

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

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Candida glabrata*
SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL
FRENTE À COMBINAÇÕES ENTRE AGENTES
ANTIFÚNGICOS E NÃO ANTIFÚNGICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Laura Bedin Denardi

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Candida glabrata*
SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL FRENTE À
COMBINAÇÕES ENTRE AGENTES ANTIFÚNGICOS E NÃO
ANTIFÚNGICOS**

Laura Bedin Denardi

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle de Qualidade e Avaliação Biofarmacêutica de Insumos e Medicamentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Sydney Hartz Alves

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

© 2013

Todos os direitos reservados a Laura Bedin Denardi. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito da autora.

Endereço eletrônico: laura-denardi@hotmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Candida glabrata* SENSÍVEIS E
RESISTENTES AO FLUCONAZOL FRENTE À COMBINAÇÕES
ENTRE AGENTES ANTIFÚNGICOS E NÃO ANTIFÚNGICOS**

Elaborada por
Laura Bedin Denardi

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Comissão Examinadora

Sydney Hartz Alves, Dr.
(Presidente/Orientador)

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UNIFRA)

Flávio de Mattos Oliveira, Dr. (UFRGS)

Santa Maria, 19 julho de 2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais
Rosinei Luiz Denardi e Soeli Bedin Denardi
Pelo apoio, dedicação, carinho e
compreensão, compartilho com vocês esta conquista.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Rosinei e Soeli, pelo exemplo de vida, amor, carinho, ensinamentos e apoio em todas as horas. Por estarem ao meu lado em todas as minhas decisões.

A minha irmã, Carine, e meu cunhado Diógenes pela amizade e incentivo, e por estarem sempre presentes.

Ao meu orientador, Prof^o Sydney Hartz Alves, pela oportunidade e acolhida desde 2009, pela confiança em meu trabalho, orientação, ensinamentos, por toda amizade, carinho e apoio demonstrados, que proporcionaram a realização deste trabalho. Pela compreensão nas horas difíceis, e pelas horas de conversa e descontração.

A todos os colegas e amigos do LAPEMI, que me proporcionaram bons momentos de amizade, divertimento, companheirismo e troca de informações. Em especial agradeço a minha “chefinha” e grande amiga, Débora A. N. Mario, pelos ensinamentos desde o início, e pela amizade e carinho verdadeiros a mim sempre dedicada.

Agradeço a Sandra, nossa funcionária, pelo seu empenho em manter todos os materiais necessários para o funcionamento do laboratório, e pela amizade e preocupação comigo.

A todos os meus amigos e amigas que estiveram ao meu lado durante a realização deste trabalho. Em especial as minhas queridas amigas Laíssa Bandeira e Larissa Schaffer pelo enorme carinho sempre.

Ao prof^o Janio M. Santurio, pela acolhida, ensinamentos, apoio, amizade e compreensão.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria, pela disponibilidade e informações oferecidas.

A CAPES pela bolsa de estudos, proporcionando o apoio financeiro para a realização deste trabalho.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos.”

Paulo Belek

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida glabrata* SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL FRENTE À COMBINAÇÕES ENTRE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS E NÃO ANTIFÚNGICOS

Autora: Laura Bedin Denardi

Orientador: Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 19 de julho de 2013.

Candida spp é o mais frequente agente etiológico de infecções fúngicas oportunistas. *Candida albicans* é a espécie mais isolada nas candidíases, no entanto espécies de *Candida* não-*albicans* têm emergido de forma crescente nas unidades hospitalares em que o uso de azólicos de forma profilática ou terapêutica é frequente. *C. glabrata* é uma das espécies mais relevantes neste cenário, causando infecções com alta morbidade e mortalidade, devido às altas taxas de resistência frente aos antifúngicos azólicos, em especial ao fluconazol, e a reduzida sensibilidade a anfotericina B e equinocandinas. A marcante resistência desta espécie aos antifúngicos impõe a busca por novas possibilidades terapêuticas. Uma alternativa é a combinação entre fármacos com distintos mecanismos de ação. Este estudo objetivou avaliar a suscetibilidade *in vitro* de *C. glabrata* a antifúngicos convencionais (anfotericina B, fluconazol, cetoconazol, itraconazol e voriconazol) e associações destes, com fármacos e compostos não-antifúngicos (clorpromazina, linezolid, minociclina, sulfametoxazol, tacrolimus e disseleneto de difenila). Foram avaliados dois grupos de isolados clínicos de *C. glabrata*. O primeiro grupo composto de isolados sensíveis ao fluconazol (FS) (n=30) e o segundo, derivado do primeiro, isolados clínicos resistentes ao fluconazol (FR) (n=30). Com base no protocolo M27-A3 (CLSI, 2008), pelo método de checkerboard. Isoladamente, as CIMs (Concentrações Inibitórias Mínimas) para o fluconazol variaram de 0,25 - \geq 64,00 μ g/mL (FS) e 64,00 - 256,00 μ g/mL (FR); para anfotericina B variaram de 0,06 - 0,50 μ g/mL (FS) e 0,03 - 0,50 μ g/mL (FR); para o itraconazol 0,50 - 8,00 μ g/mL (FS) e 1,00 - 16,00 μ g/mL (FR); para cetoconazol 0,13 - 2,00 μ g/mL (FS) e 0,50 - 16,00 μ g/mL (FR); para voriconazol 0,13 - 4,00 μ g/mL (FS) e 1,00 - 16,00 μ g/mL (FR). As combinações de tacrolimus com azólicos apresentaram consideráveis taxas de sinergismo; para o grupo FS tacrolimus + cetoconazol (43%), tacrolimus + itraconazol (43%), tacrolimus + voriconazol (37%). Para o grupo FR tacrolimus + cetoconazol (77%), tacrolimus + itraconazol (73%), tacrolimus + voriconazol (63%). Linezolid associada ao cetoconazol e ao voriconazol apresentou altas taxas de sinergismo frente ao grupo FR, 76,67% e 70%, respectivamente. Minociclina + anfotericina B obteve 46,67% (FS) e 36,67% (FR) de sinergismo; clorpromazina + anfotericina B foi sinérgica para 40% do grupo FR. Clorpromazina combinada aos azólicos apresentou altas taxas de antagonismo para o grupo resistente,

76,67%, 70% e 80% para cetoconazol, itraconazol e voriconazol, respectivamente; para o grupo sensível as combinações com clorpromazina tiveram maiores taxas de indiferença. Interações sinérgicas (76,66%) e indiferentes (23,34%) foram observadas na combinação de anfotericina B e disseleneto de difenila para o grupo sensível. A combinação de disseleneto de difenila com fluconazol apresentou indiferença (50%) e antagonismo (40%) para o grupo sensível, 10% dos isolados apresentaram sinergismo. Sulfametoxazol apresentou um maior percentual de interações indiferentes, associado a todos os antifúngicos testados frente aos dois grupos, 70% (FS), 73,34% (FR) associado ao cetoconazol, 60% (FS), 43,34% (FR) associado ao itraconazol, 56,67% (FS), 66,67% (FR) na associação com voriconazol, 86,66% (FS), 80% (FR) associado à anfotericina B. As associações de maior relevância merecem avaliação *in vivo*, a fim de verificar o potencial das mesmas no tratamento de infecções por *Candida glabrata*.

Palavras chave: *Candida glabrata*, resistência antifúngica, terapia de combinação.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

***IN VITRO* SUSCETIBILITY OF CLINICAL ISOLATES *Candida glabrata* FLUCONAZOLE-SUSCEPTIBLE AND -RESISTANT AGAINST TO COMBINATION BETWEEN ANTIFUNGAL AND NON-ANTIFUNGAL AGENTS**

Autora: Laura Bedin Denardi

Orientador: Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 19 de julho de 2013.

Candida species are the most common etiologic agent of opportunistic fungal infections. *Candida albicans* is the most frequent species in candidiasis, however species of non-*albicans* species have emerged increasingly in hospitals in which the use of azoles as a prophylactic or therapeutic is common. *C. glabrata* is the species most relevant in this scenario, causing infections with high morbidity and mortality due to high rates of resistance to antifungal azoles, especially fluconazole, and reduced sensitivity to amphotericin B and echinocandins. The remarkable resistance of these species to antifungal agents requires the search for new therapeutic options. An alternative is the combination of drugs with different mechanisms of action. This study aimed to evaluate the *in vitro* susceptibility of *Candida glabrata* to conventional antifungal agents (amphotericin B, ketoconazole, itraconazole, fluconazole and voriconazole), and these associations with non-antifungal drugs (chlorpromazine, linezolid, minocycline, sulfamethoxazole, tacrolimus and diphenyl diselenide). Two groups of clinical isolates of *C. glabrata* were evaluated. The first group consists of fluconazole-sensitive clinical isolates (FS) (n = 30) and the second, derivative of the first, fluconazole-resistant clinical isolates (FR) (n = 30). Based on protocol M27-A3 (CLSI, 2008), the checkerboard method. In isolation, MICs (Minimum Inhibitory Concentration) for fluconazole ranged from 0.25 to ≥ 64.00 $\mu\text{g/mL}$ (FS) and 64.00 to 256.00 $\mu\text{g/mL}$ (FR); for amphotericin B ranged from 0.06 to 0.50 $\mu\text{g/mL}$ (FS) and 0.03 to 0.50 $\mu\text{g/mL}$ (FR); for itraconazole 0.50 to 8.00 $\mu\text{g/mL}$ (FS) and 1.00 to 16.00 $\mu\text{g/mL}$ (FR); for ketoconazole 0.13 to 2.00 $\mu\text{g/mL}$ (FS) and 0.50 to 16.00 $\mu\text{g/mL}$ (FR); for voriconazole 0.13 to 4.00 $\mu\text{g/mL}$ (FS) and 1.00 to 16.00 $\mu\text{g/mL}$ (FR). The combinations of tacrolimus with azoles showed significant synergism rates; for the group FS tacrolimus + ketoconazole (43%), tacrolimus + itraconazole (43%), tacrolimus + voriconazole (37%); for the group FR ketoconazole + tacrolimus (77%) tacrolimus + itraconazole (73%), tacrolimus + voriconazole (63%). Linezolid combined with ketoconazole and voriconazole showed high rates of synergism against the FR group, 76.67% and 70%, respectively. Minocycline + amphotericin B obtained 46.67% (FS) and 36.67% (FR) of synergism; chlorpromazine + amphotericin B

was synergistic for 40% of the FR. Chlorpromazine combined to azoles showed high rates of antagonism for resistant group, 76.67%, 70% and 80% for ketoconazole, itraconazole and voriconazole, respectively, for the sensitive group combinations had higher rates of indifference. Sulfamethoxazole evidenced a higher percentage of indifferent interactions associated with all tested antifungals, 70% (FS), 73.34% (FR) associated to ketoconazole, 60% (FS), 43.34% (FR) associated to itraconazole, 56.67% (FS), 66.67% (FR) in association with voriconazole, 86.66% (FS), 80% (FR) associated to amphotericin B. Synergistic (76.66%) and indifferent (23.34%) interactions were observed for diphenyl diselenide + amphotericin B combination for the sensitive group. Diphenyl diselenide + fluconazole combination demonstrated indifferent (50%) and antagonistic (40%) interactions for sensitive group, whereas synergistic interactions were observed in 10% of the isolates. The most significant associations deserve *in vivo* evaluation in order to verify their potential in the treatment of infections caused by *C. glabrata*.

Key-words: *Candida glabrata*, antifungal resistance, combination antifungal therapy.

LISTA DE TABELAS

1. Tabela I: Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) dos isolados de *Candida glabrata* sensíveis ao fluconazol e *Candida glabrata* resistentes ao fluconazol frente a anfotericina B (AmB), cetoconazol (CTZ), itraconazol (ITZ) e voriconazol (VRC) e fluconazol (FLU) isoladamente.
2. Tabela II: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de cetoconazol combinado com tacrolimus em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
3. Tabela III: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de itraconazol combinado com tacrolimus em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
4. Tabela IV: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de voriconazol combinado com tacrolimus em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
5. Tabela V: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de anfotericina B combinada com tacrolimus em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
6. Tabela VI: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de cetoconazol combinado com linezolida em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
7. Tabela VII: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de itraconazol combinado com linezolida em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
8. Tabela VIII: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de voriconazol combinado com linezolida em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
9. Tabela IX: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de anfotericina B combinada com linezolida em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
10. Tabela X: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de cetoconazol combinado com minociclina em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
11. Tabela XI: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de itraconazol combinado com minociclina em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
12. Tabela XII: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de voriconazol combinado com minociclina em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
13. Tabela XIII: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de anfotericina B combinada com minociclina em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

14. Tabela XIV: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de cetoconazol combinado com sulfametoxazol em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
15. Tabela XV: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de itraconazol combinado com sulfametoxazol em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
16. Tabela XVI: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de voriconazol combinado com sulfametoxazol em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
17. Tabela XVII: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de anfotericina B combinada com sulfametoxazol em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
18. Tabela XVIII: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de cetoconazol combinado com clorpromazina em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
19. Tabela XIX: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de itraconazol combinado com clorpromazina em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
20. Tabela XX: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de voriconazol combinado com clorpromazina em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
21. Tabela XXI: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de anfotericina B combinada com clorpromazina em isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
22. Tabela XXII: Interações resultantes da combinação de cetoconazol (CTZ) e tacrolimus (TAC) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
23. Tabela XXIII: Interações resultantes da combinação de itraconazol (ITZ) e tacrolimus (TAC) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
24. Tabela XXIV: Interações resultantes da combinação de voriconazol (VRC) e tacrolimus (TAC) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
25. Tabela XXV: Interações resultantes da combinação de anfotericina B (AmB) e tacrolimus (TAC) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
26. Tabela XXVI: Interações resultantes da combinação de cetoconazol (CTZ) e linezolid (LIN) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

27. Tabela XXVII: Interações resultantes da combinação de itraconazol (ITZ) e linezolid (LIN) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
28. Tabela XXVIII: Interações resultantes da combinação de voriconazol (VRC) e linezolid (LIN) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
29. Tabela XXIX: Interações resultantes da combinação de anfotericina B (AmB) e linezolid (LIN) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
30. Tabela XXX: Interações resultantes da combinação de cetoconazol (CTZ) e minociclina (MIN) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
31. Tabela XXXI: Interações resultantes da combinação de itraconazol (ITZ) e minociclina (MIN) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
32. Tabela XXXII: Interações resultantes da combinação de voriconazol (VRC) e minociclina (MIN) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
33. Tabela XXXIII: Interações resultantes da combinação de anfotericina (AmB) e minociclina (MIN) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
34. Tabela XXXIV: Interações resultantes da combinação de cetoconazol (CTZ) e sulfametoxazol (SUL) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
35. Tabela XXXV: Interações resultantes da combinação de itraconazol (ITZ) e sulfametoxazol (SUL) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
36. Tabela XXXVI: Interações resultantes da combinação de voriconazol (VRC) e sulfametoxazol (SUL) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
37. Tabela XXXVII: Interações resultantes da combinação de anfotericina B (AmB) e sulfametoxazol (SUL) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

38. Tabela XXXVIII: Interações resultantes da combinação de cetoconazol (CTZ) e clorpromazina (CLO) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
39. Tabela XXXIX: Interações resultantes da combinação de itraconazol (ITZ) e clorpromazina (CLO) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
40. Tabela XL: Interações resultantes da combinação de voriconazol (VRC) e clorpromazina (CLO) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.
41. Tabela XLI: Interações resultantes da combinação de anfotericina B (AmB) e clorpromazina (CLO) frente aos isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
O gênero <i>Candida</i>	19
Candidíases.....	20
<i>Candida glabrata</i>	21
Agentes Antifúngicos.....	27
Agentes não-antifúngicos e associações.....	32
OBJETIVOS.....	35
Objetivo geral.....	35
Objetivos específicos.....	35
ARTIGO I – SYNERGISTIC EFFECTS OF TACROLIMUS AND AZOLE ANTIFUNGAL IN <i>Candida glabrata</i> ISOLATES.....	38
Abstract.....	38
Introduction.....	39
Material and Methods.....	40
Results.....	41
Discussion.....	41
References.....	45
Tables.....	48
ARTIGO II – EFFECTS OF ANTIMYCOTICS ALONE AND IN COMBINATION WITH NON-ANTIFUNGAL AGENTS AGAINST <i>Candida glabrata</i> STRAINS SUSCEPTIBLE OR RESISTANT TO FLUCONAZOLE.....	49
Abstract.....	50
Introduction.....	51
Material and Methods.....	52
Results.....	53
Discussion.....	55
Conclusion.....	58
References.....	59
Tables.....	63
ARTIGO III - ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF DIPHENYL DISELENIDE ALONE AND IN COMBINATION WITH FLUCONAZOLE OR AMPHOTERICIN B AGAINST FLUCONAZOLE-RESISTANT AND FLUCONAZOLE-SUSCEPTIBLE <i>Candida glabrata</i>	65
Abstract.....	66
Introduction.....	67
Material and Methods.....	68
Results.....	69
Discussion.....	69
References.....	72
Table.....	76
DISCUSSÃO.....	77
CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
LISTA DE TABELAS.....	100

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas têm emergido ao longo dos anos como uma das principais causas de doenças humanas, especialmente entre pacientes imunocomprometidos, hospitalizados e com doenças de base graves (BLUMBERG et al, 2001; DIEKEMA & PFALLER, 2004; EGGIMAN et al, 2003; FRIDKIN, 2005; MCNEIL et al, 2001; NUCCI & MARR, 2005). *Candida* spp é o principal agente etiológico de micoses oportunistas em todo o mundo (COLOMBO et al, 2006; MORGAN, 2005; PAPPAS et al, 2003; TORTORANO et al, 2004; TORTORANO et al, 2006).

O gênero *Candida* comporta em torno de 200 espécies e a *C. albicans* é a espécie mais comum associada às candidíases. Todavia, nos últimos anos vem aumentando o número de candidíases causadas por espécies de *Candida* não-*albicans*, entre elas *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. glabrata* (PFALLER & DIEKEMA, 2007; MANZANO-GAYOSSO et al, 2008).

Candida glabrata tem emergido em muitos países como 2° ou 3° agente mais isolado em episódios de candidíase (PFALLER & DIEKEMA, 2007; PERLROTH et al, 2007; SANDVEN et al, 2000). A incidência de *C. glabrata* tem aumentado nas candidemias desde 1993; todavia, este aumento tem sido geograficamente determinado. De modo geral, na América do Norte e Europa, *C. glabrata* se impõe como a 2° espécie mais envolvida em candidíases, muitas delas com risco de morte (TRICK et al, 2002).

No Brasil, *C. glabrata* ocupa o 5° lugar (4,9%) entre os agentes de candidemia (COLOMBO et al, 2006). Em compensação, tal percentual corresponde a 0,12 casos/1000. Assim, os percentuais brasileiros são mais baixos que na América do Norte e Europa, em função de que as candidemias no Brasil (2,49 casos/1000) são até 15 vezes mais frequentes.

C. glabrata se caracteriza por evidenciar intrinsecamente menor sensibilidade frente ao fluconazol, sendo primariamente menos sensível a este azólico e também evidenciando a capacidade de tornar-se mais rapidamente resistente ao fluconazol e, cruzadamente aos demais antifúngicos azólicos do que outras espécies de *Candida*. Ao mesmo tempo, *C. glabrata* apresenta menor sensibilidade a anfotericina B (PFALLER & DIEKEMA, 2007; WARNOCK, 2007).

Neste contexto as equinocandinas surgem como uma possível alternativa no tratamento de candidíase, sobretudo em isolados de *Candida glabrata* fluconazol-resistente, porém já têm sido detectados perfis de resistência, o que ameaça este perfil favorável de sensibilidade (THOMPSON et al, 2008; KATIYAR et al, 2006; NIIMI et al, 2012; GARCIA-EFFROM et al, 2009).

Em resposta às falhas da terapêutica antifúngica, vários autores têm buscado estratégias que garantam o sucesso da atividade antifúngica. Entre estas estratégias a combinação de fármacos tem merecido atenção (MUKHERJEE et al, 2005). Os fármacos não-antifúngicos, muitas vezes, não evidenciam ação intrínseca sobre a célula fúngica, no entanto, podem interferir em alguns mecanismos celulares permitindo uma maior penetração e ação do antifúngico. Neste contexto, ressalta-se a importância de analisar as interações entre agentes antifúngicos convencionais e agentes não-antifúngicos frente a fungos de difícil tratamento, em especial, *C. glabrata*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O gênero *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao filo Ascomycota, classe Hemiaslomycetes, ordem Saccharomycetales e família Candidaceae (fase anamórfica de Saccharomycetales) (CALDERONE, 2002). Este gênero inclui mais de 200 espécies, das quais aproximadamente 10% são consideradas agentes etiológicos de candidíases (CHAVES et al, 2003).

