p. 4690-4696, 2014.

POLAK, A. Combination Therapy for Systemic Mycosis. **Infection**, v. 17, n. 4, p. 203-209, 1989.

POSSER, T. et al. Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. **Brain Research**, v. 1199, n., p. 138-147, 2008.

PRIGOL, M.; LUCHESE C.; NOGUEIRA C. W. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative stress caused by acute physical exercise in skeletal muscle and lungs of mice. **Cell Biochemistry and Function**, v. 27, n. 4, p. 216-222, 2009.

QUINDOS, G. et al. In-vitro activity of 5-fluorocytosine against 1,021 Spanish clinical isolates of *Candida* and other medically important yeasts. **Rev Iberoam Micol**, v. 21, n. 2, p. 63-69, 2004.

RAMAGE, G.; MARTINEZ J. P.; LOPEZ-RIBOT J. L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **Fems Yeast Research**, v. 6, n. 7, p. 979-986, 2006.

- REX, J. H. et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 643-658, table of contents, 2001.
- REX, J. H. et al. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 4, p. 662-678, 2000.
- RICCOMBENI, A. et al. Sequence and analysis of the genome of the pathogenic yeast *Candida orthopsilosis*. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35750, 2012.
- RODERO, L. et al. Multicenter study of fungemia due to yeasts in Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 37, n. 4, p. 189-195, 2005.
- RODLOFF, C.; KOCH D.; SCHAUMANN R. Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. **European Journal of Medical Research**, v. 16, n. 4, p. 187-195, 2011.
- ROSA, R. M. et al. Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 10, p. 1287-1304, 2007.
- ROSSETI, I. B.; ROCHA J. B.; COSTA M. S. Diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub> inhibits biofilm formation by *Candida albicans*, increasing both ROS production and membrane permeability. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** v. 29, n., p. 289-295, 2015.
- ROSSIGNOL, T. et al. Transcriptional response of *Candida parapsilosis* following exposure to farnesol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 7, p. 2304-2312, 2007.
- ROY, B.; MEYER S. A. Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 216-218, 1998.
- SALAS, V. et al. Anidulafungin in Treatment of Experimental Invasive Infection by *Candida parapsilosis*: In Vitro Activity, (1 -> 3)-beta-D-Glucan and Mannan Serum Levels, Histopathological Findings, and In Vivo Efficacy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 4985-4989, 2011.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p.
- SANGLARD, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, n. 4, p. 379-385, 2002.
- SANGLARD, D. et al. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 8, p. 2404-2412, 2003.

SANTOS, F. W. et al. Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 12, p. 1723-1730, 2005.

SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n., p. 10-24, 2013.

SARVIKIVI, E. et al. Emergence of fluconazole resistance in a *Candida parapsilosis* strain that caused infections in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2729-2735, 2005.

SAVEGNAGO, L. et al. Mechanisms involved in the antinociceptive effect caused by diphenyl diselenide in the formalin test. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 12, p. 1679-1686, 2008.

SAVEGNAGO, L. et al. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, n. 1, p. 86-92, 2006.

SCHEVEN, M.; SCHEVEN C. Quantitative screening for fluconazole-amphotericin B antagonism in several *Candida albicans* strains by a comparative agar diffusion assay. **Mycoses**, v. 39, n. 3-4, p. 111-114, 1996.

SCHEVEN, M. et al. Post-antibiotic effect and post-expositional polyene antagonism of azole antifungal agents in *Candida albicans*: dependence on substance lipophilia. **Mycoses**, v. 38, n. 11-12, p. 435-442, 1995a.

SCHEVEN, M.; SCHWEGLER F. Antagonistic Interactions between Azoles and Amphotericin-B with Yeast Depend on Azole Lipophilia for Special Test Conditions in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 8, p. 1779-1783, 1995b.

SCHEWE, T. Molecular actions of ebselen an antiinflammatory antioxidant. **General Pharmacology**, v. 26, n. 6, p. 1153-1169, 1995.

SCHWARZ, P. et al. *In vitro* interaction of flucytosine with conventional and new antifungals against *Cryptococcus neoformans* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3361-3364, 2003.

SCOTT, L. J. Micafungin: a review of its use in the prophylaxis and treatment of invasive *Candida* infections. **Drugs**, v. 72, n. 16, p. 2141-2165, 2012.

SEIDLER, M.; SALVENMOSER S.; MULLER F. M. C. In vitro effects of micafungin against *Candida* biofilms on polystyrene and central venous catheter sections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28, n. 6, p. 568-573, 2006.

