



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

THAÍS CRISTINE PEREIRA

**EFEITO DO CLORIDRATO DE VERAPAMIL, CLORIDRATO
DE FLUOXETINA E PAROXETINA ISOLADOS E
COMBINADOS COM ANFOTERICINA B CONTRA
Cryptococcus neoformans: estudo *in vitro* e *in vivo***

2019

THAÍS CRISTINE PEREIRA

**EFEITO DO CLORIDRATO DE VERAPAMIL,
CLORIDRATO DE FLUOXETINA E PAROXETINA
ISOLADOS E COMBINADOS COM ANFOTERICINA B
CONTRA *Cryptococcus neoformans*: estudo *in vitro* e *in vivo***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia e Imunologia. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Dra. Liliana Scorzoni

São José dos Campos

2019

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Pereira, Thaís Cristine

Efeito do cloridrato de verapamil, cloridrato de fluoxetina e paroxetina isolados e combinados com anfotericina B contra *Cryptococcus neoformans*: estudo in vitro e in vivo. / Thaís Cristine Pereira. - São José dos Campos : [s.n.], 2019.

78 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2019.

Orientadora: Liliana Scorzoni.

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. Anfotericina B. 3. Reposicionamento de fármacos. 4. Sinergismo. I. Scorzoni, Liliana, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Liliana Scorzoni (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Haroldo Cesar de Oliveira

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Instituto Carlos Chagas

Campus de Curitiba, Paraná

São José dos Campos, 27 de maio de 2019.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Flávia Regina Pereira e Paulo Henrique de Sousa Pereira, por todo o amor, carinho e dedicação. Agradeço-lhes por tudo de bom que fizeram por mim e por acreditar em meus sonhos.

À minha família, que está comigo em todos os momentos e etapas da minha vida. Em especial, aos meus avós maternos e paternos, que me dão carinho e muita sabedoria.

Ao meu namorado, Guilherme Henrique Jesus do Prado, pelo carinho, paciência, motivação e por acreditar em meus sonhos. Tê-lo ao meu lado tornou minha caminhada mais tranquila e me deu forças para seguir em frente.

Aos meus amigos, pelo carinho e alegria mesmo nos momentos mais difíceis e por estar comigo nesta etapa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as bênçãos, oportunidades em minha vida, e por me guiar para a realização dos meus sonhos.

Agradeço aos meus pais: Flávia Pereira e Paulo Pereira, que me educaram da melhor forma e me apoiam em todas as minhas decisões. Obrigada por todas as vezes que se esforçaram embaixo de chuva e sol para que eu pudesse ter uma boa educação. Eu amo vocês e prometo sempre ser o orgulho de vocês.

Agradeço ao meu melhor amigo e namorado Guilherme Henrique que é um exemplo de dedicação e garra, que diariamente me ajuda a ser uma pessoa melhor, e está comigo em todos os momentos me inspirando a ir atrás dos meus sonhos.

Agradeço à toda minha família Gomes e Pereira, pelo apoio constante, união e por estar me aplaudindo em todas as minhas decisões e conquistas.

Aos meus amigos de graduação e de profissão. Obrigada pela confiança e pelos momentos maravilhosos.

À minha amiga, Raquel Menezes, que compartilhei todos os momentos deste mestrado e tive a alegria de tê-la trabalhando comigo todos os dias, tornando-os mais alegres.

Às minhas amigas, Maíra Terra Garcia, Cheyenne e Lívia, que me proporcionaram muitos momentos de descontração e risadas maravilhosas. Os

meus dias são melhores com vocês. Vocês são maravilhosas.

À minha amiga Pamela Beatriz, que sempre estava de prontidão para ajudar e dividiu inúmeros momentos comigo, de alegria, aprendizado e superação.

Aos meus amigos Rodnei Rossoni e Felipe Camargo, por estarem sempre dispostos a tirarem minhas dúvidas e me proporcionar momentos de muita alegria no laboratório.

À minha amiga Renata Moraes, por estar sempre disposta a ajudar, me dando apoio e incentivo, agradeço pelos momentos maravilhosos e pela amizade. Você é muito especial.

Agradeço também aos amigos e colegas Luciana, Lucas, Patrícia, Karine, Anderson, Daphne, Keila, Hanna, Damara, Profa. Simone, Janaína, Jéssica, Lucas de Paula, Sabrina, Taciano, pelos maravilhosos momentos e por tornarem os meus dias mais alegres, e também por estarem sempre dispostos a ajudar. Um verdadeiro trabalho em equipe.

Agradeço aos membros da equipe da Seção Técnica de Pós-graduação Sandra, Carolina e Bruno; do Escritório de Apoio à Pesquisa e Internacionalização Michele e Carlos Guedes, também ao técnico André e à secretária Carla por sempre estarem dispostos a solucionar nossas dúvidas, com muita paciência, sendo gentis e atenciosos com todos.

Às Professoras Juliana Campos Junqueira, Luana M. R. de Vasconcellos e Marianne Spalding por serem extremamente atenciosas e sempre se mostrando dispostas a me ajudar.