As espécies deste gênero tem distribuição ubíqua na natureza e fazem parte da microbiota normal humana, sendo encontradas frequentemente como saprófitas na pele, orofaringe, mucosa vaginal, trato gastrointestinal e genitourinário, em indivíduos saudáveis (LACAZ, 2002; BARBEDO & SGARBI, 2010). Passam da forma comensal para a forma patogênica quando ocorrem alterações na imunidade do hospedeiro. Os principais fatores predisponentes a infecção por *Candida* relacionados a defeitos na imunidade são decorrentes de mudanças fisiológicas características da infância, envelhecimento, ou ainda mais frequentes, doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênita ou adquirida, como pacientes portadores do vírus HIV (PFALLER & DIEKEMA, 2007; COLOMBO et al, 2006). Alguns fatores que também contribuem para a infecção por *Candida* é o rompimento de barreiras mucocutâneas, disfunção dos neutrófilos, desordem metabólica, transplantes, e quimioterapia. O aumento no número de pacientes imunocomprometidos tem aumentado de forma expressiva a prevalência e gravidade das infecções fúngicas por microrganismos oportunistas, em especial candidíase oral e sistêmica (BALKIS et al, 2002; BODEY et al, 2002; TRICK et al, 2002; PFALLER & DIEKEMA, 2007; COLOMBO et al, 2006).

Os fungos do gênero *Candida* constituem-se em leveduras unicelulares, Gram-positivas, e apresentam-se como células globosas ou ovaladas com diâmetro de 3 a 6 µm, que podem formar brotamentos e pseudohifas. Em Ágar Sabouraud Dextrose, elas se apresentam na cor branco-amarelada, de aspecto cremoso, lisas brilhantes ou secas, ou rugosas e sem brilho, apresentando crescimento rápido a 37°C (LACAZ et al, 2002).

As técnicas convencionais para o diagnóstico e diferenciação das espécies de *Candida* baseiam-se na micromorfologia, como a presença de blastoconídios no exame direto, e em provas bioquímicas, como a assimilação (auxanograma) e a fermentação (zimograma) de fontes de carbono e nitrogênio. Dentre os testes bioquímicos, os sistemas manuais mais utilizados são API 20 AUX[®] e o ID 32C[®] e os automatizados são o Vitek[®] e o Microscan[®].

Entre os meios de isolamento cromogênicos destaca-se o CHROMagarCandidaTM que é capaz de diferenciar as espécies de *Candida* e também verificar a ocorrência de espécies múltiplas (ELLEPOLLA & MORRISON, 2005).

A identificação de *C. glabrata* pode ser realizada por métodos microbiológicos e bioquímicos, e também mais recentemente por métodos imunológicos e moleculares. No CHROMagarCandidaTM a *C. glabrata* apresenta coloração púrpura. Outra característica é assimilar somente os açúcares trealose e glicose, diferentemente de outras espécies que assimilam a maioria dos açúcares (BAUMGARTNER et al, 1996; BOUCHARA et al, 1996). Um dos métodos moleculares mais utilizados, baseado em amplificação do DNA é a PCR (polymerase chain reaction) que permite a identificação de leveduras patogênicas diretamente de amostras teciduais. Baseia-se na amplificação de regiões específicas do DNA cromossômico (ITS1 e ITS2 – região espaçadora transcrita interna, entre 5.8S-18S e 18S-28S rRNA, respectivamente; gene 18S, gene TOPII topoisomerase-II) e hibridização do amplicons com sondas de DNA conhecidos, derivados de patógenos mais frequentes (WAHYUNINGSIH et al, 2000; MASSONET et al, 2004; LIGORI et al, 2007).

As técnicas moleculares mais utilizadas para identificação das diferentes espécies de *Candida* e também diferenciação entre cepas da mesma espécie baseiam-se na análise do DNA cromossômico (CHEN et al, 2002). Diversas técnicas moleculares são utilizadas atualmente na identificação de espécies de *Candida*, entre elas a Single-strand Conformational Polymorphism (SSCP) que consiste em uma eletroforese de alta resolução baseada na diferença de migração de fragmentos de DNA de fita simples amplificados por PCR; Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) que envolve amplificação por PCR seguida de sequenciamento do DNA; Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorfism (PCR-RFLP) onde o material amplificado de uma PCR é submetido a enzimas digestivas que cortam o DNA em posições constantes dentro de um sítio; Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) que consiste em uma PCR feita com um só primer amplificando fragmentos de DNA de forma aleatória (CHEN et al, 2002; BORIOLLO et al, 2006).

2.2 Candidíases

As infecções por *Candida* spp podem se manifestar de forma branda ou grave, aguda ou crônica, superficial ou profunda. As formas clínicas se dividem em cutâneo-mucosas, sistêmicas e alérgicas. Na candidíase mucosa os tecidos mais afetados são os do trato

digestório e genitálias; na forma cutânea as áreas intertriginosas como dobras da pele, virilha e axilas, ainda, áreas interdigitais de pés e mãos e as unhas são frequentemente afetados. A forma alérgica se manifesta de diversas maneiras, se observando lesões vesiculosas ou eczematóides. As formas sistêmicas são infecções graves como sepse, meningite, endocardite, pneumonias e lesão ulcerativa do esôfago (LACAZ et al, 2002).

A incidência de candidíase oral teve substancial aumento durante as últimas décadas devido ao crescimento de pacientes imunocomprometidos, em particular em indivíduos portadores do HIV (66%). Considera-se que os indivíduos portadores do vírus HIV sofrerão pelo menos um episódio de candidíase orofaríngea ao longo da progressão da doença. A candidíase oral é a porta de entrada para complicações das candidíases do tipo orofaríngeas, esofágicas, laringeas e sistêmicas (SÁNCHEZ-VARGAS et al, 2002). Além disso, tem-se observado uma tendência ao aumento no número de infecções orais relacionadas com as espécies não-*albicans* como *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (PFALLER & DIEKEMA, 2007; MANZANO-GAYOSSO et al, 2008).

A candidíase vulvovaginal afeta um número significativo de mulheres em idade fértil, cerca de 75% das mulheres apresentarão, pelo menos, um episódio de candidíase vulvovaginal durante a vida. Esta infecção é considerada recorrente quando, pelo menos quatro episódios específicos ou três episódios não relacionados à antibióticoterapia ocorrem durante um ano. (BIGGS et al, 2007; WORKOWSKI et al, 2006). *C. glabrata* é a segunda espécie mais frequente em candidíases vulvovaginais, acometendo cerca de 15% das pacientes infectadas (ZIARRUSTA, 2002).

A candidemia é observada, em particular, em pacientes hospitalizados submetidos a terapias antimicrobianas por um longo período de tempo, a procedimentos invasivos ou terapia imunossupressiva (SIDRIM & ROCHA, 2004). Em hospitais terciários as infecções por *Candida* sp respondem por cerca de 80% das infecções fúngicas e, devido a alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano, têm grande importância no cenário hospitalar. Representam importante desafio aos clínicos devido às dificuldades diagnósticas e terapêuticas, além do alto custo do tratamento e altas taxas de mortalidade (COLOMBO et al, 2003; COLOMBO et al, 2006).

2.3 *Candida glabrata*

Candida glabrata foi inicialmente classificada como *Cryptococcus glabratus* (1917) e posteriormente reclassificada em *Torulopsis glabrata* (1938), devido a seus blastoconídios não produzirem pseudohifas. No entanto, mais tarde foi observado que ela é capaz de formar pseudohifas em ágar contendo baixa concentração de amônia, porém, esta característica não foi considerada como um fator de confiança para diferenciar o gênero *Torulopsis*, então ela foi novamente reclassificada no gênero *Candida* (CSANK & HAYNES, 2000).

C. glabrata era considerada, historicamente, uma levedura saprófita, não patogênica, da microbiota normal de indivíduos saudáveis, raramente causando infecções em humanos (HALEY, 1961). Todavia com o aumento do uso de terapias imunossupressivas e antimicóticos de amplo espectro a frequência de infecções por *C. glabrata* aumentou significativamente. É uma das mais importante espécies de *Candida* não-*albicans*. Possui capacidade de adquirir e expressar mutações de resistência a várias classes de antifúngicos (PFALLER et al, 2012).

Raramente, esta espécie é a responsável por colonização e infecção em crianças ou neonatos, aumentando consideravelmente com a idade. Ocorre com maior frequência em pacientes idosos. Têm ocorrido em hospitais com maior número de pacientes leucêmicos ou que fizeram transplante de medula óssea e receberam tratamento prévio com fluconazol (BODEY et al, 2002).

Ao contrário de outras espécies de *Candida*, *C. glabrata* não apresenta dimorfismo, assim, são encontrados somente blastoconídios tanto na forma comensal quanto na forma patogênica (HITCHCOCK et al, 1993; FIDEL et al, 1999). O genoma de *C. glabrata* é haplóide, diferente de *C. albicans* e muitas outras espécies de *Candida* que é diplóide (BARNS et al, 1991). Possuindo treze cromossomos e cerca de duzentos e sete genes codificando RNAt e 5.283 genes codificando proteínas. Assemelha-se a *Saccharomyces cerevisiae* no conteúdo de CG (guanina-citosina) sendo que este contém 38,3% de CG e *C. glabrata* 38,8% (DUJON, 2004; BIALKOVA & SUBIK, 2006).

Existem poucas investigações a respeito da virulência de *C. glabrata*. A falta de formação de pseudohifas pode ser um fator que contribui para considerá-la com uma baixa virulência, uma vez que as pseudohifas são reconhecidas como um meio de aumentar a

aderência e invasão nos tecidos por *C. albicans* assim como um meio de aumentar a produção de enzimas proteolíticas e a modulação de antígenos (RÜCHEL, 1999).

A produção de proteinases (CHAKRABARTI et al, 1991) e fosfolipases (GHANNOUM, 2000) por *C. albicans* está também associada a sua patogenicidade, cepas virulentas desta espécie produzem freqüentemente aspartil proteinase. *C. glabrata* também é capaz de produzir proteinases, porém, estas não são especificadas (CHAKRABARTI et al, 1991) e secreta fosfolipases, no entanto em uma quantidade bem menor que *C. albicans* (GHANNOUM, 2000). A hidrofobicidade da superfície celular (CSH) também é considerada um fator de virulência que é afetado por fatores ambientais em *C. albicans*, *C. glabrata* possui esta propriedade semelhantemente a *C. albicans*, no entanto ela não muda com o meio (KLOTZ et al, 1985). Enquanto *C. albicans* é reconhecida avidamente por anticorpos monoclonais como integrinas $\beta 2$ (receptores de adesinas) a ligação de *C. glabrata* a esses mesmos anticorpos não é detectada (BENDEL et al, 1991), além disso *C. glabrata* apresenta mínima aderência ao endotélio vascular (KLOTZ et al, 1983).

A superexpressão de genes, como CgYP51, requeridos para a integridade da parede celular, aderência as células mamíferas, virulência e sobrevivência em macrófagos, é um fator que contribui para aumentar a virulência de *C. glabrata* (KAUR et al, 2005; FERRARI et al, 2010). Outro mecanismo que pode contribuir para o aumento da virulência, assim como, da resistência aos antifúngicos é a plasticidade genômica, por ser um organismo haplóide o rearranjo genômico, incluindo translocação cromossômica e criação de novos cromossomos, pode ocorrer facilmente (MULLER et al, 2009). A formação de novos minicromossomos, resultantes de duplicações de outros cromossomos permite o crescimento na presença de altos níveis de fluconazol, e a perda desses cromossomos leva ao aumento da sensibilidade ao fluconazol (POLÁKOVÁ et al, 2009).

As infecções por *C. glabrata* estão associadas a pacientes com um longo tempo de hospitalização e fazendo uso prévio de terapia antimicrobiana (CHOW et al, 2008). Conhecimentos prévios a respeito da patogenia de *C. glabrata* supunham que a infecção por esta espécie seria exclusivamente de origem endógena, ou seja, da própria microbiota do paciente, no entanto um estudo realizado por Vasquez e colaboradores (1998) sugeriu que a aquisição nosocomial de *C. glabrata* não é incomum e pode ser adquirida de fonte exógena, como as mãos de funcionários hospitalares.

A frequência de *C. glabrata* aumentou significativamente para 15-20% de todas as infecções por *Candida*, e esse aumento pode ser devido a um decréscimo de infecções por *C. albicans*, em função de profilaxia e uso prolongado de fluconazol e diagnósticos mais sensíveis (KAUFFMAN et al, 2000; RUAN et al, 2009). *C. glabrata* é a segunda espécie de *Candida* mais comumente isolada de infecções hematogênicas nos EUA, apresentando uma frequência de aproximadamente 25% dos casos, enquanto que na América Latina em torno de 7% dos casos são atribuídos a esta espécie (PFALLER & DIEKEMA, 2007; PERLROTH et al, 2007).

As infecções por *C. glabrata* são mais difíceis de tratar e frequentemente são resistentes aos antifúngicos usados na clínica, por isso evidenciam altas taxas de mortalidade em pacientes hospitalizados em situações de risco, como internação em UTI, cirurgia abdominal, insuficiência renal e tratamento prévio com fluconazol (SOBEL et al, 2000; COLOMBO et al, 2006; TUMBARELLO et al, 2008).

Comparando-se com outras espécies de *Candida*, os isolados de *C. glabrata*, tendem a apresentar as maiores Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs), quando testadas frente à azólicos e também aos demais agentes antifúngicos, incluindo a anfotericina B. As CIMs de fluconazol para *C. glabrata* são aproximadamente dezesseis vezes maiores que para *C. albicans*, representando assim, uma seleção de espécies resistentes durante o uso profilático do fluconazol (ZEPELIN et al, 2007; GARNACCHO-MONTERO et al, 2010).

Estudos de suscetibilidade de *C. glabrata* demonstraram que 61,9% dos isolados são sensíveis ao fluconazol e 75,2% são sensíveis à anfotericina B; porém embora inicialmente sensíveis, os tratamentos rapidamente revertem o perfil de sensível para resistente (PFALLER et al, 2004). Frente aos novos triazólicos como o voriconazol, ravuconazol e posaconazol, *C. glabrata* é significativamente mais sensível do que ao fluconazol. Por isto, foi sugerido que os novos triazólicos sejam ativos frente a isolados de *C. glabrata* fluconazol-resistentes. Por outro lado, quando se comparam as CIMs, há evidentes correlações entre voriconazol e posaconazol com as CIMs frente ao fluconazol, comprovando a resistência cruzada. Isolados resistentes ao fluconazol são menos sensíveis ao voriconazol, ravuconazol e posaconazol com $CIM \geq 2,0 \mu\text{g/mL}$ para 83-92 % dos isolados (BENNETT et al, 2004).

Pfaller et al (2001) documentaram a menor sensibilidade de isolados desta espécie frente à anfotericina B. Em uma análise de 949 isolados clínicos de *C. glabrata*, observou-se

que cerca de 53% das amostras avaliadas apresentaram CIMs para anfotericina B maiores que 1µg/mL, valores estes considerados muito elevados para terapêutica convencional (DIEKEMA et al, 2002).

A resistência antifúngica ocorre *in vitro* e pode, ou não, estar associada com resistência clínica, que corresponde à falta de resposta do paciente ao tratamento, frente ao uso de um ou mais agentes antifúngicos. Está ligada a fatores como a farmacodinâmica do antifúngico, ou aqueles relacionados com o paciente ou com a espécie causadora da infecção (PFALLER & DIEKEMA, 2007).

A resistência *in vitro* pode ser dividida em resistência primária, também conhecida como resistência intrínseca ou inata, que ocorre quando o microrganismo é naturalmente resistente ao fármaco antifúngico (LEWIS, 2009) e resistência secundária ou adquirida, que ocorre quando a cepa que está infectando o indivíduo se torna resistente após a exposição a um agente antifúngico utilizado no tratamento, podendo selecionar espécies menos sensíveis como *C. glabrata* (BENNETT et al, 2004).

Os mecanismos de resistência de *Candida* aos azólicos têm sido elucidados em muitos estudos, podendo ocorrer mais de um mecanismo simultaneamente na célula fúngica (CHAU et al, 2004; MORSCHHÄUSER, 2002; WHITE, 2002). *C. glabrata* é a espécie que mais manifesta resistência aos antifúngicos, principalmente aos antifúngicos azólicos, em um tempo relativamente menor (VANDEPUTTE et al, 2008; CHAPELAND-LECLERC et al, 2010; KROGH-MADSEN et al, 2006). A resistência de *C. glabrata* aos azólicos pode ser explicada por diferentes mecanismos.

Os principais mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da resistência em *Candida* são: superexpressão de bombas de efluxo, alterações na biossíntese do ergosterol, mutações e superexpressão do gene ERG 11, que codifica a enzima lanosterol-14- α demetilase (MORSCHHÄUSER, 2002). A redução do acúmulo intracelular do medicamento, pelas bombas de efluxo, é um dos mecanismos mais importantes de resistência antifúngica. O maior efluxo de antifúngico realizado pelas células fúngicas é causado pela superexpressão de genes que codificam proteínas transportadoras de membrana (MORSCHHÄUSER, 2002).

Os genes CDR1 e CDR2 (*Candida Drug Resistance*) codificam proteínas transportadoras do tipo ABC (*ATP-binding-cassette*), que atuam como bombas de efluxo

transmembrana utilizando energia em forma de ATP para mobilizar vários compostos para o meio extracelular (AKINS, 2005).

O gene MDR1 (*Multidrug Resistance*) também atua no sistema de transporte dependente de energia. Este gene codifica uma proteína que pertence à família das permeases e atua como transportadora de membrana do tipo MFS (*Major Facilitator Superfamily*) também transportando compostos para fora da célula (AKINS, 2005).

Em *C. glabrata* quatro transportadores do tipo ABC têm sido implicados no surgimento da resistência: CgCDR1p, CgPDH1p, CgSNQ2p e CgAUS1p (SANGLARD et al, 2001). *C. glabrata* exposta ao fluconazol *in vitro* tem a capacidade de adquirir resistência mediada por transportadores do tipo ABC, sendo que o gene predominantemente expresso associado com a resistência desta espécie é o CgCDR1p (SANGLARD et al, 2001).

O alvo primário da ação dos antifúngicos azólicos é a lanosterol-14- α demetilase (ERG11p ou 14DM) principal enzima responsável pela síntese do ergosterol (SHEEHAN et al, 1999). A inibição desta enzima resulta em redução do ergosterol, assim como acúmulo intracelular de seu precursor, o lanosterol, o qual é convertido em 14 α -methylfecosterol, este, por sua vez, é convertido pela enzima Δ 5-6 desaturase em 14 α -methyl-3,6-diol, um composto tóxico a célula que inibe o seu crescimento (KELLY et al, 1995; LUPETI et al, 2002; AKINS, 2005). A inativação da Δ 5-6 desaturase pelas células leveduriformes expostas aos azólicos impede a formação do metabólito tóxico 14 α -methyl-3,6-diol, assim permitindo o crescimento celular (AKINS, 2005). Martel et al (2010) observaram que cepas de *C. albicans* mutantes ERG 3 (que codifica a enzima Δ 5-6 desaturase) tiveram reduzida suscetibilidade ao fluconazol, voriconazol, itraconazol, cetoconazol e clotrimazol estando assim a inibição desta enzima diretamente ligada a resistência aos azólicos.

O gene ERG11 é codificante da enzima lanosterol-14- α demetilase, o número e a sequência de seus nucleotídeos variam conforme a espécie. Mutações em ERG11 podem resultar em alterações na sequência de seus aminoácidos, mudando, conseqüentemente, a estrutura da ERG11p, diminuindo sua afinidade com os agentes antifúngicos sem impedir sua função, no entanto gerando espécies com fenótipo alterado resistentes aos agentes antifúngicos azólicos (SANGLARD, 1998).

A expressão do gene ERG11 aumenta na presença de fluconazol, devido a um provável mecanismo compensatório da depleção do ergosterol (ALBERTSON, 1996), no

entanto mesmo na ausência de fluconazol algumas cepas resistentes expressam este gene em níveis superiores àqueles encontrados em cepas suscetíveis. O aumento da expressão do gene ERG11 leva a um conseqüente aumento da enzima ERG11p intracelular gerando uma necessidade de maiores quantidades de agente antifúngico para inibir sua atividade (MORSCHHÄUSER, 2002). Experimentos *in vivo* demonstraram que *C. glabrata* acumula precursores anormais de ergosterol diferentes dos acumulados por *C. albicans* (KELLY et al, 1995).

O mecanismo de resistência de *Candida* à anfotericina B parece ser a partir de uma alteração qualitativa ou quantitativa do teor de esteróis das células. Cepas de *C. glabrata* que são resistentes ao tratamento com anfotericina B demonstraram ter um teor mais baixo de esteróis ligantes de anfotericina B e uma substituição destes, por esteróis intermediários com menor afinidade por poliênicos. Mutação no gene ERG 6 que codifica a enzima C-24 esterol metiltransferase, resulta na interrupção da biossíntese de ergosterol em *Candida glabrata* e assim em resistência poliênica (VANDEPUTTE et al, 2007; VANDEPUTTE et al, 2008). Hull et al (2012) relataram dois isolados de *C. glabrata*, resistentes a anfotericina B, com CIM de 8µg/mL, considerados ERG 2 mutantes.

Mutações nos genes que codificam os elementos do complexo GS (1,3-β-D-glucana sintase) têm sido associadas com resistência de *Candida* às equinocandinas (PERLIN, 2011). Em *C. glabrata*, resistência a equinocandinas estão ligadas com mutações no gene FKS2. Mutações nas proteínas FKS alteram a cinética da GS resultando em um aumento de 50% nas concentrações inibitórias mínimas comparadas com cepas selvagens (GARCIA-EFFRON et al, 2009).