SENEVIRATNE, C. J.; JIN L.; SAMARANAYAKE L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Diseases**, v. 14, n. 7, p. 582-590, 2008.

- SERRANO, R.; KIELLAND-BRANDT M. C.; FINK G. R. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. **Nature**, v. 319, n. 6055, p. 689-693, 1986.
- SHIELDS, R. K.; NGUYEN M. H.; CLANCY C. J. Clinical perspectives on echinocandin resistance among *Candida* species. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 28, n. 6, p. 514-522, 2015.
- SHIELDS, R. K. et al. Caspofungin MICs Correlate with Treatment Outcomes among Patients with *Candida glabrata* Invasive Candidiasis and Prior Echinocandin Exposure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3528-3535, 2013.
- SIES, H. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, n. 3, p. 313-323, 1993.
- SINGH-BABAK, S. D. et al. Global analysis of the evolution and mechanism of echinocandin resistance in *Candida glabrata*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, p. e1002718, 2012.
- SINGH, N. et al. A safe lithium mimetic for bipolar disorder. **Nature Communications**, v. 4, n., p. 1332, 2013.
- SIPSAS, N. V. et al. Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001-2007): stable incidence but changing epidemiology of a still frequently lethal infection. **Cancer**, v. 115, n. 20, p. 4745-4752, 2009.
- SMITH, P. B.; STEINBACH W. J.; BENJAMIN D. K., JR. Neonatal candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 19, n. 3, p. 603-615, 2005.
- SOTEROPOULOS, P. et al. Molecular characterization of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, an antifungal target in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2349-2355, 2000.
- SOUZA, A. C. et al. *Candida parapsilosis* Resistance to Fluconazole: Molecular Mechanisms and *In Vivo* Impact in Infected *Galleria mellonella* Larvae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6581-6587, 2015.
- SPELLBERG, B. J.; FILLER S. G.; EDWARDS J. E. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 2, p. 244-251, 2006.
- SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK S. L.; BERNARDI M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 752 p.
- STEIER, Z. et al. Flucytosine antagonism of azole activity versus *Candida glabrata*: role of transcription factor Pdr1 and multidrug transporter Cdr1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5543-5547, 2013.
- STILLER, R. L. et al. Correlation of Invitro Susceptibility Test-Results with Invivo Response - Flucytosine Therapy in a Systemic Candidiasis Model. **Journal of Infectious Diseases**, v. 147, n. 6, p. 1070-1077, 1983.

SUCHER, A. J.; CHAHINE E. B.; BALCER H. E. Echinocandins: The Newest Class of Antifungals. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 43, n. 10, p. 1647-1657, 2009.

SUGAR, A. M. Interactions of Amphotericin-B and Sch-39304 in the Treatment of Experimental Murine Candidiasis - Lack of Antagonism of a Polyene-Azole Combination. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 8, p. 1669-1671, 1991.

SUN, H. Y.; SINGH N. Characterisation of breakthrough invasive mycoses in echinocandin recipients: an evidence-based review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 3, p. 211-218, 2010.

TAJ-ALDEEN, S. J. et al. Epidemiology of candidemia in Qatar, the Middle East: performance of MALDI-TOF MS for the identification of *Candida* species, species distribution, outcome, and susceptibility pattern. **Infection**, v. 42, n. 2, p. 393-404, 2014.

TAMURA, N. K. et al. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 91-93, 2007.

TASSEL, D.; MADOFF M. A. Treatment of *Candida* Sepsis and Cryptococcus Meningitis with 5-Fluorocytosine - a New Antifungal Agent. **Journal of the American Medical Association**, v. 206, n. 4, p. 830, 1968.

TAVANTI, A. et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284-292, 2005.

TAVANTI, A. et al. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1455-1462, 2007.

TAVERNIER, E. et al. Development of echinocandin resistance in *Candida krusei* isolates following exposure to micafungin and caspofungin in a BM transplant unit. **Bone Marrow Transplantation**, v. 50, n. 1, p. 158-160, 2015.

THOMPSON, G. R., 3RD et al. Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for invasive candidiasis secondary to *Candida glabrata* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3783-3785, 2008.

TORTORANO, A. M. et al. The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: antifungal susceptibility patterns of 261 non-albicans *Candida* isolates from blood. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 679-682, 2003.