2.4 Agentes antifúngicos

O número de fármacos disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas ainda, é reduzido. Devido às semelhanças filogenéticas, fungos e mamíferos possuem algumas vias metabólicas homólogas, como para produção de energia, divisão celular e síntese de proteínas. Este fato faz com que exista maior dificuldade no desenvolvimento de agentes antifúngicos seletivos, havendo a necessidade de descobrir novos alvos fúngicos exclusivos que poderão ser explorados (PAPPAS et al, 2009).

Atualmente, diferentes classes de agentes antifúngicos estão disponíveis no mercado, como as alilaminas (terbinafina e naftifina), derivados poliênicos (anfotericina B e nistatina), antimetabólitos (5-flucitosina), azólicos (cetoconazol, miconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, ravuconazol e posaconazol) e inibidores da síntese de glucana (caspofungina, anidulafungina e micafungina) (JOHNSON et al, 2004; DERESINSKI & STEVENS, 2003).

Poliênicos, azólicos e equinocandinas têm sido os fármacos de primeira escolha no tratamento de infecções fúngicas complicadas causadas por *Candida* sp (PAPPAS et al, 2009).

2.4.1 Poliênicos

Os dois poliênicos disponíveis no mercado são nistatina e anfotericina B, que tem seu mecanismo de ação baseado na desestabilização da membrana plasmática do fungo, porém devido a sua toxicidade a nistatina é usada somente para tratamento tópico (BEM-AMI et al, 2008). A anfotericina B foi desenvolvida em 1956, foi utilizada como principal agente antifúngico até o início da década de 1990 (MAERTENS, 2004). Atua como fungicida, sua atividade antimicótica é, em parte, dependente de sua ligação a uma fração esterol, no caso o ergosterol, presente na membrana dos fungos. Desta maneira, poros são formados aumentando a permeabilidade da membrana, alterando sua integridade, e ocasionando o extravasamento de componentes citoplasmáticos vitais, levando a morte celular (GOODMAN & GILMAN, 2003; CATTALÁN & MONTEJO, 2006). É um antifúngico de amplo espectro, ativo sobre várias micoses como candidíases, aspergilose, coccidiomicose, criptococose, zigomicose e esporotricose. Possui uma ótima atividade frente à *Candida*, embora algumas espécies de *Candida* não-*albicans* possam apresentar CIMs superiores ou mesmo ser resistentes, a exemplo de *C. glabrata* (OLSON et al, 2005).

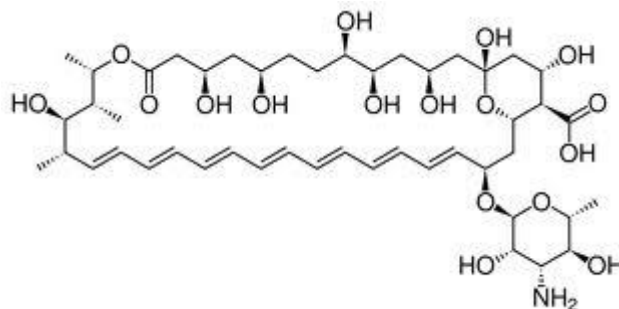


Figura 1: Molécula de anfotericina B

Requer administração intravenosa, intratecal ou inalatória, pois não é absorvido via oral (GUBBINS & ANAISSIE, 2002). Atua em menor grau ligando-se ao colesterol das células humanas, causando assim efeitos adversos. Um dos seus principais efeitos adversos é a nefrotoxicidade, decorrente do efeito da anfotericina B diretamente nas células tubulares renais resultando em necrose tubular aguda, vasoconstrição e redução da filtração glomerular. Mais de 80% dos pacientes que recebem anfotericina B apresentam redução da função renal e alguns permanecem com comprometimento mesmo após o término do tratamento (BRANCH, 1988).

A forma convencional de anfotericina B é utilizada em associação ao desoxicolato de sódio com a finalidade de solubilizá-la em água na forma micelial. Uma única dose diária de 1 mg/kg de peso corporal resulta em concentrações séricas máximas de aproximadamente de 1 a 2 µg/mL na primeira hora (CHRISTIANSEN et al, 1985). A fração circulante se liga a proteínas, colesterol e hemácias tendo seu nível reduzido lentamente, sendo renal a principal via de excreção (GALLIS et al, 1990).

Novas formas de apresentação da anfotericina B foram desenvolvidas pela indústria farmacêutica para tentar amenizar sua toxicidade: anfotericina B complexo lipídico (ABCL), anfotericina B em dispersão coloidal (ABCD) e a forma lipossomal (L-AmB). Estas formulações mantêm o mesmo espectro de ação da anfotericina B na forma de desoxicolato, sendo que as formas lipídicas aparentam ser mais potentes e menos nefrotóxicas (REX et al, 2001; DUPONT, 2002).

2.4.2 Azólicos

Os azólicos são antifúngicos caracterizados por apresentarem um anel pentagonal na sua estrutura molecular, unido por uma ligação carbono-nitrogênio com outros anéis aromáticos. Estes agentes antifúngicos são classificados em imidazólicos quando o anel pentagonal possui três átomos de carbono e dois de nitrogênio (miconazol e cetoconazol) e triazólicos quando o anel possui dois átomos de carbono e três de nitrogênio (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol) (CATALÁN & MOONTEJO, 2006).

Seu mecanismo de ação se faz também através da alteração da permeabilidade da membrana, todavia essa alteração decorre da inibição da síntese do ergosterol, pois os azólicos se ligam às enzimas do complexo citocromo P450 do fungo e inibem a desmetilação do lanosterol, um precursor do ergosterol. Os triazólicos representam um novo grupo de

azólicos com grande eficiência e baixa toxicidade. Possuem alta afinidade pelo citocromo P450 fúngico e baixa afinidade pelo citocromo P450 dos mamíferos (SPINOSA, 2002).

O espectro de ação dos azólicos incluem agentes de paracoccidiodomicose, coccidiodomicose, histoplasmose, criptococose e dermatomicoses (SPINOSA, 2002). A maioria das espécies de *Candida* é sensível aos azólicos, no entanto *C. glabrata* e *C. krusei* são menos sensíveis, e há relatos de resistência principalmente ao fluconazol em muitas espécies de *Candida* (PAPPAS, 2011; SOBEL, 2008).

Todos os azólicos tem um tempo de meia-vida relativamente longo, possibilitando fazer a terapia em uma única dose ou duas doses diárias. Os principais efeitos colaterais que os azólicos apresentam são hepatotoxicidade, intolerância gastrointestinal e hipersensibilidade. Cetoconazol pode causar ginecomastia e irregularidades menstruais (TAVARES, 2001)

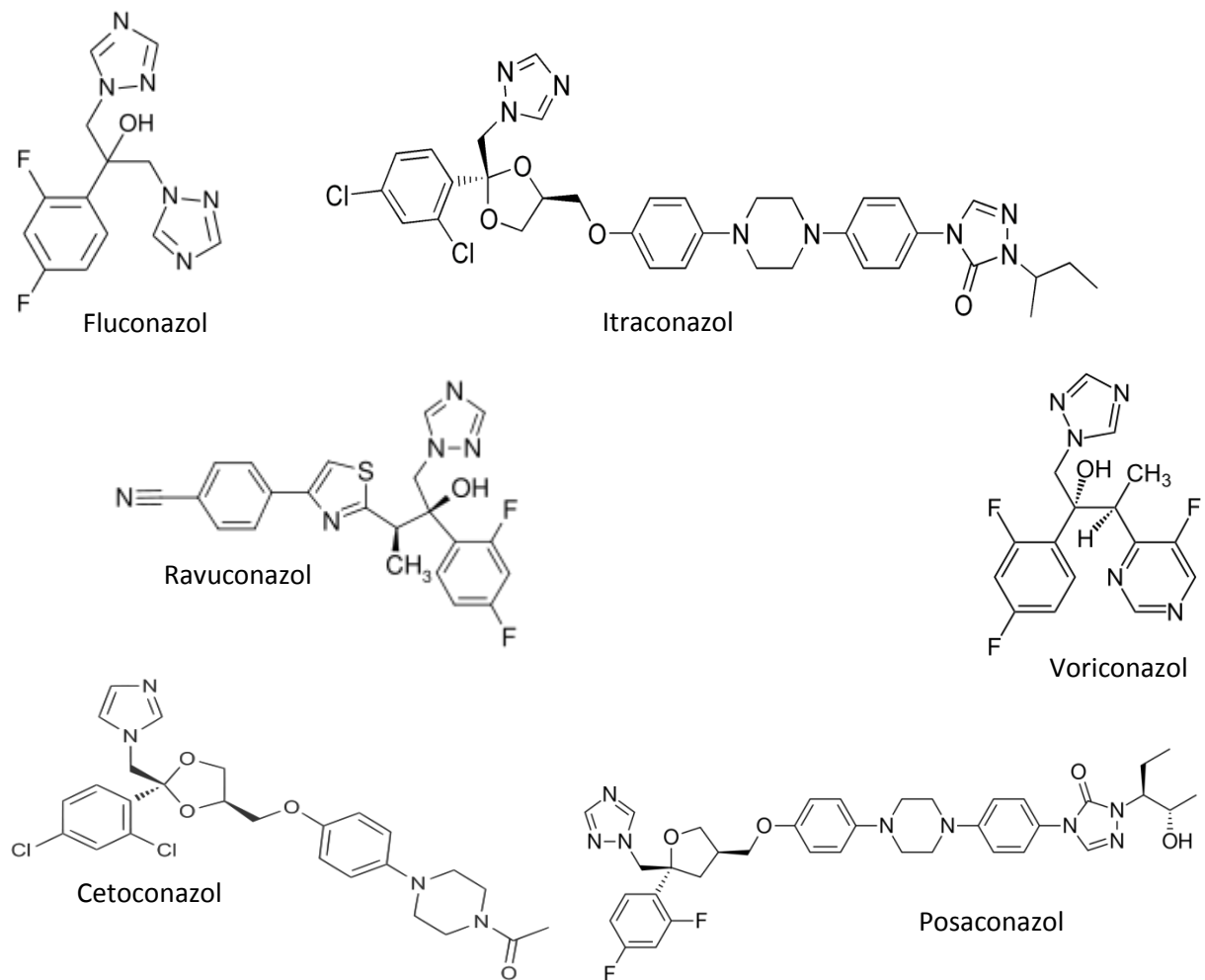


Figura 2: Agentes antifúngicos azólicos

O fluconazol aprovado no final dos anos 80 cobriu muitas deficiências dos imidazólicos, por ser altamente solúvel em água, não ser alterado por mudanças na acidez gástrica, possuir menor risco de hepatotoxicidade e podendo ser administrado tanto por via oral, quanto intravenosa. Possui uma excelente biodisponibilidade, apresenta boa penetração cérebro-espinhal e alcança níveis de quase 80% no sangue. Uma vez que o fluconazol se tornou o antifúngico mais utilizado, seu uso foi desafiado pelo envolvimento de um maior espectro de patógenos nas infecções fúngicas e pela emergência da resistência aos azólicos. Embora *C. albicans* seja a levedura mais comumente isolada, e geralmente sensível ao fluconazol, este antifúngico apresenta restrições no tratamento de infecções causadas por *C. krusei* e *C. glabrata* (HAJJEH et al, 2004; COLOMBO et al, 2007).

O cetoconazol apresenta menor biodisponibilidade, pois assim como, o itraconazol, depende de um pH gástrico menor que 3,0 para sua solubilização e absorção. Não alcança níveis efetivos na urina e no líquido cefalorraquidiano. Tem boa penetração na pele, líquido sinovial e pulmões. É metabolizado pelo fígado e sua excreção é por via biliar (TAVARES, 2001). É usado no tratamento de dermatomicoses, paracoccidioidomicose, histoplasmose, tem eficiência em candidíase mucocutânea crônica e pode ser utilizado na terapêutica inicial de candidíase oral em pacientes com AIDS (LOPES, 2006).

O itraconazol é uma molécula lipossolúvel, com afinidade por órgãos que contém tecido adiposo como pele e anexos epidérmicos. O itraconazol gradualmente substituiu o cetoconazol como tratamento de escolha para casos não-invasivos de histoplasmose, blastomicose e paracoccidioidomicose. O itraconazol possui consideráveis vantagens sobre o fluconazol no tratamento de aspergilose e esporotricose, entretanto, o fluconazol demonstra um perfil farmacológico e toxicológico mais favorável. Diferente do fluconazol, o itraconazol é altamente lipídico e quando foi lançado pela primeira vez, foi formulado apenas em cápsulas. Por causa da errática absorção e baixas concentrações sanguíneas estarem associadas a falhas terapêuticas, foi desenvolvida uma formulação oral contendo hidroxipropil- β -ciclodextrina como solubilizante, cuja biodisponibilidade é significativamente maior do que a apresentada pelas cápsulas (TERRELL, 1999). Itraconazol é moderadamente ativo frente a espécies de *Candida* fluconazol sensíveis e resistentes (PFALLER et al, 2005).

O voriconazol, lançado em 2002, é estruturalmente relacionado ao fluconazol, possui boa disponibilidade oral e parenteral, e diferente do itraconazol sua absorção não é afetada pelo pH gástrico (JEU, 2003). O voriconazol representa um avanço na terapia antifúngica,

pois, possui espectro mais amplo que o fluconazol e uma potente ação fungicida contra fungos filamentosos como *Aspergillus* e *Fusarium*. Contra leveduras sua ação é fungistática (QUINDÓS et al, 2007). Voriconazol é mais ativo que o fluconazol frente às espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans* e *C. glabrata* fluconazol-resistente, exceto para *C. tropicalis* (PFALLER & DIEKEMA, 2007). Há relatos de isolados de *Candida* que foram refratários ao voriconazol (QUINDÓS et al, 2007).

Voriconazol apresenta boa biodisponibilidade oral. Alcança níveis efetivos no líquido cefalorraquidiano e no encéfalo. É metabolizado e excretado pelo fígado, e possui efeitos adversos comuns aos antifúngicos azólicos (JOHNSON et al, 2003). Em um estudo randomizado feito em pacientes com aspergilose pulmonar invasiva, voriconazol se mostrou superior sobre anfotericina B, em relação à resposta ao tratamento e a sobrevida dos pacientes (HERBRECHT et al, 2002). Em candidemias de pacientes não-neutropênicos sua eficácia foi semelhante à anfotericina B (KULLBERG et al, 2005).

2.4.3 Equinocandinas

A mais recente classe de agentes antifúngicos é representada pelas equinocandinas, que são constituídas de lipopeptídeos derivados de produtos naturais de fermentação fúngica. A caspofungina, anidulafungina e a micafungina são os agentes representantes desta classe. As equinocandinas atuam inibindo a β -(1,3) glucana-sintetase, enzima responsável pela síntese de β -(1,3) glucana, componente da parede celular fúngica (GUBBINS & ANAÏSSIE, 2002). Devido a esse distinto modo de ação, as equinocandinas evidenciam toxicidade seletiva frente a células fúngicas devido à ausência da molécula de glucana nas células dos mamíferos (ARIKAN et al, 2005).

A caspofungina foi aprovada para o tratamento de candidemia, candidíase mucocutânea e aspergilose invasiva (PFALLER et al, 2003). Provou ser altamente ativa frente a biofilmes de *C. albicans*, e uma de suas mais significantes vantagens é a maior atividade frente a isolados de *Candida* resistentes a azólicos (PFALLER et al, 2003).

A anidulafungina foi introduzida no Brasil para o tratamento de candidíase invasiva em pacientes não-neutropênicos. Anidulafungina tem boa atividade antifúngica *in vitro* frente a muitas espécies de *Candida* incluindo *C. glabrata* e *C. krusei* (PFALLER, 2008).

A micafungina foi aprovada para uso no Brasil em 2010, com indicação para candidíase invasiva, aspergilose e profilaxia em pacientes submetidos a transplante de células-tronco (BOORMANN & MORRISON, 2009).

2.5 Agentes não-antifúngicos e associações

A resistência fúngica aos antifúngicos convencionais, especialmente de *C. glabrata* aos azólicos, sugere a busca de novas estratégias terapêuticas tais como a associação entre antifúngicos e fármacos de diferentes classes. Poucos são os estudos que avaliaram combinações entre fármacos antifúngicos e não-antifúngicos frente a *C. glabrata*, o que justifica este estudo.

Alguns estudos já avaliaram a atividade de agentes não-antifúngicos, assim como a associação destes à antifúngicos frente a *Candida* sp. A associação de fluvastatina ao fluconazol é sinérgica frente a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, e *C. glabrata* (CHIN et al, 1997). A associação de doxicilina associada ao fluconazol é sinérgica frente a *C. albicans* (FIORI et al, 2012). Anfotericina associada à ciprofloxacino e levofloxacino é sinérgica para *C. albicans* (STERGIOPOULOU et al, 2009). A associação de amiodarona e fluconazol apresenta sinergismo frente a *C. albicans* (GUO et al, 2008). Tetraciclina melhora o perfil de suscetibilidade de *C. albicans* frente aos antifúngicos (OLIVER et al, 2008).

Entre os fármacos não antifúngicos avaliados sabe-se que clorpromazina apresenta atividade frente à *Candida* (WOOD et al, 1985; EILAM et al, 1987), *Aspergillus* sp, *Scedosporium* e zigomicetos (VITALE et al, 2007). Tacrolimus associado a antifúngicos azólicos demonstrou interações sinérgicas frente à *C. albicans* (SUN et al, 2008), assim como a interação de tacrolimus e terbinafina foi sinérgica frente à *C. albicans* (OLIVER et al, 2008). Sulfametoxazol associado ao trimetoprim é usado no tratamento de paracoccidiodomicose, e estudos associando sulfametoxazol ao cetoconazol (SHIKANIA – YASUDA et al, 2002) e ao miconazol observaram interações sinérgicas frente a *C. albicans* (ZARRIN et al, 2009). A associação de minociclina ao fluconazol é sinérgica frente a cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol (SHI et al, 2010). A atividade de linezolidina não foi testada frente à *Candida* sp até o momento.

O disseleneto de difenila (PhSe_2) é um composto organofosforado de selênio ainda não utilizado na clínica, porém estudos realizados *in vitro* e *in vivo* demonstram a satisfatória atividade biológica deste composto. Entre suas principais propriedades farmacológicas, destacam-se as atividades antioxidante (PRIGOL et al, 2009; STANGHERLIN et al, 2009), antinociceptiva, anti-inflamatória (NOGUEIRA et al, 2003; ZASSO et al, 2005; SAVEGNAGO et al, 2007; SAVEGNAGO et al, 2008), antiúlcera (GHISLENI et al, 2008) e hepatoprotetora (NOGUEIRA et al, 2009). Além disso, estudos em modelos animais demonstram que em doses com efeitos biológicos conhecidos o disseleneto de difenila não apresenta efeitos tóxicos (COX et al, 1998). Sua atividade microbiológica já foi evidenciada frente a espécies de *Candida* e fungos filamentosos (LORETO et al, 2011; ROSSETI et al, 2011).

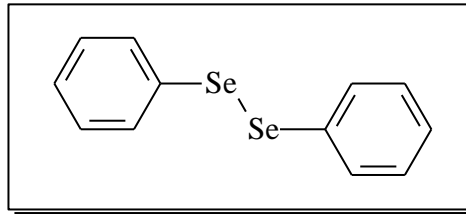


Figura 3 - Estrutura química do disseleneto de difenila

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar combinações entre agentes antifúngicos e não-antifúngicos para definir interações sinérgicas, indiferentes ou antagônicas, *in vitro*, frente a isolados clínicos de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Avaliar com base nas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) a suscetibilidade de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol frente aos agentes anfotericina B, fluconazol, cetoconazol, itraconazol, voriconazol, tacrolimus, clorpromazina, linezolida, minociclina e sulfametoxazol.

3.2.2 Avaliar com base nas CIMs a suscetibilidade de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol frente à disseleneto de difenila.

3.2.3 Investigar interações entre anfotericina B e agentes não-antifúngicos: clorpromazina, linezolida, minociclina e sulfametoxazol para definir interações sinérgicas, indiferentes ou antagônicas frente a isolados clínicos de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol através do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF).

3.2.4 Investigar interações entre cetoconazol e agentes não-antifúngicos: tacrolimus, clorpromazina, linezolida, minociclina e sulfametoxazol para definir interações sinérgicas, indiferentes ou antagônicas frente a isolados clínicos de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol através do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF).

3.2.5 Investigar interações entre itraconazol e agentes não-antifúngicos: tacrolimus, clorpromazina, linezolida, minociclina e sulfametoxazol para definir interações sinérgicas, indiferentes ou antagônicas frente a isolados clínicos de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol através do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF).

3.2.6 Investigar interações entre voriconazol e agentes não-antifúngicos: tacrolimus, clorpromazina, linezolida, minociclina e sulfametoxazol para definir interações sinérgicas, indiferentes ou antagônicas frente a isolados clínicos de *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol através do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF).

3.2.7 Investigar interações entre fluconazol e disseleneto de difenila para definir interações sinérgicas, indiferentes ou antagônicas frente a isolados clínicos de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol através do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF).

3.2.8 Investigar interações entre anfotericina B e disseleneto de difenila para definir interações sinérgicas, indiferentes ou antagônicas frente a isolados clínicos de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol através do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF).

ARTIGO I

SYNERGISTIC EFFECTS OF TACROLIMUS AND AZOLES ANTIFUNGAL IN *Candida glabrata* ISOLATES

Laura Bedin Denardi^{1*}, Débora Alves Nunes Mario¹, Érico Silva Loreto², Janio Morais
Santurio², Sydney Hartz Alves¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

ABSTRACT

Here, we evaluated the effects of ketoconazole, itraconazole and voriconazole combined with the immunosuppressant tacrolimus against thirty clinical isolates of both fluconazole-susceptible and -resistant *Candida glabrata* using a checkerboard assay. Synergistic, additive or indifferent interactions were found for combinations of the antifungal agents and tacrolimus. A larger synergistic effect was observed for the combinations of tacrolimus with itraconazole and voriconazole (43%), followed by that of the combination with ketoconazole (37%), against fluconazole-susceptible isolates. For fluconazole-resistant *C. glabrata*, a higher synergistic effect was obtained from tacrolimus combined with ketoconazole (77%) than from the combinations with itraconazole (73%) and voriconazole (63%). The synergisms that we observed *in vitro*, notably against fluconazole-resistant *C. glabrata* isolates, are promising and warrant further analysis of their applications in experimental *in vivo* studies.

KEYWORDS: *Candida glabrata*, azole resistance, tacrolimus, combination therapy

1. INTRODUCTION

In the last few decades, invasive fungal infections that are caused by *Candida* species have risen in parallel with the number of immunocompromised patients, such as those with AIDS, transplant recipients and cancer therapy patients (5). *C. glabrata* is currently the second most common cause of candidemia in the United States (15), and is emerging as a more important human pathogen (4), the increased number of *C. glabrata* systemic infections is very concerning due to the high mortality rate. *C. glabrata* fungemia is frequently difficult to treat due to its intrinsic or rapidly acquired resistance to azole antifungals (15), which has emerged in clinical isolates from immunocompromised patients (14).

The treatment for *Candida* infections that show resistance to fluconazole has been the use of other classes of antifungal agents, such as amphotericin B (14) and echinocandins (10). Although these treatments have been effective for *Candida albicans*, treatment of non-*albicans Candida*, especially *C. glabrata*, has been difficult (14). Combination therapy is an alternative that can be used to improve the efficacy of antimicrobial therapy for difficult-to-treat infections, either by combining different antifungals or combining antifungal and non-antifungal agents, which can decrease antimicrobial resistance (12).

Tacrolimus (FK506) is a calcineurin inhibitor that prevents T-cell proliferation and suppresses the immune responses that are involved in transplant rejection (6). Recent studies have shown that calcineurin inhibitors, such as cyclosporin A and tacrolimus have synergistic interactions when combined with azole antifungal agents, resulting in fungicidal activity (17). However, these antifungal activities against azole-resistant isolates have not been evaluated.

In this context, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* activity of tacrolimus alone and in combination with ketoconazole, itraconazole and voriconazole against both

fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *C. glabrata* isolates using the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (7) standardised broth microdilution method.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Microorganisms

We studied two groups of *Candida glabrata* isolates. The first included thirty fluconazole-susceptible (FS) clinical isolates that were recovered from AIDS patients. The second group included fluconazole-resistant isolates obtained via induction of resistance, as previously described by Fekete-Foragacs *et al.* (9). All of the yeasts were identified using the commercial kit ID 32C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

2.2. Chemicals

Ketoconazole (KTZ), itraconazole (ITZ) and tacrolimus (Janssen-Cilag Pharmaceutica, Belgium), voriconazole (VRC) (Pfizer, Inc., New York, NY) and fluconazole (FLZ) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) were obtained as standard powders. A stock solution for FLZ was prepared by dissolving the powder in distilled water, and stock solutions for the other tested drugs were prepared by dissolving ITZ, KTZ and VRC in dimethyl sulphoxide and tacrolimus in methanol.

2.3. *In vitro* susceptibility and drug interaction tests

Susceptibility tests were performed according to the CLSI protocol M27-A3 microdilution technique (7), and the highest concentrations used were 64 µg/mL for tacrolimus and 32 µg/mL for the azoles. The interaction between tacrolimus and the azoles against thirty strains each of fluconazole-susceptible and -resistant *C. glabrata* was evaluated

using the microdilution checkerboard method. Drug dilutions were prepared in order to obtain four times the final concentrations, and 50 μL of each concentration of azoles was added to columns 1 to 10 and 50 μL of each concentration of tacrolimus was added to rows A to G. The concentrations of tacrolimus ranged from 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the concentrations of the azole antifungals ranged from 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The fractional inhibitory concentration (FIC) was calculated for each agent by dividing the minimal inhibitory concentration (MIC) of each drug in combination by the MIC of the drug alone. The FIC values were then totalled to determine the fractional inhibitory concentration index (FICI) that resulted from the drug combinations. Synergism was defined as an $\text{FICI} \leq 0.5$, indifference was defined as $1.0 < \text{FICI} \leq 4$, and antagonism was defined as $\text{FICI} > 4$ (11).

3. RESULTS

Based on the parameters of susceptibility (MIC range, MIC_{50} , MIC_{90} and geometric mean), as shown in Table 1, fluconazole-susceptible (FS) strains showed lower MICs to ketoconazole (0.125-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), itraconazole (0.5-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and voriconazole (0.125-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), compared to fluconazole-resistant (FR) strains, which showed MIC ranges of 0.5-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for ketoconazole, 1-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for itraconazole and 1-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for voriconazole.

Because *C. glabrata* fluconazole-resistant (FR) strains showed an increase in the MIC for all antifungal agents, cross-resistance appears to occur between fluconazole and the other azoles. Tacrolimus did not show activity against FS and FR strains at the highest concentration tested. Table 2 shows the percentages of synergism, additivity and indifference that resulted from the combinations of tacrolimus with ketoconazole, itraconazole and voriconazole against the FS and FR strains.

The results showed that the percentages for the synergistic interactions against the FR strains were similar for the three azoles. Tacrolimus combined with ketoconazole the most synergistic interaction against the FR strains (77%), followed by the combinations with itraconazole (73%) and voriconazole (63%). In contrast, the FS group showed lower synergism percentages for both voriconazole and itraconazole combined with tacrolimus (43%) as well as for the combination with ketoconazole (37%). The percentages of indifference were also similar for the three combinations (approximately 60% with FS and 30% with FR strains). Antagonism effects were not detected.

4. DISCUSSION

Invasive fungal infections are a significant complication in transplant patients, and 62% to 91% of these infections are caused by *Candida* species. In liver transplants, the manipulation of the gastrointestinal tract can translocate this microorganism through the intestinal epithelium, resulting in the development of invasive candidiasis (16).

Tacrolimus is one of the most common and efficient immunosuppressants used to prevent transplant rejection (14). This compound inhibits calcineurin, a phosphatase protein involved in lymphocyte activation that is responsible for the synthesis of cytokines, such as interleukin-2, and is primarily involved in NFAT (nuclear factor of activated T-cells) regulation. Calcineurin is activated by an increase in cytoplasmic Ca^{2+} , and its inhibition by immunosuppressants blocks the activation of T lymphocytes, which is critical for an immune response (3).

Calcineurin governing fungal physiology, including the regulation of cell cycle progression, cation homeostasis, cell wall biosynthesis, antifungal drug resistance and virulence (6). Immunosuppressants inhibit calcineurin function in several fungal species,

including *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*, affecting essential functions in cell fungal (2).

Azole antifungals stimulate calcium influx and this activates the calcium signalling pathway, which is essential for yeast survival (2). In *C. albicans*, calcineurin inhibition results in greater susceptibility to azole antifungal agents (18), due to the high level of stress that is caused by influx of cations such as Ca^{2+} and Na^{2+} in the fungal cell (6). Here, we showed that the combination of tacrolimus with azoles can show synergism against fluconazole-susceptible and -resistant *C. glabrata* strains.

Onyewu *et al.* (2003) (14) demonstrated a synergistic effect with the combination of terbinafine and tacrolimus against *C. glabrata*, and Sun *et al.* (2008) (18) showed that the activity of azole antifungal agents against *C. albicans* can be enhanced by tacrolimus. Cruz *et al.* (2002) (8) proposed that the immunosuppressant tacrolimus and cyclosporin analogues can be effective in combination with azoles for the treatment of invasive infections that are caused by *Candida spp*, which is in agreement with the present study showing that calcineurin inhibition can function as an adjuvant for treating invasive *C. glabrata* infections.

Novel antifungal agents, such as posaconazole, have also been ineffective in the treatment of candidemia that is caused by *C. glabrata*, and susceptibility tests have confirmed drug resistance to posaconazole in these isolates (1). In addition, among echinocandins, decreased *in vitro* susceptibility to micafungin was observed in *C. glabrata* strains with single FKS or FKS2 mutations, or both (13).

In conclusion, we demonstrated that the rates of synergism were higher among fluconazole-resistant isolates than those observed with fluconazole-sensitive *C. glabrata* isolates. Our results confirm that combinations of tacrolimus and azole antifungal agents may be promising and warrant further studies *in vivo* using an experimental *C. glabrata* infection.

5. ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Brazilian agencies CAPES for their support. Érico Silva Loreto is the recipient of a PNPd-CAPES fellowship. We have no conflicts of interest.

6. REFERENCES

- [1] Auberger, J.; Lass-Flörl, C.; Aigner, M.; Clausen, J.; Gastl, G.; Nachbaur, D. (2012). Invasive fungal breakthrough infections, fungal colonization and emergence of resistant strains in high-risk patients receiving antifungal prophylaxis with posaconazole: real-life data from a single-centre institutional retrospective observational study. *J. Antimicrob. Chemother.* 67 (9), 2268-2273.
- [2] Bader, T.; Bodendorfer, B.; Schroppe, K.; Morschhauser, J. (2003). Calcineurin is essential for virulence in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 71 (9), 5344-5354.
- [3] Baksh, S.; Burakoff, S.J. (2000). The role of calcineurin in lymphocyte activation. *Semin. Immunol.* 12 (4), 405-415.
- [4] Bard, M.; Sturm, M.A.; Pierson, C.A.; Brown, S.; Rogers, K.M.; Nabinger, S.; Eckstein, J.; Barbuch, R.; Lees, N.D.; Howell, A.S.; Hazen, K.C. (2005). Sterol uptake in *Candida glabrata*: Rescue of sterol auxotrophic strains. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 52 (4), 175-180.
- [5] Bastert, J.; Schaller, M.; Korting, H.C.; Evans, E.G.V. (2001). Current and future approaches to antimycotic treatment in the era of resistant fungi and immunocompromised hosts. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 17 (2), 81-91.
- [6] Blankenship, J.R.; Heitman, J. (2005). Calcineurin is required for *Candida albicans* to survive calcium stress in serum. *Infect. Immun.* 73 (9), 5767-5774.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. M27-A3. Wayne, P.A.; CLSI, 2008.

[8] Cruz, M.C.; Goldstein, A.L.; Blankenship, J.R.; Del Poeta, M.; Davis, D.; Cardenas, M.E.; Perfect, J.R.; McCusker, J.H.; Heitman, J. (2002). Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. *EMBO J.* 21 (4), 546-559.

[9] Fekéte-Forgacs, K.; Gyure, L.; Lenkey, B. (2000). Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses.* 43 (7-8), 273-279.

[10] Harris, M.R.; Coote, P.J. (2010). Combination of caspofungin or anidulafungin with antimicrobial peptides results in potent synergistic killing of *Candida albicans* and *Candida glabrata* *in vitro*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 35 (4), 347-356.

[11] Johnson, M.D.; MacDougall, C.; Ostrosky-Zeichner, L.; Perfect, J.R.; Rex, J.H. (2004). Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48 (3), 693-715.

[12] Mukherjee, P.K.; Sheehan, D.J.; Hitchcock, C.A.; Ghannoum, M.A. (2005). Combination treatment of invasive fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (1), 163-194.

[13] Niimi, K.; Woods, M.A.; Maki, K.; Nakayama, H.; Hatakenaka, K.; Chibana, H.; Ikeda, F.; Ueno, K.; Niimi, M.; Cannon, R.D.; Monk, B.C. (2012). Reconstitution of high-level micafungin resistance detected in a clinical isolate of *Candida glabrata* identifies functional homozygosity in glucan synthase gene expression. *J. Antimicrob. Chemother.* 67 (7), 1666-1676.

[14] Onyewu, C.; Blankenship, J.R.; Del Poeta, M.; Heitman, J. (2003). Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47 (3), 956-964.

[15] Pfaller, M.A.; Diekema, D.J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 20 (1), 133-163.

[16] Singh, N. (2003). Fungal infections in the recipients of solid organ transplantation. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 17 (1), 113-134.

[17] Steinbach, W.J.; Schell, W.A.; Blankenship, J.R.; Onyewu, C.; Heitman, J.; Perfect, J.R. (2004). *In vitro* interactions between antifungals and immunosuppressants against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48 (12), 1664-1669.

[18] Sun, S.; Li, Y.; Guo, Q.J.; Shi, C.W.; Yu, J.L.; Ma, L. (2008). *In vitro* interactions between tacrolimus and Azoles against *Candida albicans* determined by different methods. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 52 (2), 409-417.

7. TABLES

Table 1: Susceptibility ($\mu\text{g/mL}$) of fluconazole-susceptible (FS) and fluconazole-resistant (FR) *Candida glabrata* strains to ketoconazole, itraconazole and voriconazole.

Agents	Group of isolates	Geometric mean	MIC Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Ketoconazole	FS	0.536	0.13-2.00	0.50	1.00
	FR	2.579	0.50-16.00	2.00	8.00
Itraconazole	FS	1.203	0.50-8.00	1.00	4.00
	FR	3.402	1.00-16.00	4.00	8.00
Voriconazole	FS	0.478	0.13-4.00	0.50	1.00
	FR	2.639	1.00-16.00	2.00	8.00

Table 2: Percentages of synergism, indifference and antagonism that resulted from the combinations of tacrolimus with ketoconazole, itraconazole and voriconazole against fluconazole-susceptible (FS) and fluconazole-resistant (FR) *Candida glabrata* strains.

Agents	Group of isolates	Interactions (%)		
		Synergism	Indifference	Antagonism
KTZ + FK506	FS	37	63	-
	FR	77	23	-
ITZ + FK506	FS	43	57	-
	FR	73	27	-
VRC + FK506	FS	43	57	-
	FR	63	37	-

ARTIGO II

**EFFECTS OF ANTIMYCOTICS ALONE AND IN COMBINATION
WITH NON-ANTIFUNGAL AGENTS AGAINST *Candida glabrata*
STRAINS SUSCEPTIBLE OR RESISTANT TO FLUCONAZOLE**

**Laura Bedin Denardi^{1*}, Débora Alves Nunes Mario¹, Érico Silva Loreto², Laíssa Arevalo
Bandeira¹, Janio Morais Santurio², Sydney Hartz Alves¹**

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

ABSTRACT

In the present study, we evaluated the effects of ketoconazole, itraconazole, voriconazole and amphotericin B combined with non-antifungal agents chlorpromazine, linezolid, minocycline and sulfamethoxazole against thirty clinical isolates of both fluconazole-susceptible (FS) and –resistant (FR) *Candida glabrata* using a checkerboard assay. The most synergistic combination observed were linezolid + ketoconazole (76.67%) and linezolid + voriconazole (70%) for FR strains. Minocycline + amphotericin B showed 46.67% and 36.67% of synergism for FS and FR strains, respectively. The combination of chlorpromazine + amphotericin B was synergistic for 40% of FR strains, whereas the combination of chlorpromazine + azoles exhibited the highest percentage of antagonism to FS and FR strains. The other combinations studied showed indifference predominantly.

KEY-WORDS: *Candida glabrata*, azole resistance, combination therapy.

1. INTRODUCTION

Opportunistic fungal infections has been evidenced along the years as the major cause of diseases in humans with some dysfunction in the immune system (Diekema et al, 2004; Nucci et al, 2005). High rates of morbidity and mortality are associated with these infections (Zaoutis et al, 2005; Gudlaugsson et al, 2003). The list of fungal pathogens causing serious infections in immunocompromised patients has increased in recent years, (Fridkin, 2005) however the genus *Candida* remains the most common etiologic agent of opportunistic mycoses worldwide (Colombo et al, 2006; Morgan 2005; Pappas et al, 2003; Tortorano et al, 2004; Tortorano et al, 2006).

C. glabrata is responsible for about 25% of cases of hematogenous infections cases in the United States, ranking second among *Candida* species isolates. In Latin America, this species is isolated in 4% to 7% of the cases (Perlroth & Spellberg 2007; Pfaller & Diekema, 2007). *C. glabrata* is associated with high mortality rates, large number of clinical isolates were resistant to fluconazole and also shows cross-resistance to other azole antifungals, and lower sensitivity to amphotericin B (Pfaller & Diekema, 2007; Warnock, 2007).

Fluconazole resistance of *C. glabrata* and azoles cross-resistance, as well as its lower sensitivity to other classes such as polyene antifungal, represents a challenge for treatment of infections caused by this species (Sanguinetti et al, 2005). Even for echinocandins, emergence of resistance has been detected when it is used for *C. glabrata* infection treatment (Niimi et al, 2012; Garcia-Effrom et al, 2009).

The combination therapy between antifungal drugs or antifungal combined with non-antifungal drugs can be an alternative in the treatment of infections caused by *C. glabrata*, unresponsive to conventional therapy. Although non-antifungal drugs do not show intrinsic

activity against this species they can alter some mechanisms in fungal cells, allowing greater penetration and action of antifungal (Afeltra & Werweij, 2003).

In this context, this study aimed to evaluate the *in vitro* interaction of different antifungal and non-antifungal agents against clinical isolates of *C. glabrata* susceptible and resistant to fluconazole, through broth microdilution standardized by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008), adapted checkerboard technique for drug combination.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Microorganisms

Two groups of *C. glabrata* isolates. The first included thirty fluconazole-susceptible (FS) clinical isolates. The second group included fluconazole-resistant isolates obtained via induction of resistance, as previously described by Fekéte-Foragacs et al, (2000). All the yeasts were identified by conventional mycology methods and through the commercial kit ID 32C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

2.2. Chemicals

Ketoconazole (KTZ), itraconazole (ITZ) (Janssen-Cilag Pharmaceutica, Belgium), voriconazole (VCZ), amphotericin B (AmB) (Pfizer, Inc., New York, NY), fluconazole (FLZ), minocycline hydrochloride (MYN), chlorpromazine hydrochloride (CLO), and sulfamethoxazole (SUL) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) were obtained as standard powders. Linezolid (LIN) (Pfizer, Inc., New York, NY) was obtained in an injectable form. The stock solutions for FLZ, MYN, CLO and AmB were prepared by dissolving the powder in distilled water, and stock solutions for ITZ, KTZ and VCZ were prepared by dissolving in dimethyl sulphoxide; SUL was dissolved in methanol.

2.3. *In vitro* susceptibility and drug interaction tests

Susceptibility tests were performed according to the CLSI protocol M27-A3 microdilution technique (CLSI, 2008), and the highest concentrations studied were 32 µg/mL for the azoles, 2 µg/mL for the amphotericin B, 256 µg/mL for the LIN and SUL and 512 µg/mL for the MYN and CLO. The interaction between antifungal and the non-antifungal agents against thirty strains of both fluconazole-susceptible and -resistant *C. glabrata* were evaluated using the microdilution checkerboard method.

Drug dilutions were prepared in order to obtain four times the final concentrations. In microplates of 96 wells, 50 µL of each concentration of antifungal agents was added to columns 1 to 10 and 50 µL of each concentration of non-antifungal agents was added to rows A to G. The concentration of the azole antifungals ranged from 0.06 µg/mL to 32 µg/mL, and the concentration of AmB ranged from 0.01 µg/mL to 2.00 µg/mL. The concentration of the LIN and SUL ranged from 2.00 µg/mL to 256 µg/mL. The concentration of the MYN and CLO ranged from 4.00 µg/mL to 512 µg/mL. The fractional inhibitory concentration (FIC) was calculated for each agent by dividing the minimal inhibitory concentration (MIC) of each drug in combination by the MIC of the drug alone. The FIC values were then totalled to determine the fractional inhibitory concentration index (FICI) that resulted from the drug combinations. Synergism was defined as an $FICI \leq 0.5$, indifference was defined as $1.0 < FICI \leq 4$, and antagonism was defined as $FICI > 4$ (Johnson et al, 2004).

3. RESULTS

Based on the parameters of susceptibility (MIC range, MIC₅₀, MIC₉₀ and geometric mean), as shown in Table I, amphotericin B was effective against *C. glabrata*, showing low MICs for both FS (0.06 to 0.50 µg/mL) and FR (0.03 to 0.50 µg/mL) groups. Among the

azoles, voriconazole, showed geometric mean 0.48 µg/mL, the most effective, followed by ketoconazole (0.54 µg/mL) and itraconazole (1.20 µg/mL) for FS group. FR group exhibited resistance to ketoconazole with geometric mean 2.58 µg/mL, followed by voriconazole (2.64 µg/mL) and itraconazole (3.40 µg/mL).

The azole antifungal agents showed the more elevated MICs ranges for FR than FS group; the phenomenon of cross-resistance was well evident. The non-antifungal drugs studied (chlorpromazine, minocycline, linezolid, sulfamethoxazole) did not exhibit antifungal activity alone against *C. glabrata* strains, within tested concentrations.