TRABASSO, P. et al. Isolation and drug susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu lato and other species of *C. parapsilosis* complex from patients with blood stream

- infections and proposal of a novel LAMP identification method for the species. **Mycopathologia**, v. 179, n. 1-2, p. 53-62, 2015.
- TROFA, D.; GACSER A.; NOSANCHUK J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606-625, 2008.
- TUMBARELLO, M. et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1843-1850, 2007.
- TUNKEL, A. R.; THOMAS C. Y.; WISPELWEY B. *Candida* Prosthetic Arthritis - Report of a Case Treated with Fluconazole and Review of the Literature. **American Journal of Medicine**, v. 94, n. 1, p. 100-103, 1993.
- VAN ASBECK, E. C. et al. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. **Mycopathologia**, v. 164, n. 6, p. 287-293, 2007.
- VANDEPUTTE, P. et al. Molecular mechanisms of resistance to 5-fluorocytosine in laboratory mutants of *Candida glabrata*. **Mycopathologia**, v. 171, n. 1, p. 11-21, 2011.
- VAZQUEZ, J. A. Combination antifungal therapy against *Candida* species: the new frontier--are we there yet? **Medical Mycology**, v. 41, n. 5, p. 355-368, 2003.
- WALKER, L. A.; GOW N. A.; MUNRO C. A. Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 146-154, 2013.
- WALKER, L. A. et al. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 4, p. e1000040, 2008.
- WANG, E. et al. The ever-evolving landscape of candidaemia in patients with acute leukaemia: non-susceptibility to caspofungin and multidrug resistance are associated with increased mortality. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v., n., p., 2015.
- WANG, H. et al. Investigation of an unrecognized large-scale outbreak of *Candida parapsilosis sensu stricto* fungaemia in a tertiary-care hospital in China. **Scientific reports**, v. 6, n., p. 27099, 2016.
- WENTWORTH, W. E. et al. Recovery of Clogged Glass Jets in Molecular Separators for Combined Gas-Chromatography Mass-Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 1895-1895, 1982.
- WHITE, P. L. Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 229-238, 2003.
- WHITE, P. L. et al. A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis? A United Kingdom Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection

of systemic fungal infections. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 8, n. 3, p. 376-384, 2006.

WIEDERHOLD, N. P.; LEWIS R. E. The echinocandin antifungals: an overview of the pharmacology, spectrum and clinical efficacy. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 12, n. 8, p. 1313-1333, 2003.

WILHELM, E. A. et al. Studies on preventive effects of diphenyl diselenide on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. **Pathophysiology**, v. 16, n. 1, p. 31-37, 2009.

WOJTOWICZ, H. et al. Functionalized alkyl and aryl diselenides as antimicrobial and antiviral agents: synthesis and properties. **Farmaco**, v. 58, n. 12, p. 1235-1242, 2003.

WOJTOWICZ, H. et al. Azaanalogues of ebselen as antimicrobial and antiviral agents: synthesis and properties. **Farmaco**, v. 59, n. 11, p. 863-868, 2004.

WU, T. C. On the development of antifungal agents: perspective of the U.S. Food and Drug Administration. **Clinical Infectious Diseases**, v. 19 Suppl 1, n., p. S54-58, 1994.

YALAZ, M. et al. Successful caspofungin treatment of multidrug resistant *Candida parapsilosis* septicaemia in an extremely low birth weight neonate. **Mycoses**, v. 49, n. 3, p. 242-245, 2006.

YAMAMOTO, Y. et al. Combination therapy with fluconazole and flucytosine for pulmonary cryptococcosis. **Chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 436-441, 1997.

YUSTES, C.; GUARRO J. In vitro synergistic interaction between amphotericin B and micafungin against *Scedosporium* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3498-3500, 2005.

ZAOUTIS, T. E. et al. Antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric patients: a survey of 4 children's hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 52, n. 4, p. 295-298, 2005.

ZICCARDI, M. et al. *Candida parapsilosis* (*sensu lato*) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. **International Journal of Medical Microbiology**, v., n., p., 2015.

ZIMBECK, A. J. et al. FKS Mutations and Elevated Echinocandin MIC Values among *Candida glabrata* Isolates from U.S. Population-Based Surveillance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5042-5047, 2010.