As shown in Table II, the association of linezolid with azole antifungal agents showed high percentage of synergistic interactions, especially for FR group. The association ketoconazole + linezolid demonstrated synergism for 76.67% of FR and 50% of FS group. On the other hand, linezolid + amphotericin B showed high percentages of indifference for the two groups tested.

The association between minocycline and azoles was also characterized by high percentages of indifference, however, when combined with amphotericin B showed synergism against FS (46.67%) and FR (36.67%) group (Table II).

The interactions between sulfamethoxazole and azoles antifungals showed high percentages of indifference for FS and FR group. The percentages of synergism were low and similar among all combinations with azoles. The combination sulfamethoxazole + amphotericin B showed indifference for 86.66% for FS and 80% for FR strains.

The associations of chlorpromazine with, ketoconazole, itraconazole and voriconazole, showed high percentage of antagonism, 76.67%, 70% and 80% respectively for FS strains; for FR strains, these associations resulted in higher percentages of indifference.

The combination of chlorpromazine + azoles was characterized by indifference, however the combination chlorpromazine + amphotericin B showed 40% of synergism against FR group (Table II).

4. DISCUSSION

The combination of drugs with different mechanisms of action can provide an alternative to overcome fungal resistance. Drugs routinely used in the clinic for treatment of various diseases, may potentiate the antifungal activity of conventional agents, reducing the time of response to treatment, enhancing the spectrum of activity, reducing the dose and, thus, the antifungal toxicity. In addition, can decrease the potential of microorganisms acquiring resistance to certain antimicrobials (Johnson et al, 2004).

Minocycline is a semisynthetic antibiotic derived from tetracycline with similar bacterial spectrum and activity. It is efficient against Gram-positive and Gram-negative bacteria and also has low toxicity (Souza et al, 2005). In our study, minocycline alone was inactive against *C. glabrata*. However, the combination amphotericin B + minocycline showed a high percentage of synergism against *C. glabrata*. Oliver et al (2008) found synergistic interactions between amphotericin B and tetracycline against *C. albicans*, which was confirmed in our study against *C. glabrata* when we associate minocycline, a derivative of tetracycline, with amphotericin B. In this same work, the authors demonstrated that, when exposed to tetracycline for 48 hours, *C. albicans* undergoes a reduction in total ergosterol. Furthermore, analysis of growth curves suggested that, the effect of tetracycline is associated with loss of mitochondrial function in the yeast (Chopra & Roberts, 2001). Thus, the best action of amphotericin B combined with minocycline against *C. glabrata* may also be due to a reduction in the content of ergosterol and loss of mitochondrial function *C. glabrata*. The

activity of minocycline was tested alone and in combination with fluconazole, *in vitro*, against *C. albicans* susceptible and resistant to fluconazole by Shi et al (2010). Singly, well as for *C. glabrata*, minocycline showed no activity against *C. albicans*. However, when combined with fluconazole demonstrated synergism for resistant strains and indifference for susceptible strains. This effect was attributed to the greater penetration of fluconazole in biofilms, disrupting calcium ion balance in the fungal cell.

Linezolid is an antibiotic of the oxazolidinone class, produced totally by synthetic via, with excellent activity against Gram-positive cocci. Exert its activity by inhibiting protein synthesis (Diekema & Jones, 2000). In our study, when tested alone against clinical isolates of *Candida glabrata* FS and FR, linezolid was inactive. However, its use associated with azole antifungals, showed high percentages of synergistic interaction. This combination deserves attention as experimental studies because demonstrated an important activity against *C. glabrata* FR. This is the first report of the use of linezolid. The activity of linezolid against *Candida* species has not been studied until this moment. The percentage of synergisms when linezolid was associated with azoles for FS strains must be emphasized, reinforcing the satisfactory interaction of linezolid when used with azole antifungals. The use of linezolid associated with amphotericin B showed no significant synergistic effect, but did not decrease the antifungal action either.

Sulfonamides, such as sulfamethoxazole, have bacteriostatic effect and inhibit the synthesis of para-aminobenzoic acid (PABA). Associated with trimethoprim shows synergistic effect because they act on different steps of the folic acid synthesis. Besides this association being indicated for the treatment of bacterial infections, it was also used successfully in the treatment of paracoccidioidomycosis (Shikanai-Yasuda et al, 2006; Stevens & Vo, 1982). Shikanai-Yasuda et al (2002) reported that the combination of sulfamethoxazole with ketoconazole is synergistic against *C. albicans*. Futhermore, Zarrin et

al (2009) reported synergistic effect in the association of miconazole with sulfamethoxazole against *Candida* species. Although the studies cited above indicate a possible action of sulfamethoxazole against *C. albicans* and *Paracoccidioides* spp, here against *C. glabrata* FS and FR, sulfamethoxazole alone was inactive. The interaction of sulfamethoxazole with azoles and amphotericin B was indifferent against most FS and FR strains, demonstrating that against *C. glabrata*, sulfamethoxazole is not able to potentiate, *in vitro*, the action of azole antifungals and amphotericin B.

Chlorpromazine is an antipsychotic drug belonging to the class of phenothiazines. In addition, the effects on the central nervous system has been shown that phenothiazines act modifying cell membranes, and the metabolism of nucleotides, causing DNA intercalation (Levin & Weiss, 1979; Kantesaria & Marfey, 1975). Some of these effects occur when chlorpromazine binds and inhibits calmodulin, a protein that regulates many cellular processes, essential to the fungi growth (Joseph & Means, 2002). These activities suggest that chlorpromazine has other potential therapeutic besides its activity in the central nervous system.

Some previous studies reported that chlorpromazine has antimicrobial activity against bacteria (Amaral et al, 2000) and fungi, such as *Candida* (Wood et al, 1985; Eilam et al, 1987), *Aspergillus* and zygomycetes (Vitale et al, 2007). In this study the combination chlorpromazine + amphotericin B showed synergism (40%) against to the FR group, which is in agreement with previous observations.

5. CONCLUSION

By prospecting the, *in vitro*, antifungal combination of antifungal and non-antifungal is a pathway for the recognition of synergistic interactions with future potential for therapeutic applications. It has the advantage that the two drugs are already used in clinical.

The synergism observed among azoles + linezolid, amphotericin B + minocycline and amphotericin B + chlorpromazine against *C. glabrata* fluconazole-resistant are promising findings that deserve to be evaluated, through *in vivo*, studies.

6. REFERENCES

- 1 AFELTRA, J.; VERWEIJ, P.E. Antifungal Activity of Nonantifungal Drugs. **J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 22:397-407, 2003.
- 2 AMARAL, L.; KRISTIANSEN, J.E. Phenothiazines: an alternative to conventional therapy for the initial management of suspected multidrug resistant tuberculosis. A call for studies. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 14:173-176, 2000..
- 3 CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 65:232-260, 2001.
- 4 Clinical and Laboratory Standards Institute Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. M27-A3. Wayne, P.A.; **CLSI**, 2008.
- 5 COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D. MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in Eleven Medical Centers. **J. Clin. Microbiol.** 44:2816-2823, 2006.
- 6 DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N. Oxazolidinones; A review. **Drug**, 59:7-16, 2000.
- 7 DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A. Nosocomial candidemia: an ounce of prevention is better than a pound of cure. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, 25:624-626, 2004.
- 8 EILAM, Y.; POLACHEK, I.; BEN-GIGI, G.; CHERNICHOVSKY, D. Activity of phenothiazines against medically important yeasts. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 31:834-836, 1987.
- 9 FEKETE-FORGÁCS, K.; GYURC, L.; LENKEY, B. Chances of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole and resistance in *Candida albicans*. **Mycoses**, 43:273-279, 2000.
- 10 FRIDKIN, S. K. The changing face of fungal infections in health care settings. **Clin. Infect. Dis.**, 41:1455-1460, 2005.

- 11 GARCIA-EFFROM, G.; LEE, S.; PARK, S.; CLEARY, J. D.; PERLIN, D. S. Effect of *Candida glabrata* *FKS1* and *FKS2* mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. **Antimicrob Agents Chemother.**, 53:3690-3699, 2009.
- 12 GUDLAUGSSON, O.; GILLESPIE, S.; LEE, K.; VANDE BERG, J.; HU, J.; MESSER, S.; HERWALDT, L.; PFALLER, M.; DIEKEMA, D.; Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. **Clin. Infect. Dis.**, 37:1172-1177, 2003.
- 13 JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination antifungal therapy. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, 48:693-715, 2004.
- 14 JOSEPH, J. D.; MEANS, A. R. Calcium binding is required for calmodulin function in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryot. Cell**, 1:119-125, 2002.
- 15 KANTESARIA, P.; MARFEY, P. The effect of chlorpromazine on some properties of DNA in solution. **Physiol. Chem. Phys.**, 7:53-67, 1975.
- 16 LEVIN, R. M.; WEISS, B. Selective binding of antipsychotics and other psychoactive agents to the calcium-dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 208:454-459, 1979.
- 17 MORGAN J. Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. **Curr. Infect. Dis. Rep.** 7:429-439, 2005.
- 18 NIIMI, K.; WOODS, M. A.; MAKI, K.; NAKAYAMA, H.; HATAKENAKA, K.; CHIBANA, H.; IKEDA, F.; UENO, K.; NIIMI, M.; CANNON, R. D.; MONK, B. C. Reconstitution of high-level micafungin resistance detected in a clinical isolate of *Candida glabrata* identifies functional homozygosity in glucan synthase gene expression. **J. Antimicrob. Chemother.**, 67:1666-1676, 2012.
- 19 NUCCI, M.; MARR, K. A. Emerging fungal diseases. **Clin. Infect. Dis.**, 41:521-526, 2005.
- 20 OLIVER, B. G.; SILVER, P. M.; MARIE, C.; HOOT, S. J.; LEYDE, S. E.; WHITE, T. C. Tetracycline alters drug susceptibility in *Candida albicans* and other pathogenic fungi. **Microbiol.**, 154:960-970, 2008.

- 21 PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; LEE, J.; HAMILL, R. J.; LARSEN, R. A.; POWDERLY, W.; KAUFFMAN, C. A.; HYSLOP, N.; MANGINO, J. E.; CHAPMAN, S.; HOROWITZ, H. W.; EDWARDS, J. E.; DISMUKES, W. E.; NIAID MYCOSES STUDY GROUP. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clin. Infect. Dis.** 5:634-643, 2003.
- 22 PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology diagnosis, and treatment. **Med. Mycol.**, 45:321-346, 2007.
- 23 PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.** 20:133-63, 2007.
- 24 SANGUINETTI, M. A.; POSTERARO, B.; FIORI, B.; RANNO, S.; TORELLI, R.; FADDA, G. Mechanisms of azoles resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 49:668-679, 2005.
- 25 SHI, W.; CHEN, Z.; CHEN, X.; CAO, L.; LIU, P.; SUN, S. The combination of minocycline and fluconazole causes synergistic growth inhibition against *Candida albicans*: an *in vitro* interaction of antifungal and antibacterial agents. **FEMS Yeast Research**, 10:885-893, 2010.
- 26 SHIKANAI-YASUDA, M. A.; BENARD, G.; HIGAKI, Y.; DEL NEGRO, G. M.; HOO, S.; VACCARI, E. H.; GRYSCHER, R. C.; SEGURADO, A. A, BARONE, A. A.; ANDRADE, D. R. Randomized trial with itraconazole, ketoconazole and sulfadiazine in paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, 40:411-417, 2002.
- 27 SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO F. Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. R.; MORETTI, M. A. Consenso de paracoccidioidomicose. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 39:297-310, 2006.
- 28 SOUSA, J. C. Manual de Antibióticos Antibacterianos. p. 423-482, 2005.
- 29 STEVENS, D.A.; VO, P. T. Synergistic interaction of trimethoprim and sulfamethoxazole on *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 21:852-854, 1982.

- 30 TORTORANO, A. M., PEMAN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; KIBBLER, C. C.; FAURE, O.; BIRAGHI, E.; CANTON, E.; ZIMMERMANN, K.; SEATON, S.; GRILLOT, R. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 23:317-322, 2004.
- 31 TORTORANO, A. M.; KIBBLER, C.; PERNANC, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; GRILLOT, R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 27:359-366, 2006.
- 32 VITALE, R. G.; AFELTRA, J.; MEIS J. F.G. M.; VERWEIJ, P. Activity and post antifungal effect of chlorpromazine and trifluoperazine against *Aspergillus*, *Scedosporium* and zygomycetes. **Mycoses**, 50:270-276, 2007.
- 33 WARNOCK, D. W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, 48:1-12, 2007
- 34 WOOD, N. C.; NUGENT, K. M. Inhibitory effects of chlorpromazine on *Candida* species. **Antimicrob. Agents Chemother.** 27:692-694, 1985.
- 35 ZARRIN, M.; JAMSHIDIAN, M.; JAFARI, M. *In vitro* interactions of miconazole with sulfamethoxazole against *Candida* species. **Pak. J. Med. Sci.**, 25:243-246, 2009.
- 36 ZAOUTIS, T. E.; ARGON, J.; CHU, J.; BERLIN, J. A.; WALSH, T. J.; FEUDTNER, C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. **Clin. Infect. Dis.**, 41:1232-1239, 2005.

7. TABLES

Table 1: Susceptibility ($\mu\text{g/mL}$) of fluconazole-susceptible (FS) and fluconazole-resistant (FR) *Candida glabrata* strains to ketoconazole, itraconazole, voriconazole and amphotericin B.

Agents	Group of isolates	Geometric mean	MIC range	MIC₅₀	MIC₉₀
Ketoconazole	FS	0.54	0.13-2.00	0.50	1.00
	FR	2.58	0.50-16.00	2.00	8.00
Itraconazole	FS	1.20	0.50-8.00	1.00	4.00
	FR	3.40	1.00-16.00	4.00	8.00
Voriconazole	FS	0.48	0.13-4.00	0.50	1.00
	FR	2.64	1.00-16.00	2.00	8.00
Amphotericin B	FS	0.22	0.06-0.50	0.25	0.25
	FR	0.19	0.03-0.50	0.13	0.25

Table 2: Percentages of synergism, indifference and antagonism resulting from combinations of ketoconazole (KTZ), itraconazole (ITZ), voriconazole (VRC) and amphotericin B (AmB) with linezolid (LIN), minocycline (MIN), sulfamethoxazole (SUL) and chlorpromazine (CLO) against fluconazole-susceptible (FS) and fluconazole-resistant (FR) *Candida glabrata* strains.

Agents	Group of isolates	Interactions (%)		
		Synergism	Indifference	Antagonism
KTZ + LIN	FS	50.00	43.33	6.67
	FR	76.67	23.33	0.00
ITZ + LIN	FS	30.00	63.34	6.67
	FR	53.33	43.33	3.33
VRC + LIN	FS	40.00	46.67	13.33
	FR	70.00	30.00	0.00
AmB + LIN	FS	13.33	80.00	6.67
	FR	10.00	86.66	3.33
KTZ + MIN	FS	10.00	63.34	26.67
	FR	16.67	83.34	0.00
ITZ + MIN	FS	13.33	56.66	30.00
	FR	10.00	53.33	36.67
VRC + MIN	FS	6.67	43.34	50.00
	FR	16.67	73.33	10.00
AmB + MIN	FS	46.67	53.33	0.00
	FR	36.67	60.00	3.33
KTZ + SUL	FS	26.67	70.00	3.33
	FR	20.00	73.34	6.67
ITZ + SUL	FS	23.33	60.00	16.67
	FR	23.33	43.34	30.00
VRC + SUL	FS	20.00	56.67	23.33
	FR	26.67	66.67	6.67
AmB + SUL	FS	3.33	86.66	10.00
	FR	3.33	80.00	16.67
KTZ + CLO	FS	3.33	20.00	76.67
	FR	13.33	63.33	23.33
ITZ + CLO	FS	0.00	30.00	70.00
	FR	20.00	63.33	16.67
VRC + CLO	FS	0.00	20.00	80.00
	FR	16.67	56.67	26.57
AmB + CLO	FS	13.33	86.67	0.00
	FR	40.00	60.00	0.00

ARTIGO III

**ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF DIPHENYL DISELENIDE ALONE
AND IN COMBINATION WITH FLUCONAZOLE OR
AMPHOTERICIN B AGAINST *CANDIDA GLABRATA***

**Laura Bedin Denardi^{1*}, Débora Alves Nunes Mario¹, Érico Silva Loreto², Cristina
Wayne Nogueira³, Janio Morais Santurio², Sydney Hartz Alves¹**

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

³Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de
Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

(Artigo online na revista Mycophatologia: DOI 10.1007/s11046-013-9672-x)

Abstract

Here, we evaluated combinations of diphenyl diselenide [(PhSe)₂] with fluconazole and amphotericin B in a checkerboard assay against clinical *Candida glabrata* strains. Minimal inhibitory concentration (geometric mean) ranged from 0.25 to > 64 (5.16 µg/mL) for (PhSe)₂, 1 to 32 (5.04 µg/mL) for fluconazole and 0.06 to 0.5 (0.18 µg/mL) for amphotericin B. Synergistic (76.66%) and indifferent (23.34%) interactions were observed for (PhSe)₂+Amphotericin B combination. (PhSe)₂+fluconazole combination demonstrated indifferent (50%) and antagonistic (40%) interactions, whereas synergistic interactions were observed in 10% of the isolates. New experimental *in vivo* protocols are necessary and will promote a better understanding of the antimicrobial activity of (PhSe)₂ against *C. glabrata* and its use as an adjuvant therapy with antifungal agents.

Keywords: antifungal drug combination, *Candida glabrata*, diphenyl diselenide.

1. Introduction

The incidence of infections caused by *Candida* species has increased dramatically since the 1980s, mainly due to the AIDS epidemic, immunosuppressive therapy and other immunosuppressed conditions, an increasingly aged population, and an increased complexity of surgical procedures [1, 2]. Although *Candida albicans* is the most prevalent cause of antifungal infections, the prevalence of and widespread infections caused by non-*C. albicans* species have changed significantly during recent decades, with some epidemiological data showing that nearly half of the candidiasis cases are caused by other *Candida* species [3-7]. *Candida glabrata* has emerged as the second or third most common cause of candidiasis and is less susceptible to azole antifungals, such as fluconazole (FLU), as well as to amphotericin B (AmB). Furthermore, *C. glabrata* fungaemia has been associated with high mortality, especially in severely immunocompromised patients [8-13]

As an alternative treatment to control antimicrobial resistance, natural or synthetic compounds (chemosensitisers) can make the pathogen more vulnerable and contribute to the efficacy of antifungal drugs [14, 15]. Diphenyl diselenide [(PhSe)₂] is an organoselenium compound (OS) with pharmacological effects reported *in vitro* and in animal models, among which we highlight its antioxidant, antinociceptive, anti-inflammatory, antiulcer and hepatoprotective activities [16-18]. Interestingly, (PhSe)₂ has *in vitro* fungistatic and fungicidal activities against yeasts, filamentous fungi and the oomycete *Pythium insidiosum* [19-22] .

In this context, this study aimed to evaluate the *in vitro* susceptibility of *C. glabrata* isolates to (PhSe)₂ alone and in combination with FLU or AmB, using the CLSI M27-A3 broth microdilution technique.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Fluconazole and Amphoterin B (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) were purchased commercially. Diphenyl diselenide was synthesised according to Paulmier [23]. Analysis of the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. Proton nuclear magnetic resonance spectra (^1H NMR) were obtained at 200 MHz using a DPX-200 NMR spectrometer or at 400 MHz using a DPX-400 NMR spectrometer (Bruker, Bremen, Germany).

2.2. Microorganisms

Thirty *Candida glabrata* clinical isolates recovered from advanced HIV-positive patients affected by fluconazole-refractory oropharyngeal candidiasis or recovered from immunocompromised patients with disseminated fungal infections were evaluated. All yeasts were identified by the ID 32C (bioMerieux) commercial kit.

2.3. *In vitro* susceptibility and drug interactions test

Susceptibility tests were performed according to the CLSI M27-A3 microdilution technique [24]. Drug interactions were evaluated by the broth microdilution checkerboard method, and the lowest fractional inhibitory concentration (FIC) was calculated for each agent by dividing the minimal inhibitory concentration (MIC) of each drug, in combination, by the MIC of the drug alone. FIC values were then summed to determine the fractional inhibitory concentration index (FICI) resulting from the combination. A synergistic interaction was defined as $\text{FICI} \leq 0.5$ and indifference was defined as $1.0 < \text{FICI} \leq 4$, whereas antagonism was defined as $\text{FICI} > 4$ [25]. When computing the FIC index, off-scale MIC (isolate Cg28, $(\text{PhSe})_2$: $> 64 \mu\text{g/mL}$) was converted to the next highest concentration (128 $\mu\text{g/mL}$).

3. Results

The results of the *in vitro* susceptibility test, FICI and the resulting drug interactions against the *C. glabrata* isolates are described in Table 1. MICs (geometric mean) ranged from 0.25 to > 64 (5.16 µg/mL) for (PhSe)₂, 1 to 32 (5.04 µg/mL) for FLU and 0.06 to 0.5 (0.18 µg/mL) for amB. When *C. glabrata* were tested for the (PhSe)₂+FLU combination, a predominance of indifferent (50%) and antagonistic (40%) interactions were observed, whereas synergistic interactions were observed in 10% of the isolates. With regards to the (PhSe)₂+AmB combination, synergistic (76.66%) and indifferent (23.34%) interactions were observed.

4. Discussion

Among the associations analysed in this study, the best results were obtained with the combination AmB+(PhSe)₂ against *C. glabrata* while in the combination FLU+(PhSe)₂ predominated indifferent and antagonistic interactions. The pharmacological and toxicological properties of (PhSe)₂ have been demonstrated in several biological models, as previously reported [17, 18], and many of the pharmacological properties are associated with the antioxidant activity of (PhSe)₂ through the interaction with reducing thiols (thiol peroxidase-like activity). *In vitro*, (PhSe)₂ showed antifungal activity against yeasts and filamentous fungi [19, 20, 22] and antimicrobial activity against the oomycete *Pythium insidiosum* [21]. *In vivo*, it was observed that subcutaneous or oral administration of (PhSe)₂ had no acute lethal toxic effects in rodents [18, 26, 27].

Despite AmB being recommended for primary therapy in severe infections by *C. glabrata*, it is generally becoming evident that higher doses of AmB may be required for efficient treatment [28]. It has previously been shown that the fluconazole-resistant *C. glabrata* group required higher concentrations of AmB to be inhibited [29]. *C. glabrata*

infections have become increasingly hard to treat due to an innate resistance to azole antifungal agents and a low susceptibility to AmB [30, 31].

A high percentage of *C. glabrata* isolates have proven to possess primary resistance to fluconazole, while another percentage of *C. glabrata* isolates easily develop resistance after exposure to treatment with this azole [11, 32]. Triazoles, such as voriconazole, ravuconazole and posaconazole, have been shown to be more effective against fluconazole-resistant *Candida* spp than fluconazole. Due to this fact, voriconazole has been proposed as an alternative therapy for *C. glabrata* infections with strains that are resistant to fluconazole [33, 34]. However, the cross-resistance phenomenon among azoles is well-established [35, 36], which was confirmed with the same strains used in the present study [29, 37].

In this scenario, it is important that studies investigate the mechanism by which chemosensitising agents interact with pathogens in a way that the pathogens become more susceptible to antifungal compounds. This synergism may result in lower effective doses of antifungal agents, induce the resistant microorganisms to become susceptible to antifungals or at least more sensitive to treatment. In the present work, the antifungal activity of (PhSe)₂ against *C. glabrata* and the potential to generate synergistic combinations when (PhSe)₂ is associated with FLU and amB were demonstrated.

In conclusion, we reported that (PhSe)₂ inhibited the *in vitro* growth of *C. glabrata* isolates, and we provided a new approach to *C. glabrata* susceptibility studies once the association of (PhSe)₂ with AmB presents a synergistic potential. New experimental *in vivo* protocols are needed and will promote a better understanding of (PhSe)₂ antimicrobial activity and its use as an adjuvant therapy with antifungal agents.

Acknowledgements

Érico Silva de Loreto is financially supported by fellowships from *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*, Brazil (PNPD-CAPES).

5. References

1. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36:288-305.
2. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.* 2003;3:685-702.
3. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis.* 2009;48:1695-703.
4. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. 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.* 2010;68:278-83.
5. Furlaneto-Maia L, Specian AF, Bizerra FC, de Oliveira MT, Furlaneto MC. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp. obtained from elderly healthy individuals. *Mycopathologia.* 2008;166:209-17.
6. Azevedo AC, Bizerra FC, da Matta DA, de Almeida LP, Rosas R, Colombo AL. *In vitro* susceptibility of a large collection of *Candida* strains against fluconazole and voriconazole by using the CLSI disk diffusion assay. *Mycopathologia.* 2011;171:411-6.
7. Passos XS, Costa CR, Araujo CR, Nascimento ES, Souza LKHE, Fernandes ODL, et al. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. *Mycopathologia.* 2007;163:145-51.
8. Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12:80-96.
9. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Boyken L, Tendolkar S, Kroeger J, et al. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to Fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3185-90.

10. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: A global assessment from the ARTEMIS antifungal surveillance program conducted in 2001 and 2002. *J Clin Microbiol*. 2004;42:3142-6.
11. Sellami A, Sellami H, Neji S, Makni F, Abbes S, Cheikhrouhou F, et al. Antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Sfax Hospital: Tunisia. *Mycopathologia*. 2011;171:417-22.
12. Bonfietti LX, Szeszs MW, Chang MR, Martins MA, Pukinskas SRBS, Nunes MO, et al. Ten-year study of species distribution and antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates at a Brazilian tertiary hospital. *Mycopathologia*. 2012;174:389-96.
13. Metin DY, Hilmioglu-Polat S, Samlioglu P, Doganay-Ofiazoglu B, Inci R, Tumbay E. Evaluation of antifungal susceptibility testing with microdilution and estest methods of *Candida* blood isolates. *Mycopathologia*. 2011;172:187-99.
14. Campbell BC, Chan KL, Kim JH. Chemosensitization as a means to augment commercial antifungal agents. *Front Microbiol*. 2012;3:79
15. Khodavandi A, Alizadeh F, Aala F, Sekawi Z, Chong PP. *In vitro* investigation of antifungal activity of allicin alone and in combination with azoles against *Candida* species. *Mycopathologia*. 2010;169:287-95.
16. Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev*. 2004;104:6255-85.
17. Nogueira CW, Rocha JBT. Diphenyl diselenide a Janus-faced molecule. *J Braz Chem Soc*. 2010;21:2055-71.
18. Nogueira CW, Rocha JBT. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol*. 2011;85:1313-59.
19. Loreto ES, Mario DA, Santurio JM, Alves SH, Nogueira CW, Zeni G. *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationship of diphenyl diselenide and synthetic analogues. *Mycoses*. 2011;54:e572-e6.

20. Rosseti IB, Wagner C, Fachinetto R, Taube P, Costa MS. *Candida albicans* growth and germ tube formation can be inhibited by simple diphenyl diselenides [(PhSe)₂, (MeOPhSe)₂, (*p*-Cl-PhSe)₂, (F₃CPhSe)₂] and diphenyl ditelluride. *Mycoses*. 2011;54:506-13.
21. Loreto ES, Alves SH, Santurio JM, Nogueira CW, Zeni G. Diphenyl diselenide *in vitro* and *in vivo* activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. *Vet Microbiol*. 2012;156:222-6.
22. Billack B, Santoro M, Lau-Cam C. Growth inhibitory action of ebselen on fluconazole-resistant *Candida albicans*: role of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Microb Drug Resist*. 2009;15:77-83.
23. Paulmier C. Selenoorganic functional groups. In: Paulmier C, editor. *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*. 1 ed. Oxford, England: Pergamon Press; 1986. p. 25-57.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts : approved standard. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
25. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:693-715.
26. Meotti FC, Borges VC, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicol Lett*. 2003;143:9-16.
27. Wilhelm EA, Jesse CR, Nogueira CW, Savegnago L. 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*. 2009;61:197-203.
28. Kremery V, Barnes AJ. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect*. 2002;50:243-60.29.

29. Mario DAN, Denardi LB, Bandeira LA, Antunes MS, Santurio JM, Severo LC, et al. The activity of echinocandins, amphotericin B and voriconazole against fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant Brazilian *Candida glabrata* isolates. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107:433-6.

30. Denning DW, Baily GG, Hood SV. Azole resistance in *Candida*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997;16:261-80.

31. Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:668-79.

32. Bennett JE, Izumikawa K, Marr KA. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:1773-7.

33. Johnson LB, Kauffman CA. Voriconazole: A new triazole antifungal agent. Clin Infect Dis. 2003;36:630-7.

34. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Carrillo-Munoz AJ, Quindos G. *In vitro* activities of new triazole antifungal agents, posaconazole and voriconazole, against oral *Candida* isolates from patients suffering from denture stomatitis. Mycopathologia. 2012;173:35-46.

35. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RI, et al. Use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to voriconazole among 13,338 clinical isolates of *Candida* spp. tested by clinical and laboratory standards institute-recommended broth microdilution methods. J Clin Microbiol. 2007;45:70-5.

36. Cross EW, Park S, Perlin DS. Cross-resistance of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to over-the-counter azoles used in the treatment of vaginitis. Microb Drug Resist. 2000;6:155-61.

37. 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;174:215-21.

Table 1: *In vitro* susceptibility and interactions between diphenyl diselenide [(PhSe)₂], fluconazole (FLU) and amphotericin B (AmB) against clinical isolates of *Candida glabrata* (Cg).

Isolate	MIC (µg/mL)			MIC combination			MIC combination		
	(PhSe) ₂	FLU	Amb	(PhSe) ₂ /FLU	FICI	Interaction	(PhSe) ₂ /AmB	FICI	Interaction
Cg1	16.00	2.00	0.25	0.125/32	16.00	A	0.125/0.125	0.50	Syn
Cg2	4.00	2.00	0.25	2/0.25	0.62	Ind	0.125/0.031	0.15	Syn
Cg3	4.00	4.00	0.125	4/0.25	1.06	Ind	0.125/0.125	1.03	Ind
Cg4	2.00	4.00	0.06	8/0.25	4.06	A	2/0.03	1.52	Ind
Cg5	64.00	2.00	0.125	0.125/16	8.00	A	0.12/0.06	0.25	Syn
Cg6	1.00	2.00	0.25	8/0.25	8.12	A	0.125/0.06	0.30	Syn
Cg7	16.00	2.00	0.25	0.125/32	16.00	Ant	0.125/0.125	0.50	Syn
Cg8	1.00	2.00	0.06	0.125/1	0.62	Ind	0.125/0.06	1.10	Ind
Cg9	2.00	8.00	0.06	0.125/16	2.06	Ind	0.5/0.03	0.07	Syn
Cg10	2.00	2.00	0.25	0.125/32	16.00	A	0.125/0.06	0.31	Syn
Cg11	16.00	4.00	0.25	0.125/16	4.00	Ind	0.125/0.125	0.50	Syn
Cg12	0.50	2.00	0.25	2/16	8.50	A	0.5/0.03	0.25	Syn
Cg13	16.00	2.00	0.50	16/32	17.00	A	0.5/0.125	0.28	Syn
Cg14	4.00	8.00	0.25	1/4	0.75	Ind	0.125/0.25	1.03	Ind
Cg15	2.00	2.00	0.25	0.125/16	8.06	A	0.125/0.06	0.31	Syn
Cg16	16.00	4.00	0.25	8/8	2.50	Ind	0.125/0.06	0.25	Syn
Cg17	8.00	16.00	0.125	0.125/16	1.01	Ind	0.125/0.03	0.26	Syn
Cg18	0.25	8.00	0.25	0.5/32	6.00	A	0.125/0.125	1.00	Ind
Cg19	8.00	16.00	0.25	0.5/16	1.06	Ind	1/0.06	0.37	Syn
Cg20	0.5	4.00	0.25	2/32	12.00	A	0.125/0.06	0.50	Syn
Cg21	8.00	32.00	0.125	0.125/32	1.01	Ind	2/0.03	0.50	Syn
Cg22	4.00	32.00	0.125	2/0.25	0.50	Syn	0.5/0.01	0.25	Syn
Cg23	8.00	4.00	0.25	16/0.25	2.00	Ind	0.125/0.06	0.26	Syn
Cg24	8.00	32.00	0.25	2/0.25	0.25	Syn	0.25/0.03	0.15	Syn
Cg25	8.00	16.00	0.125	16/0.25	2.00	Ind	0.5/0.01	0.18	Syn
Cg26	8.00	32.00	0.125	2/16	0.75	Ind	0.125/0.03	0.26	Syn
Cg27	4.00	16.00	0.125	16/16	5.00	Syn	0.125/0.125	1.03	Ind
Cg28	≥64	2.00	0.25	0.125/16	8.00	A	16/0.03	0.25	Syn
Cg29	32.00	4.00	0.125	0.25/16	4.00	Ind	8/0.01	0.37	Syn
Cg30	4.00	1.00	0.06	0.125/1	1.00	Ind	0.125/0.125	2.11	Ind

A: antagonism; Ind: indifference; Syn: synergism;

6 DISCUSSÃO

As infecções fúngicas têm muito menor incidência do que as infecções bacterianas e virais. Historicamente as micoses mais frequentemente observadas na clínica são as superficiais, cutâneo-mucosas e, em menor número, as micoses subcutâneas. Todas elas podem ser tratadas por antifúngicos tópicos.

A segunda metade do século XX foi marcada pelo avanço das ciências médicas onde os diagnósticos mais precoces e tratamentos mais eficientes para doenças crônicas como câncer definiram o que hoje conhecemos como pacientes imunocomprometidos. Neste novo perfil de paciente as micoses oportunistas manifestam-se com intensa morbidade e surpreendentes taxas de mortalidade. A pandemia da AIDS intensificou este dramático processo.

Este contexto requeria antifúngicos sistêmicos; até o final dos anos 80 havia apenas duas opções: anfotericina B e cetoconazol, ambos com elevada toxicidade. O lançamento do fluconazol e itraconazol com indicações primárias para fungos leveduriformes e filamentosos, respectivamente, veio interferir positivamente nas taxas de mortalidade causadas por fungos oportunistas, sobretudo candidíases e criptococose e aspergilose.

A emergência da resistência ao fluconazol foi um marco preocupante, o qual foi intensificado pela comprovação da resistência cruzada aos demais azólicos ameaçando inutilizar a nova classe de antimicóticos. O voriconazol e o posaconazol são as últimas armas que, presume-se, serão ineficazes diante de muitos fungos resistentes. As equinocandinas embora restritas a alguns fungos têm, sobretudo, indicação às candidíases resistentes. Todavia a comprovação de que espécies como *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* tornam-se resistentes a esta classe, recrudescer a ameaça aos novos antimicóticos.

A associação de fármacos com diferentes mecanismos de ação pode servir como uma alternativa para a superação da resistência antifúngica. Fármacos rotineiramente utilizados na clínica para o tratamento de diversas patologias, assim como outros agentes quimiosensibilizadores, podem potencializar a atividade de agentes antifúngicos convencionais, reduzindo o tempo de resposta ao tratamento, aumentando o espectro de atividade, reduzindo a dose, e a toxicidade antifúngica. Além disso, pode diminuir o potencial

dos microrganismos em adquirir resistência a determinados antimicrobianos (JOHNSON et al, 2004).

No presente estudo escolhemos fármacos que já demonstraram efeito antifúngico (tacrolimus e clorpromazina), agentes antibacterianos tradicionais (sulfametoxazol, minociclina), novos antibacterianos ainda não avaliados em seu potencial de sinergismo antifúngico (linezolida) e uma molécula recentemente sintetizada (disseleneto de difenila) que tem apresentado atividade frente a alguns fungos (*Fusarium*, *Candida*) e oomicetos (*Pythium insidiosum*).

A minociclina é um antibacteriano semi-sintético derivado da tetraciclina com espectro bacteriano e atividade similar. É eficiente frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e possui baixa toxicidade (SOUZA et al, 2005). Em nosso estudo, a minociclina, isoladamente, não apresentou atividade frente a *C. glabrata*. No entanto foi demonstrado que a combinação de anfotericina B e minociclina evidenciou alto porcentual de sinergismo. Oliver et al, (2008) encontraram interações sinérgicas entre anfotericina B e tetraciclina frente a *C. albicans*, o que foi confirmado também frente a *C. glabrata* quando associada a minociclina com anfotericina B. Naquele mesmo estudo, *C. albicans* foi evidenciado redução no conteúdo total de ergosterol após exposição a tetraciclina. Além disso, já foi demonstrado que o efeito da tetraciclina está também associado à perda de função mitocondrial em leveduras. (CHOPRA & ROBERTS, 2001). Sendo assim, a melhor ação da anfotericina B combinada a minociclina frente à *C. glabrata* pode também ser devido à redução no conteúdo de ergosterol e perda de função mitocondrial de *C. glabrata*.

Shi et al (2010) compararam a atividade de minociclina e da combinação desta com fluconazol frente a isolados clínicos e biofilmes de *C. albicans* sensíveis e resistentes ao fluconazol. Assim como aqui demonstrado para *C. glabrata*, a minociclina também não demonstrou atividade frente à *C. albicans*. Quando, porém, associada ao fluconazol a minociclina demonstrou interações sinérgicas para os isolados resistentes e indiferença para os sensíveis. Esse efeito foi atribuído a desregulação no balanço dos íons cálcio na célula fúngica. Em biofilmes, a atividade do fluconazol gerou pequena zona de inibição; todavia, na associação com minociclina seu efeito foi aumentado, mostrando-se maior penetração do fluconazol nos biofilmes de *C. albicans*.

Linezolida é um antibacteriano pertencente à classe das oxazolidinonas, produzido de forma totalmente sintética, com excelente atividade frente a cocos Gram-positivos. Exerce sua

atividade inibindo a síntese proteica (DIEKEMA & JONES, 2000). Em nosso estudo, quando testada isoladamente linezolida não apresentou efeito frente à *C. glabrata*, todavia associada a antifúngicos azólicos mostrou altos percentuais de sinergismo. Esta combinação merece atenção por ter demonstrado uma importante atividade frente a *C. glabrata* FR. Não há registros de estudos prévios avaliando a atividade de linezolida frente à *Candida* spp. A porcentagem de sinergismos na combinação linezolida+azólicos frente aos isolados FS deve ser enfatizada, reforçando a interação satisfatória quando usada em associação aos antifúngicos azólicos.

As sulfonamidas, como o sulfametoxazol, têm efeito bacteriostático e inibem a síntese do ácido para-aminobenzóico (PABA). Associado ao trimetoprim exibe efeitos sinérgicos porque agem em diferentes etapas da síntese do ácido fólico. Esta associação além de usada no tratamento de infecções bacterianas é também utilizada com sucesso no tratamento da paracoccidioidomicose (SHIKANIA-YASUDA et al, 2006; STEVENS & VO, 1982). Shikania –Yasuda et al (2002) reportaram que a combinação cetoconazol+sulfametoxazol foi sinérgica frente a *C. albicans*. Ainda, Zarrin et al (2009) reportaram efeito sinérgico de sulfametoxazol associado ao miconazol frente a *Candida* sp. Embora os estudos acima citados indiquem uma possível ação do sulfametoxazol frente à *Candida* sp e *Paracoccidiodes* sp, estes resultados foram mais modestos frente a *C. glabrata*. Frente aos dois grupos FS e FR, as interações de sulfametoxazol+azólicos e sulfametoxazol+ anfotericina B foram indiferentes para a maior parte dos isolados.

A clorpromazina é um antipsicótico, pertencente à classe das fenotiazinas. Além de seus efeitos no sistema nervoso central, a clorpromazina age modificando membranas celulares e também no metabolismo dos nucleotídeos causando intercalação do DNA (LEVIN & WEISS, 1979; KANTESARIA & MARFEY, 1975). Alguns destes efeitos decorrem da ligação da clorpromazina à calmodulina, uma proteína que regula muitos processos celulares essenciais ao crescimento fúngico (JOSEPH & MEANS, 2002). Estudos previos reportam que a clorpromazina tem atividade frente a bactérias (AMARAL et al, 2000) e fungos como *Candida* (WOOD et al, 1985; EILAM et al, 1987), *Aspergillus* e zigomicetos (VITALE et al, 2007). A clorpromazina age como um potente modulador de transportadores multidrogas na célula fúngica, como já foi demonstrado em *Sacharomyces cerevisiae* (KOLACZKOWSKI et al, 2003); por conseguinte, seu uso associado a antifúngicos pode reduzir a multirresistência antifúngica. Em nosso estudo, a clorpromazina associada à anfotericina B mostrou 40% de sinergismo para o grupo FR, o que corrobora os estudos que sustentam de que a

clorpromazina pode interferir no metabolismo fúngico, permitindo uma melhor ação da anfotericina B.

O tacrolimus é um dos mais eficientes agentes imunossupressores e muito utilizado na prevenção da rejeição de transplantes (ONYEWU et al, 2003). Este composto inibe a calcineurina, uma proteína fosfatase envolvida na ativação de linfócitos responsáveis pela síntese de citocinas, como interleucina-2 e, primariamente, auxilia na regulação do NFAT (fator nuclear de ativação de células T). A calcineurina é ativada pelo aumento de cálcio citoplasmático e sua inibição, por imunossupressores, bloqueia a ativação dos linfócitos T, o que é crítico para a resposta imune (BAKSH & BURAKOFF, 2000).

A calcineurina age na fisiologia fúngica, incluindo a regulação da progressão do ciclo celular, na homeostase de cátions, na biossíntese da parede celular, na resistência antifúngica e na virulência (BLANKENSHIP & HEITMAN, 2005). Os imunossupressores inibem a função da calcineurina em muitas espécies fúngicas, incluindo *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*, afetando funções essenciais na célula fúngica (BADER et al, 2003). Os antifúngicos azólicos estimulam o influxo de cálcio e isso ativa a via de sinalização do cálcio que é essencial para a sobrevivência das leveduras. Em *C. albicans* a inibição da calcineurina resulta em um aumento da suscetibilidade aos antifúngicos azólicos, devido aos altos níveis de estresse causado pelo influxo de íons cálcio e sódio na célula fúngica (BLANKENSHIP & HEITMAN, 2005). Em *C. glabrata* a combinação de azólicos com tacrolimus evidenciou sinergismo frente aos isolados sensíveis e resistentes ao fluconazol. Alguns estudos previamente realizados já haviam demonstrado a boa interação de tacrolimus com antifúngicos frente à *Candida*. Onyewu et al (2003) demonstraram efeito sinérgico na combinação de terbinafina e tacrolimus frente a *C. glabrata*; também Sun et al (2008) demonstraram que a atividade de agentes antifúngicos azólicos pode ser aumentada pelo tacrolimus em *C. albicans*. Cruz et al (2002) propuseram que o tacrolimus e a ciclosporina podem ser sinérgicos na combinação com azólicos para o tratamento de infecções invasivas por *Candida* sp. Esta proposição está de acordo com os resultados do presente estudo, pois a inibição da calcineurina pode funcionar como um adjuvante junto aos antifúngicos azólicos no tratamento de infecções invasivas causadas por *C. glabrata*, em destaque para isolados resistentes ao fluconazol.