## ANEXO A – CARTA DE PERMISSÃO DO ARTIGO 1



## PERMISSION LETTER

**June 24, 2016**

**Springer reference**

***Mycopathologia***

*pp 1-8*

*First online: 18 June 2016*

**Exploring the In Vitro Resistance of *Candida parapsilosis* to Echinocandins**

*Francieli Chassot, Tarcieli Pozzebon Venturini, Fernanda Baldissera Piasentin, Luana Rossato, Adrian Fiorini, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski, Sydney Hartz Alves*

© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

DOI 10.1007/s11046-016-0028-1

Print ISSN 0301-486X

Online ISSN 1573-0832

Journal No: 11046

**Your project**

**Requestor:** Francieli Chassot

francieli.chassot@gmail.com

**University:** Universidade Federal de Santa Maria/RS

**Purpose:** Dissertation/Thesis

With reference to your request to reuse material in which Springer controls the copyright, our permission is granted free of charge under the following conditions:

**Springer material**

- represents original material which does not carry references to other sources (if material in question refers with a credit to another source, authorization from that source is required as well);
- requires full credit (Springer book/journal title, chapter/article title, volume, year of publication, page, name(s) of author(s), original copyright notice) to the publication in which the material was originally published by adding: "With permission of Springer";
- may not be altered in any manner. Abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of the author;
- **Springer does not supply original artwork or content.**

**This permission**

- is non-exclusive;
- is valid for one-time use only for the purpose of defending your thesis and with a maximum of 100 extra copies in paper. If the thesis is going to be published, permission needs to be reobtained.
- includes use in an electronic form, provided it is an author-created version of the thesis on his/her own website and his/her university's repository, including UMI (according to the definition on the Sherpa website: <http://www.sherpa.ac.uk/romeo/>);
- is subject to courtesy information to the co-author or corresponding author;
- is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without Springer's written permission;
- is only valid if no personal rights, trademarks, or competitive products are infringed.



This license is valid only when the conditions noted above are met.  
Permission free of charge does not prejudice any rights we might have to charge for reproduction of our copyrighted material in the future.

Rights and Permissions

Springer

Tiergartenstr. 17

69121 Heidelberg

Germany

**ANEXO B – SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 1**

Francieli Chassot &lt;francieli.chassot@gmail.com&gt;

---

**RIAM-D-16-00048: código de referencia de su artículo / Your Submission Ref. No.**

1 mensagem

---

**Revista Iberoamericana de Micologia** <reviberoammicol@elsevier.com> 7 de junho de 2016 11:45Para: [francieli.chassot@gmail.com](mailto:francieli.chassot@gmail.com)

Estimado/a Ms. Chassot:

Le confirmamos que se ha iniciado el proceso de revisión de su artículo "Activity of antifungal agents alone and in combination against echinocandin-susceptible and -resistant Candida parapsilosis strains Actividad de los agentes antifúngicos solo y en combinación frente a cepas Candida parapsilosis equinocandinas-susceptibles y -resistentes" (ref. RIAM-D-16-00048), enviado a Revista Iberoamericana de Micología para su posible publicación.

Para consultar el estado de su artículo debe seguir los siguientes pasos:

1. Acceda a la página <http://ees.elsevier.com/riam/>.
2. Introduzca sus datos de registro. Si no sabe o no recuerda su password, entre en: [http://ees.elsevier.com/RIAM/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/RIAM/automail_query.asp).
3. Acceda como autor al sistema (esto le llevará a su menú principal).
4. Entre en "Submissions Being Processed".

Muchas gracias por el interés mostrado por nuestra revista.

Reciba un cordial saludo,

Angeles Hernández  
Journal Manager  
Revista Iberoamericana de Micología  
\*\*\*\*\*

**ANEXO C – SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 2**

Francieli Chassot &lt;francielichassot@gmail.com&gt;

---

**New Microbiologica - Your Submission**

1 mensagem

---

**New Microbiologica Editorial Office**  
<editorial.office@newmicrobiologica.org>  
Para: [francielichassot@gmail.com](mailto:francielichassot@gmail.com)2 de março de  
2016 18:21

New Microbiologica Editorial Office  
Department of Clinical and Experimental Medicine  
University of Bologna  
St. Orsola General Hospital  
9, Via Massarenti  
40138 – BOLOGNA, ITALY  
Tel +39-51-4290.900

The Editors send their thanks for the manuscript "*Antifungal activities of diphenyl diselenide and ebselen against echinocandin-susceptible and -resistant strains of Candida parapsilosis*". You will be contacted when the article has been evaluated.

New Microbiologica levies an article-processing charge for every accepted article, to cover the costs for publication. In 2016 the article processing charge is 80,00 euro/printed page. Your article will be available on line at journal website [www.newmicrobiologica.org](http://www.newmicrobiologica.org)

Sincerely,  
Elisa De Crignis  
Editorial Assistant