As propriedades farmacológicas e toxicológicas do disseleneto de difenila (PhSe)₂ têm sido demonstradas em vários modelos biológicos, (NOGUEIRA et al, 2010; NOGUEIRA et

al, 2011) e, muitas das propriedades farmacológicas estão associadas com a atividade antioxidante do $(\text{PhSe})_2$, através da interação com a redução de grupos tióis. *In vitro*, $(\text{PhSe})_2$ mostrou atividade antifúngica contra leveduras e fungos filamentosos, (BILLACK et al, 2009; LORETO et al, 2011; ROSSETI et al, 2010) e a atividade antimicrobiana contra o oomiceto *Pythium insidiosum* (LORETO et al, 2012). *In vivo*, observou-se que a administração subcutânea ou oral de $(\text{PhSe})_2$ não tiveram efeitos tóxicos letais agudos em roedores (NOGUEIRA et al, 2011; MEOTTI et al, 2003; WILHELM et al, 2009). No presente estudo, a atividade antifúngica, *in vitro*, do $(\text{PhSe})_2$ contra *C. glabrata* e potencial para gerar combinações sinérgicas quando o $(\text{PhSe})_2$ está associado com fluconazol e anfotericina B foi estabelecida.

Apesar de anfotericina B ser recomendada para terapia primária em infecções graves por *C. glabrata*, geralmente pode ser necessárias doses mais elevadas de anfotericina B para o tratamento eficaz (KRCMERY & BARNES, 2002). Foi previamente evidenciado que *C. glabrata* fluconazol-resistente requer concentrações mais elevadas de anfotericina B para ser inibida (MARIO et al, 2012). Outrossim, uma elevada percentagem de isolados de *C. glabrata* evidenciam resistência primária ao fluconazol, ao mesmo tempo em que outra desenvolve resistência após tratamento com este azólico (SELLAMI ET AL, 2011; BENNETT et al, 2004). Os triazóis voriconazol, ravuconazol e posaconazol, têm demonstrado maior atividade contra *Candida* spp resistente ao fluconazol. Assim, o voriconazol tem sido proposto como uma alternativa terapêutica para infecções por *C. glabrata* com cepas resistentes ao fluconazol (JOHNSON & KAUFFMAN, 2003; MARCOS-ARIAS et al 2012). No entanto, o fenômeno de resistência cruzada entre os azóis está bem estabelecido (PFALLER et al, 2007; CROSS et al, 2000), a qual foi confirmada com as mesmas amostras utilizadas no presente estudo.

Neste cenário, é importante investigar o mecanismo pelo qual os agentes quimiosensibilizantes interagem com agentes patogênicos de tal modo a se tornarem mais suscetíveis aos antifúngicos. Este sinergismo pode resultar em menores doses eficazes de agentes antifúngicos, podendo se constituir em importante alternativa de tratamento.

Os estudos *in vitro* são preliminares, todavia, demonstram o comportamento de duas drogas que quando combinadas e interagindo sinergisticamente permitem a elaboração de novas hipóteses de tratamento. Os resultados do presente estudo apontam algumas combinações candidatas a serem avaliadas em modelos experimentais *in vivo*.

7 CONCLUSÕES

A avaliação da suscetibilidade de *C. glabrata* aos antifúngicos isolados e combinados com agentes não-antifúngicos permitiu verificar que:

- os isolados resistentes ao fluconazol evidenciaram CIMs mais elevadas aos demais azólicos, confirmando-se resistência cruzada;

- a suscetibilidade a anfotericina B não foi afetada pela resistência aos azólicos;

- as combinações de azólicos com tacrolimus ou com linezolida evidenciaram os maiores percentuais de sinergismo, sobretudo frente ao grupo fluconazol-resistente.

- entre as combinações com anfotericina B minociclina, clorpromazina e disseleneto de difenila apresentaram elevados percentuais de sinergismo.

- as combinações de azólicos com minociclina e sulfametoxazol, assim como as combinações de anfotericina com linezolida e sulfametoxazol, e ainda a combinação de fluconazol com disseleneto de difenila não modificaram o perfil de suscetibilidade de *C. glabrata* a estes antifúngicos;

- as combinações dos azólicos com a clorpromazina tiveram elevados percentuais de antagonismo, assim essas associações não são recomendadas no tratamento de infecções por *C. glabrata*.

As combinações com elevadas taxas de sinergismo surgem como potenciais alternativas terapêuticas no tratamento de infecções por *C. glabrata* a serem estudadas *in vivo* que, podem melhorar a ação e conseqüentemente reduzir a resistência frente aos antifúngicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFELTRA, J.; VERWEIJ, P. E. Antifungal activity of nonantifungal drugs. **J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 22: 397-407, 2003.

AKINS, R. A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. **Med. Mycol.** 43: 285-318, 2005.

ALBERTSON, G. D.; NIIMI, M.; CANNON, R. D.; JENKINSON, H. F. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 40: 2835-2841, 1996.

AMARAL, L.; KRISTIANSEN, J. E. Phenothiazines: an alternative to conventional therapy for the initial management of suspected multidrug resistant tuberculosis. A call for studies. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 14: 173-176, 2000.

ARIKAN, S.; SANCAK, B.; HASCELİK, G. *In vitro* activity of caspofungin compared to amphotericin B, fluconazole and itraconazole against *Candida* strains isolated in a Turkish University Hospital Medical Mycology. **Med. Mycol.**, 43: 171-178, 2005.

BADER, T.; BODENDORFER, B.; SCHROPPEL, K.; MORSCHHAUSER, J. Calcineurin is essential for virulence in *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, 71: 5344-5354, 2003.

BAKSH, S.; BURAKOFF, S. J. The role of calcineurin in lymphocyte activation. **Semin. Immunol.**, 12: 405-415, 2000.

BALKIS, M. M.; LEIDICH, S. D.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Mechanisms of fungal resistance: an overview. **Drugs**, 62: 1025-1040, 2002.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíases. **J. Bras. Doenças Sex. Transm.** 22: 22-38, 2010.

BARNS, S. M.; LANE, D. J.; SOGIN, M. L.; BIBEAU, C.; WEISBURG, W. G. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. **J. Bacteriol.**, 173: 2250-2255, 1991.

BAUMGARTNER, C.; FREYDIERE, A. M.; GILLE, Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar Candida plates. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 454-456, 1996.

BENDEL, C. M.; HOSTETTER, M. K. Correlation of adhesion and pathogenic potential in yeast. **Pediatr. Res.**, 29: 167, 1991.

BENNETT, J. E.; IZUMIKAWA, K.; MARR, K. A. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 48: 1773-1777, 2004.

BIALKOVÁ, A.; SUBIK, J. Biology of the Pathogenic Yeast *Candida glabrata*. **Folia Microbiol.**, 51: 3-20, 2006.

BIGGS, W. S.; WILLIAMS, R. M. Common gynecologic infections. **Prim. Care Clin. Office Pract.** 36: 33-51, 2006.

BILLACK, B.; SANTORO, M.; LAU-CAM, C. Growth inhibitory action of ebselen on fluconazole-resistant *Candida albicans*: role of the plasma membrane H⁺-ATPase. **Microb. Drug Resist.**, 15: 77-83, 2009.

BLANKENSHIP, J. R.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for *Candida albicans* to survive calcium stress in serum. **Infect. Immun.**, 73: 5767-5774, 2005.

BLUMBERG, H. M.; JARVIS, W. R.; SOUCIE, J. M.; EDWARDS, J. E.; PATTERSON, J. E.; PFALLER, M. A.; RANGEL-FRAUSTO, M. S.; RINALDI, M. G.; SAIMAN, L.; WIBLIN, R. T.; WENZEL, R. P.; THE NEMIS STUDY GROUP. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. **Clin. Infect. Dis.**, 33: 177-186, 2001.

BODEY, G. P.; MARDANI, M.; HANNA, H. A.; BOKTOUR, M.; ABBAS, J.; GIRGAWY, E.; HACHEM, R. Y.; KONTOYANNIS, D. P.; RAAD, I. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. **Am. J. Med.**, 112: 380-385, 2002.

BORIOLLO, M. F.; ROSA, E. A.; GONÇALVES, R. B.; HÖFLING, J. F. Parity among interpretation methods of MLEE patterns and disparity among clustering methods in epidemiological typing of *Candida albicans*. **J. Microbiol. Methods**, 64: 346-365, 2006.

BORMANN, A. M.; MORRISON, V. A. Review of the pharmacology and clinical studies of micafungin. **Drug. Des. Devel. Ther.**, 3: 295-302, 2009.

BOUCHARA, R. A.; DECLERCK, P.; CIMON, B.; PLANCHENAUT, C.; DE GENTILE, L.; CHABASSE, D. Routine use of CHROMagar Candida medium for presumptive identification of *Candida* yeast species and detection of mixed fungal populations. **Clin. Microbiol. Infectol.**, 2: 202-208, 1996.

BRANCH, R. A. Prevention of amphotericin B-induced renal impairment: A review on the use of sodium supplementation. **Arch. Intern. Med.**, 148: 2389-2394, 1988.

CALDERONE, R. A. ***Candida and candidiasis***. United States: American Society of Microbiology, 1^a ed., p. 245, 2002.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Rev. Iberoam. Micol.**, 23: 39-49, 2006.

CHAKRABARTI, A., NAYAK, N.; TALWAR, P. *In vitro* proteinase production by *Candida* species. **Mycopathologia**, 114: 163-168, 1991.

CHAPELAND-LECLERC, F.; HENNEQUIN, C.; PAPON, N.; NOËL, T.; GIRARD, A.; SOCIÉ, G.; RIBAUD, P.; LACROIX, C. Acquisition of flucytosine, azole, and caspofungin resistance in *Candida glabrata* bloodstream isolates serially obtained from a hematopoietic stem cell transplant recipient. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 54: 1360-1362, 2010.

CHAVES, G. M.; CAVALVANTI, M. A.; PORTO, A. L. F. Pathogenicity characteristics of stocked and fresh yeast strains. **Braz. J. Microbiol.**, 34: 197-202, 2003.

CHAVES, G. M.; CAVALVANTI, M. A.; PORTO, A. L. F. Pathogenicity characteristics of stocked and fresh yeast strains. **Braz. J. Microbiol.**, 34: 197-202, 2003.

CHEN, S. C.; HALLIDAY, C. L.; MEYER, W. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. **Med. Mycol.** 40: 333-357, 2002.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 65: 232-260, 2001.

CHOW, J. K.; GOLAN, Y.; RUTHAZER, R.; KARCHMER, W. A.; CARMELI, Y.; LICHTENBERG, D.; CHAWLA, V.; YOUNG, J.; HADLEY, S. Factors associated with candidemia caused by non-*albicans* *Candida* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit. **Clin. Infect. Dis.**, 46: 1206-1213, 2008.

CHRISTIANSEN, K. J.; BERNARD, E. M.; GOLD, J. W.; ARMSTRONG, D. Distribution and activity of amphotericin B in humans. **J. Infect. Dis.**, 152: 1037-1043, 1985.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev. Soc. Bras. Medic. Trop.**, 36: 599-607, 2003.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R.; DE ALMEIDA MONFARDINI, L. P.; CUNHA, A. K.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect. Contr. Hosp. Epidemiol.**, 28: 570-576, 2007.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in Eleven Medical Centers. **J. Clin. Microbiol.**, 44: 2816-2823, 2006.

COX, S. D.; GUSTAFSON, J. E.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; LIEW, Y. C.; HARTLAND, R. P.; BELL, H. C.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. **Lett. Appl. Microbiol.**, 26: 355-358, 1998.

CROSS, E. W.; PARK, S.; PERLIN, D. S. Cross-resistance of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to over-the-counter azoles used in the treatment of vaginitis. **Microb. Drug Resist.**, 6: 155-61, 2000.

CRUZ, M. C.; GOLDSTEIN, A. L.; BLANKENSHIP, J. R.; DEL POETA, M.; DAVIS, D.; CARDENAS, M. E.; PERFECT, J. R.; MCCUSKER, J. H.; HEITMAN, J. Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. **EMBO J.**, 21: 546-559, 2002.

CSANK, C.; HAYNES, K. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. **FEMS Microbiol. Lett.**, 189: 115-20, 2000.

DERESINSKI, S. C.; STEVENS, D. A. Caspofungin. **Clin. Infect. Dis.**, 36: 1445-1457, 2003.

DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A. Nosocomial candidemia: an ounce of prevention is better than a pound of cure. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, 25: 624-626, 2004.

DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N. Age-related trends in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolates in North America. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2000. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 20: 412-418, 2002.

DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N. Oxazolidinones; A review. **Drug**, 59: 7-16, 2000.

DUJON, B.; SHERMAN, D.; FISCHER, G.; CASAREGOLA, S.; LAFONTAINE, I.; DE MONTIGNY, J.; MARCK, C.; NEUVÉGLISE, C.; TALLA, E.; GOFFARD, N.; FRANGEUL, L.; AIGLE, M.; ANTHOUARD, V.; BABOUR, A.; BARBE, V.; BARNAY, S.; BLANCHIN, S.; BECKERICH, J. M.; BEYNE, E.; BLEYKASTEN, C.; BOISRAMÉ, A.; BOYER, J.; CATTOLICO, L.; CONFANIOLERI, F.; DE DARUVAR, A.; DESPONS, L.; FABRE, E.; FAIRHEAD, C.; FERRY-DUMAZET, H.; GROUPI, A.; HANTRAYE, F.; HENNEQUIN, C.; JAUNIAUX, N.; JOYET, P.; KACHOURI, R.; KERREST, A.; KOSZUL, R.; LEMAIRE, M.; LESUR, I.; MA, L.; MULLER, H.; NICAUD, J. M.; NIKOLSKI, M.; OZTAS, S.; OZIER-KALOGEROPOULOS, O.; PELLENZ, S.; POTIER, S.; RICHARD, G. F.; STRAUB, M. L.; SULEAU, A.; SWENNEN, D.; TEKAIA, F.; WÉSOLOWSKI-LOUVEL, M.; WESTHOF, E.; WIRTH, B.; ZENIOU-MEYER, M.; ZIVANOVIC, I.; BOLOTIN-FUKUHARA, M.; THIERRY, A.; BOUCHIER, C.; CAUDRON, B.; SCARPELLI, C.; GAILLARDIN, C.; WEISSENBACH, J.; WINCKER, P.; SOUCIET, J. L. Genome evolution in yeasts. **Nature**, 430: 35-44, 2004.

DUPONT, B. Overview of the lipid formulation of amphotericin B. **J. Antimicrob. Chemother.**, 49: 31-36, 2002.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet Infect. Dis.**, 3: 685-702, 2003.

EILAM, Y.; POLACHEK, I.; BEN-GIGI, G.; CHERNICHOVSKY, D. Activity of phenothiazines against medically important yeasts. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 31: 834-836, 1987.

ELLEPDA, A. N.; MORRISON, C. J. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. **J. Microbiol.**, 43: 65-84, 2005.

FAN-HAVARD, P.; CAPANO, D.; SMITH, S. M.; MANGIA, A.; ENG, R. H. Development of resistance in *Candida* isolates from patients receiving prolonged antifungal therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 35: 2302-2305, 1991.

FERRARI, S.; SANGUINETTI, M.; DE BERNARDIS, F.; TORELLI, R.; POSTERARO, B.; VANDEPUTTE, P.; SANGIARD, D. Loss of mitochondrial functions associated with azole resistance in *Candida glabrata* results in enhanced virulence in mice. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 55: 1852-1860, 2011.

FIDEL, P. L.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL J. D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clin. Microbiol. Rev.**, 12: 80–96, 1999.

FIORI, A.; DIJCK, P. V. Potent synergistic effect of doxycycline with fluconazole against *Candida albicans* is mediated by interference with iron homeostasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 56: 3785–3796, 2012.

FOX, R. I.; NEAL, K. R.; LEEN, C. L. S.; ELLIS, M. E.; MANDAL, B. K. Fluconazole resistant *Candida* in AIDS. **J. Infect. Dis.**, 22: 201–204, 1991.

FRIDKIN, S. K. The changing face of fungal infections in health care settings. **Clin. Infect. Dis.**, 41: 1455–1460, 2005.

GALLIS, H. A.; DREW, R. H.; PICKARD, W. W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Rev. Infect. Dis.**, 12: 308-29, 1990.

GARCIA-EFFRON, G.; LEE, S.; PARK, S.; CLEARY, J. D.; PERLIN, D. S. Effect of *Candida glabrata* FKS1 and FKS2 Mutations on Echinocandin Sensitivity and Kinetics of 1,3-D-Glucan Synthase: Implication for the Existing Susceptibility Breakpoint. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 53: 3690-3699, 2009.

GARNACCHO-MONTEIRO, J.; DÍAZ-MARTÍN, A.; GARCÍA-CABRERA, E.; PIPAON, M. R.; HERNÁNDEZ-CABALLERO, C.; AZNAR-MARTÍN, J.; CISNEROS, J. M.; ORTIZ-LEYBA, C. Risk factors for fluconazole-resistant candidemia. **J. Antimicrob. Chemother.**, 54: 3149-3154, 2010.

GEIGER, A. M.; FOXMAN, B.; SOBEL, J. D. Chronic Vulvovaginal candidiasis: characteristics of women with *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and no *Candida*. **Genitourin. Med.**, 71: 304–307, 1995.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 9^a ed., p. 374, 1996.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, 13: 122-143, 2000.

GHISLENI, G.; KAZLAUCKAS, V.; BOTH, F. L.; PAGNUSSA, N.; MIORANZZA, S.; ROCHA, J. B.; SOUZA, D. O.; PORCIÚNCULA, L. O. Diphenyl diselenide exerts anxiolytic-like effect in Wistar rats: Putative roles of GABAA and 5HT receptors. **Prog. Neuro-Psychopharmacolog. Biol. Psychiatry**, 32: 1508-1515, 2008.

GUBBINS, P. O.; ANAISSIE, E. Overview of antifungal agents. **Infect. Dis. Spec. Edit.**, 5: 65-70, 2002.

GUO, Q.; SUN, S.; LI, Y.; YU, J.; SHI, C. *In vitro* interactions between azoles and amiodarone against clinical *Candida albicans*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 31: 88-90, 2008.

HAIJEH, R. A.; SOFAIR, A. N.; HARRISON, L. H.; LYON, G. M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; MIRZA, S. A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; BRANDT, M. E.; WARNOCK, D. W. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. **J. Clin. Microbiol.**, 42: 1519-1527, 2004.

HALEY, L. D. Yeasts of medical importance. **Am. J. Clin. Pathol.**, 36: 227-234, 1961.

HERBRECHT, R.; DENNING, D. W.; PATTERSON, T. F.; BENNETT, J. E.; GREENE, R. E.; OESTMANN, J. W.; KERN, W. V.; MARR, K. A.; RIBAUD, P.; LORTHOLARY, O.; SYLVESTER, R.; RUBIN, R. H.; WINGARD, J. R.; STARK, P.; DURAND, C.; CAILLOT, D.; THIEL, E.; CHANDRASEKAR, P. H.; HODGES, M. R.; SCHLAMM, H. T.; TROKE, P. F.; DE PAUW, B. Invasive Fungal Infections Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Global *Aspergillus* Study Group. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. **N. Engl. J. Med.**, 347: 408-415, 2002.

HITCHCOCK, C. A.; PYE, G. W.; TROKE, P. F.; JOHNSON, E. M.; WARNOCK D. V. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 37: 1962-1965, 1993.

HULL, C. M.; BADER, O.; PARKER, J. E.; WEIG, M.; GROSS, U.; WARRILOW, A. G.; KELLY, D. E.; KELLY, S. L. Two clinical isolates of *Candida glabrata* exhibiting reduced sensitivity to amphotericin B both harbor mutations in ERG2. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 56: 6417-6421, 2012.

JEU, L.; PIACENTI, F. J.; LYAKHOVETSKIY, A. G.; FUNG, H. B. Voriconazole. **Clin. Ther.**, 25: 1321-1381, 2003.

- JOHNSON, E. M.; WARNOCK, D. W.; LUKER, J.; PORTER, S. R.; SCULLY, C. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidiasis. **J. Antimicrob. Chemother.**, 35: 103–114, 1995.
- JOHNSON, L. B.; KAUFFMAN, C. A. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. **Clin. Infect. Dis.**, 36: 630-637, 2003.
- JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination antifungal therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 48: 693-715, 2004.
- JOSEPH, J. D.; MEANS, A. R. Calcium binding is required for calmodulin function in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryot. Cell**, 1: 119-125, 2002.
- KANTESARIA, P.; MARFEY, P. The effect of chlorpromazine on some properties of DNA in solution. **Physiol. Chem. Phys.** 7: 53-67, 1975.
- KATIYAR, S.; PFALLER, M.; EDLIND, T. *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 50: 2892-2894, 2006.
- KAUFFMAN, C. A.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D.; GALLIS, H. A.; MCKINSEY, D. S.; KARCHMER, A. W.; SUGAR, A. M.; SHARKEY, P. K.; WISE, G. F.; MANGI, R.; MOSHER, A.; LEE, J. Y. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. The National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. **Clin. Infect. Dis.**, 30: 14-18, 2000.
- KAUR, R.; DOMERGUE, R.; ZUPANCIC, M. L.; CORMACK, B. P. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. **Curr. Opin. Microbiol.**, 8: 378-384, 2005.
- KELLY, S. L.; LAMB, D. C.; CORRAN, A. J.; BALDWIN, B. C.; KELLY, D. E. Mode of action and resistance to azole antifungal associated with formation of 14 α -methylergosta-8,24(28)dien-3 α ,6 α -diol. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 207: 910-915, 1995.
- KITCHEN, V. S.; SAVAGE, M.; HARRIS, J. R. *Candida albicans* resistance in AIDS. **J. Infect. Dis.**, 22: 204–205, 1995.

KLOTZ, S. A.; DRUTZ, D.; HARRISON, J. L.; HUPPERT, M. Adherence and penetration of vascular endothelium by *Candida* yeasts. **Infect. Immun.**, 42: 374-384, 1983.

KOLACZKOWSKI, M.; MICHALAK, K.; MOTOHASHI, N. Phenothiazines as potent modulators of yeast multidrug resistance. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 22: 279-283, 2003.

KRCMERY, V.; BARNES, A. J. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **J. Hosp. Infect.**, 50: 243-60, 2002.

KROGH-MADSEN, M.; ARENDRUP, M. C.; HESLET, L.; KNUDSEN, J. D. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. **Clin. Infect. Dis.**, 42: 938-944, 2006.

KULLBERG, B. J.; SOBEL, J. D.; RUHNKE, M.; PAPPAS, P. G.; VISCOLI, C.; REX, J. H.; CLEARLY, J. D.; RUBINSTEIN, E.; CHURCH, L. W.; BROWN, J. M.; SCHLAMM, H. T.; OBORSKA, I. T.; HILTON, F.; HODGES, M. R. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in nonneutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. **Lancet.**, 366: 1435-1442, 2005.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINZ-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia médica**. Rio de Janeiro: Sarvier, 9ª ed., p. 123-169, 252-340, 616-635, 2002.

LEVIN, R. M.; WEISS, B. Selective binding of antipsychotics and other psychoactive agents to the calcium-dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 208: 454-459, 1979.

LEWIS, R. E. Overview of the changing epidemiology of candidemia. **Curr. Med. Res. Opin.**, 25: 1732-1740, 2009.

LIGORI, G.; LUCARIELLO, A.; COLELLE, G.; LUCA, A.; MARINELI, P. Rapid identification of *Candida* species in oral solution by PCR. **J. Clin. Pathol.**, 60: 1035-1039, 2007.

LOPES, A. C. Diagnóstico e tratamento. São Paulo: Manole, 1ª ed., p. 1627, 2006.

LORETO, E. S.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J. M.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. Diphenyl diselenide *in vitro* and *in vivo* activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Vet. Microbiol.**, 156: 222-226, 2012.

LORETO, E. S.; MARIO, D. A.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationship of diphenyl diselenide and synthetic analogues. **Mycoses**, 54: 572-576, 2011.

LUPETI, A.; DANESE, R.; CAMPA, M.; DEL TACCA, M.; KELLY, S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **TRENDS Mol. Med.**, 8: 76-81, 2002.

MANZANO-GAYOSSO, P.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, F.; ZAVALA-VELASQUEZ, N.; MENDEZ-TOVAR, L. J.; NAQUID-NARVAEZ, J. M.; TORRES-RODRIGUEZ, J. M.; LOPEZ-MARTINEZ, R. Candiduria in type 2 diabetes mellitus patients and its clinical significance. *Candida* spp. Antifungal susceptibility. **Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.**, 46: 603-610, 2008.

MARCOS-ARIAS, C.; ERASO, E.; MADARIAGA, L.; CARRILLO-MUNOZ A. J.; QUINDOS, G. *In vitro* activities of new triazole antifungal agents, posaconazole and voriconazole, against oral *Candida* isolates from patients suffering from denture stomatitis. **Mycopathologia.**, 173: 35-46, 2012.

MARIO, D. A. N.; DENARDI, L. B.; BANDEIRA, L. A.; ANTUNES, M. S.; SANTURIO, J. M.; SEVERO, L. C.; ALVES, S. H. The activity of echinocandins, amphotericin B and voriconazole against fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant Brazilian *Candida glabrata* isolates. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, 107:433-436, 2012.

MARTEL, C. M.; PARKER, J. E.; BADER, O.; WEIG, M.; GROSS, U.; WARRILOW, A. G. S.; ROLLEY, N.; KELLY, D. E.; KELLY, S. L. Identification and Characterization of Four Azole-Resistant *erg3* Mutants of *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 54: 4527-4533, 2010.

MASSONET, C.; VAN ELDERE, J.; VANCECHOUTTE, M.; DE BAERE, T.; VERHAEGER, J.; LAGROU, R. Comparison of Vitek2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. **J. Clin. Microbiol.**, 42: 2209-2211, 2004.

MCNEIL, M. M.; NASH, S. L.; HAJJEH, R. A.; PHELAN, M. A. CONN, L. A.; PLIKAYTIS, B. D.; WARNOCK, D. W. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. **Clin. Infect. Dis.**, 33: 641-647, 2001.

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

- MORGAN, J. Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, 7: 429-439, 2005.
- MORSCHHÄUSER, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. **Biochim. Biophys. Acta**, 1587: 240-248, 2002.
- MUKHERJEE, P. K.; SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; GHANNOUM, M. A. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clin. Microbiol. Reviews**, 18: 163-194, 2005.
- MULLER, H.; THIERRY, A.; COPPÉE, J. Y.; GOUYETTE, C.; HENNEQUIN, C.; SISMEIRO, O.; TALLA, E.; DUJON, B.; FAIRHEAD, C. Genomic polymorphism in the population of *Candida glabrata*: gene copy-number variation and chromosomal translocations. **Fungal Genet. Biol.**, 46: 264-276, 2009.
- NIIMI, K.; WOODS, M. A.; MAKI, K.; NAKAYAMA, H.; HATAKENAKA, K.; CHIBANA, H.; IKEDA, F.; UENO, K.; NIIMI, M.; CANNON, R. D.; MONK, B.C. Reconstitution of high-level micafungin resistance detected in a clinical isolate of *Candida glabrata* identifies functional homozygosity in glucan synthase gene expression. **J. Antimicrob. Chemother.**, 67: 1666-1676, 2012.
- NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Arch. Toxicol.**, 85: 1313-59, 2011.
- NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide a Janus-faced molecule. **J. Braz. Chem. Soc.**, 21: 2055-2071, 2010.
- NOGUEIRA, C. W.; BORGES, L. P.; SOUZA, A. C. G. Oral administration of diphenyl diselenide potentiates hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats. **J. Applied Toxicol.**, 29: 156-164, 2009.
- NOGUEIRA, C. W.; QUINHONES, E. B.; JUNG, E.A.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflam. Res.**, 52: 56-63, 2003.
- NUCCI, M.; MARR, K. A. Emerging fungal diseases. **Clin. Infect. Dis.**, 41: 521-526, 2005.
- OLIVER, B. G.; SILVER, P. M.; MARIE, C.; HOOT, S. J.; LEYDE, S. E.; WHITE, T. C. Tetracycline alters drug susceptibility in *Candida albicans* and other pathogenic fungi. **Microbiol.**, 154: 960-970, 2008.

OLSON, J. A.; ADLER-MOORE, J. P.; SMITH, P. J.; PROFFITT, R. T. Treatment of *Candida glabrata* infection in immunosuppressed mice by using a combination of liposomal amphotericin B with caspofungin or micafungina. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 49: 4895-4902, 2005.

ONYEWU, C.; BLANKENSHIP, J. R.; DEL POETA, M.; HEITMAN, J. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, 47: 956-964, 2003.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D.; BENJAMIN JR, D. K.; CALANDRA, T. F.; EDWARDS JR, J. E.; FILLER, S. G.; FISHER, J. F.; KULLBERG, B. J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; REX, J. H.; WALSH, T. J.; SOBEL, J. D. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, 48: 503-535, 2009.

PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; LEE, J.; HAMILL, R. J.; LARSEN, R. A.; POWDERLY, W.; KAUFFMAN, C. A.; HYSLOP, N.; MANGINO, J. E.; CHAPMAN, S.; HOROWITZ, H. W.; EDWARDS, J. E.; DISMUKES, W. E.; NIAID MYCOSES STUDY GROUP. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clin. Infect. Dis.**, 5: 634-643, 2003.

PAPPAS, P. G.; MYCOSES STUDY GROUP. Candidemia in the intensive care unit: miles to go before we sleep. **Crit. Care Med.**, 39: 884-885, 2011.

PERLIN, D. S. Echinocandin-resistant *Candida*: Molecular methods and phenotypes. **Curr. Fungal Infect. Rep.**, 5: 113-119, 2011.

PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis and treatment. **Med. Mycol.**, 45: 321-346, 2007.

PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections, epidemiology, diagnosis and treatment. **Med. Mycol.**, 45: 321-346, 2007.

PFALLER, M. A.; CASTANHEIRA, M.; LOCKHART, S. R.; JONES, R. N. *Candida glabrata*: Multidrug Resistance and Increased Virulence in a Major Opportunistic Fungal Pathogen. **Curr. Fungal Infect. Rep.**, 6: 154-164, 2012.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.**, 20: 133-163, 2007.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. I.; DIEKEMA, D. J. Use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to voriconazole among 13,338 clinical isolates of *Candida* spp. tested by clinical and laboratory standards institute-recommended broth microdilution methods. **J. Clin. Microbiol.**, 45:70-75, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; SADER, H. S.; FLUIT, A. C.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A. Participant Group. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and *in vitro* susceptibilities to fluconazole, ravuconazole and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. **J. Clin. Microbiol.**, 39: 3254-3259, 2001.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin and micafungin, analysis proposal for interpretative MIC breakpoints. **J. Clin. Microbiol.**, 46: 2620-2629, 2008.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. *In vitro* susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species to itraconazole: global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods. **J. Clin. Microbiol.**, 43: 3807-3810, 2005.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systematically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. **J. Clin. Microbiol.**, 42: 3142-3146, 2004.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. J.; DIEKEMA, D. J. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. **J. Clin. Microbiol.**, 41: 5729-5731, 2003.

POLÁKOVÁ, S.; BLUME, C.; ZÁRATE, J. A.; MENDEL, M.; JORCK-RAMBERG, D.; STENDERUP, J.; PISKUR, J. Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 106: 2688-2693, 2009.

PRIGOL, M.; BRUNING, C. A.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C. W. Protective effect of disubstituted diaryl diselenides on cerebral oxidative damage caused by sodium nitroprusside. **Biochem. Eng. J.**, 45: 94-99, 2009.

- QUINDÓS, G.; CARRILO-MUÑOZ, A. J.; ERASO, E.; CANTÓN, E.; PEMÁN, J. Actividad antifúngica *in vitro* de voriconazol: Nuevos datos después de los primeros años de experiencia clínica. **Rev. Iberoam. Micol.**, 24: 198-209, 2007.
- REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L. L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.; WARNOCK, D. W. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin. Microbiol. Rev.**, 14: 643-658, 2001.
- ROSSETI, I. B.; WAGNER, C.; FACHINETTO, R.; TAUBE JR, P.; COSTA, M. S. *Candida albicans* growth and germ tube formation can be inhibited by simple diphenyl diselenides [(PhSe)₂, (MeOPhSe)₂, (*p*-Cl-PhSe)₂, (F₃CPhSe)₂] and diphenyl ditelluride. **Mycoses**, 54: 506-513, 2011.
- RUAN, S. Y.; HSUEH, P. R. Invasive candidiasis: an overview from Taiwan. **J. Formos. Med. Assoc.**, 108: 443-451, 2009.
- RÜCHEL, R. Proteinases of pathogenic fungi. **Mycoses**, 42: 48-52, 1999.
- SÁNCHEZ-VARGAS, L. O.; PÉREZ-RIOS, P.; ROMO-GARCÍA, J.; CORONAZQUIERDO, F. P.; HIDALGO-LOPERENA, H.; FRANCO-MARTÍNEZ, F. Determinación de pH salival y cultivo en pacientes con candidosis bucal HIV positivos y HIV negativos. **Rev. Iberoam. Micol.**, 19: 155-160, 2002.
- SANDVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Rev. Iberoam. Micol.**, 17: 13-81, 2000.
- SANGLARD, D.; ISCHER, F.; BILLE, J. Role of ATP-Binding-Cassette Transporter Genes in High-Frequency Acquisition of Resistance to Azole Antifungals in *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 45: 1174-1183, 2001.
- SANGLARD, D.; ISCHER, F.; CALABRESE, D.; MICHELI, M.D.; BILLE, J. Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast clinical isolates. **Drug Resist. Updat.**, 1: 255-265, 1998.
- SAVEGNAGO, L.; JESSE, C. R.; PINTO, L. G.; ROCHA, J. B.; BARANCELLI, D. A.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. Diphenyl diselenide exerts antidepressant-like and anxiolytic-like effects in mice: Involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway in its antidepressant-like action. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 88: 418-426, 2008.

SAVEGNAGO, L.; PINTO, L. G.; JESSE, C. R.; ALVES, D.; ROCHA, J. B.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidences for the mechanism of action. **Europ. J. Pharmacol.**, 555: 129-138, 2007.

SELLAMI, A.; SELLAMI, H.; NEJI, S.; MAKNI, F.; ABBES, S.; CHEIKHROUHOU, F.; CHELLY, H.; BOUAZIZ, M.; HAMMAMI, B.; BEN JEMAA, M.; KHALED, S.; AYADI, A. Antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Sfax Hospital: Tunisia. **Mycopathologia.**, 171: 417-22, 2011.

SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, 12: 40-79, 1999.

SHI, W.; CHEN, Z.; CHEN, X.; CAO, L.; LIU, P.; SUN, S. The combination of minocycline and fluconazole causes synergistic growth inhibition against *Candida albicans*: an *in vitro* interaction of antifungal and antibacterial agents. **FEMS Yeast Res.**, 10: 885-893, 2010.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; BENARD, G.; HIGAKI, Y.; DEL NEGRO, G. M.; HOO, S.; VACCARI, E. H.; GRYSCHKEK, R. C.; SEGURADO, A. A.; BARONE, A. A.; ANDRADE, D. R. Randomized trial with itraconazole, ketoconazole and sulfadiazine in paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, 40: 411-417, 2002.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO F. Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. R.; MORETTI, M. A. Consenso de paracoccidioidomicose. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 39: 297-310, 2006.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2ª ed., p. 265-274, 2004.

SOBEL, J. D. Changing epidemiology of invasive candidiasis in intensive care units—much ado about nothing? **Crit. Care Med.**, 36: 2188-2189, 2008.

SOBEL, J. D. Management of Infections Caused by *Candida glabrata*. **Curr. Infect. Dis. Report.**, 2: 424-428, 2000.

SOUZA, J. C. **Manual de Antibióticos Antibacterianos**. Fundação Universidade Fernando Pessoa: Porto 2ª ed., p. 423-482, 2005.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro, 3ª ed., p. 752. Guanabara Koogan, 2002.

STANGHERLIN, E. C.; LUCHESE, C.; ARDAIS, A. P.; NOGUEIRA, C. W. Passive smoke exposure induces oxidative damage in brains of rat pups: Protective role of diphenyl diselenide. **Inhal. Toxicol.**, 21: 868-874, 2009.

STERGIOPOULOU, T.; MELETIADIS, J.; SEIN, T.; PAPAIOANNIDOU, P.; TSIOURIS, I.; ROILIDES, E.; WALSH, T. J. Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **J. Antimicrob. Chemother.**, 63: 343-348, 2009.

STEVENS, D. A.; VO, P. T. Synergistic interaction of trimethoprim and sulfamethoxazole on *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 21: 852-854, 1982.

SUN, S.; LI, Y.; GUO, Q. J.; SHI, C. W.; YU, J. L.; MA, L. *In vitro* interactions between tacrolimus and Azoles against *Candida albicans* determined by different methods. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 52: 409-417, 2008.

TAVARES, W. Azóis antifúngicos. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos. São Paulo, 2ª ed., p. 869-886. Atheneu, 2001.

TERRELL, C.L. Antifungal agents. Part II. The azoles. **Mayo Clinical Proc.**, 74: 78-100, 1999.

THOMPSON, G. R.; WIEDERHOLD, N. P.; VALLOR, A. C.; VILLAREAL, N. C.; LEWIS, J. S.; PATTERSON, T. F. Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for invasive candidiasis secondary to *Candida glabrata* infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 52: 3783-3785, 2008.

TORTORANO, A. M.; PEMAN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; KIBBLER, C. C.; FAURE, O.; BIRAGHI, E.; CANTON, E.; ZIMMERMANN, K.; SEATON, S.; GRILLOT, R. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 23: 317-322, 2004.

TORTORANO, A. M.; KIBBLER, C.; PERNANC, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; GRILLOT, R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, 27: 359-366, 2006.

TRICK, W. E.; FRIDKIN, S. K.; EDWARDS, J. R.; HAJJEH, R. A.; GAYNES, R. P.; NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM HOSPITALS. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. **Clin. Infect. Dis.** 35: 627-630, 2002.

TUMBARELLO, M.; SANGUINETTI, M.; TRECARICHI, E. M.; LA SORDA, M.; ROSSI, M.; DE CAROLIS, E.; DE GAETANO DONATI, K.; FADDA, G.; CAUDA, R.; POSTERARO, B. Fungaemia caused by *Candida glabrata* with reduced susceptibility to fluconazole due to altered gene expression: risk factors, antifungal treatment and outcome. **J. Antimicrob. Agents Chemother.**, 62: 1379-1385, 2008.

VANDEN-BOSSCHE, H.; MARICHAL, P.; ODDS, F. C.; LEJEUNE, L.; COENE, M. C. Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 36: 2602-2610, 1992.

VANDEPUTTE, P.; TRONCHIN, G.; BERGES, T.; HENNEQUIN, C.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J. P. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the ERG6 gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 51: 982-990, 2007.

VANDEPUTTE, P.; TRONCHIN, G.; LARCHER, G.; ERNOULT, E.; BERGÈS, T.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J. P. A nonsense mutation in the ERG6 gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 52: 3701-3709, 2008.

VANDEPUTTE, P.; TRONCHIN, G.; LARCHER, G.; ERNOULT, E.; BERGÈS, T.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J. P. A nonsense mutation in the ERG6 gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 52: 3701-379, 2008.

VAZQUEZ, J. A.; DEMBRY, L. M.; SANCHEZ, V.; VAZQUEZ, M. A.; SOBEL, J. D.; DMUCHOWSKI, C.; ZERVOS, M. J. Nosocomial *Candida glabrata* colonization: an epidemiologic study. **J. Clin. Microbiol.**, 36: 421-426, 1998.

VITALE, R. G.; AFELTRA, J.; MEIS J. F.G. M.; VERWEIJ, P. Activity and post antifungal effect of chlorpromazine and trifluoperazine against *Aspergillus*, *Scedosporium* and zygomycetes. **Mycoses**, 50: 270-276, 2007.

WAHYUNINGSIH, R.; FREISLEBEN, H.; SONNTAG, H.; SCHNTZLER, P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 3016-3021, 2000.

WARNOCK, D. W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. **Jpn. J. Med. Mycol.**, 48: 1-12, 2007.

WILHELM, E. A.; JESSE, C. R.; NOGUEIRA, C. W.; SAVEGNAGO, L. 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, 2009.

WINGARD, J. R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clin. Infect. Dis.**, 20: 115-125, 1995.

WOOD, N. C.; NUGENT, K. M. Inhibitory effects of chlorpromazine on *Candida* species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 27: 69-694, 1985.

WORKOWSKI, K. A.; BERMAN, S. M. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. **MMWR Recomm. Rep.**, 55: 1-95, 2006.

ZARRIN, M.; JAMSHIDIAN, M.; JAFARI, M. *In vitro* interactions of miconazole with sulfametoxazole against *Candida* species. **Pak. J. Med. Sci.**, 25: 243-246, 2009.

ZASSO, F. B. GONCALES, C. E.; JUNG, E. A.; ARALDI, D.; ZENI, G.; ROCHA, J. B.; NOGUEIRA C. W. On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyl diselenide. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 19: 283-289, 2005.

ZEPELIN, M. B.; KUNZ, L.; CHEL, R. R.; REICHARD, U.; WEIG, M.; GROB, U. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. To six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. **J. Antimicrob. Chemother.**, 60: 424-428, 2007.

ZIARRUSTA, G. B. Vulvogaginitis candidiásica. **Rev. Iberoam. Micol.**, 19: 22-24, 2002.