À Professora Vivian Cristina Costa Castilho Hyodo que é a minha inspiração me ensinou muito durante a minha graduação em Ciências Biológicas, um exemplo de profissional e pessoa amorosa com todos.

À Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, Professora Luciane Dias de Oliveira, que sempre está disposta a fazer o melhor pelos seus alunos e tem um comprometimento muito grande com o Programa. Além de ser uma pessoa admirável e atenciosa e uma profissional exemplar.

À minha orientadora Dra. Liliana Scorzoni, que me ensinou a ser uma profissional e pessoa melhor, sempre muito dedicada e atenciosa. Uma pessoa que carrega consigo otimismo e uma sabedoria imensa. Sempre disposta a ajudar e orienta seus alunos com muito amor.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso”. John Ruskin

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	20
2.1 Objetivo geral	20
2.1.1 Objetivos específicos	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Micro-organismos e condições de cultivo.....	21
3.2 Fármacos não-antifúngicos e o antifúngico AmB	21
3.3 Avaliação da atividade antifúngica dos fármacos <i>in vitro</i>	22
3.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fármacos	22
3.3.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos fármacos	23
3.3.3 Avaliação do efeito combinatório dos fármacos com anfotericina B ..	24
3.3.4 Formação do biofilme de <i>C. neoformans</i>	27
3.3.5 Tratamento do biofilme	28
3.3.6 Avaliação da biomassa pela coloração Cristal Violeta	29
3.3.7 Determinação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)	30
3.3.8 Efeitos dos fármacos isolados e das combinações sinérgicas sobre a cápsula de <i>C. neoformans</i>	31
3.4 Atividade antifúngica <i>in vivo</i> em modelo experimental <i>G. mellonella</i> ...	32
3.4.1 Ensaio de toxicidade dos fármacos	34
3.4.2 Contagem de hemócitos	35
3.4.3 Padronização da dose letal de <i>C. neoformans</i> por ensaio de sobrevivência.....	36

3.4.4 Efeito do tratamento de fármacos isolados e combinados com AmB	
<i>in vivo</i>	36
3.5 Análise estatística	37
4 RESULTADOS	38
4.1 Avaliação dos fármacos não-antifúngicos <i>in vitro</i>	38
4.1.1 Determinação da CIM e CFM dos fármacos	38
4.1.2 Avaliação do efeito combinatório dos compostos com anfotericina B.....	39
4.1.3 Avaliações dos compostos e combinações em biofilme de <i>C. neoformans</i>	41
4.1.4 Quantificação da massa do biofilme a partir da coloração por Cristal Violeta	42
4.1.5 Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).....	45
4.1.6 Efeito dos fármacos isolados e das combinações sinérgicas sobre a cápsula de <i>C. neoformans</i>	48
4.2 Ensaios <i>in vivo</i> em <i>Galleria mellonella</i>	51
4.2.1 Ensaio de toxicidade dos fármacos não-antifúngicos	51
4.2.2 Contagem de hemócitos	51
4.2.3 Determinação da concentração letal de <i>C. neoformans</i>	53
4.2.4 Efeito do tratamento de fármacos isolados e das combinações sinérgicas <i>in vivo</i> em <i>Galleria mellonella</i>	54
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66

Pereira TC. Efeito do cloridrato de verapamil, cloridrato de fluoxetina e paroxetina isolados e combinados com anfotericina B contra *Cryptococcus neoformans*: estudo *in vitro* e *in vivo* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

RESUMO

Cryptococcus neoformans são leveduras que acometem principalmente indivíduos imunocomprometidos, podendo causar a meningoencefalite dependendo do estado imunológico do hospedeiro. Os tratamentos convencionais têm enfrentado grandes desafios. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos antifúngicos dos fármacos cloridrato de verapamil (CV), cloridrato de fluoxetina (CF) e cloridrato de paroxetina (CP) isolados e combinados com anfotericina B (AmB) contra *C. neoformans*. Foram determinados os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) de acordo com a técnica de microdiluição em caldo proposta pelo Comitê Europeu de Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST). Posteriormente, foi avaliada a atividade sinérgica dos fármacos combinados com AmB (EUCAST). Os efeitos das CIMs e das concentrações sinérgicas selecionadas foram avaliados em biofilmes, quantificando a biomassa por cristal violeta e sua viabilidade por contagem de colônias (UFC/mL). Além disso, foram analisados os efeitos dos mesmos na cápsula induzida desta levedura. Os ensaios *in vivo* foram realizados em *Galleria mellonella* avaliando a toxicidade dos compostos e a eficácia por análise de curva de sobrevivência e também o efeito em concentração de hemócitos. Os fármacos CV, CF e CP apresentaram valores de CIM de 113, 9,6 e 41 µg/mL, respectivamente, e quando combinados com AmB resultaram em vinte concentrações sinérgicas, e uma concentração de cada combinação foi eleita para os ensaios seguintes. CV reduziu a biomassa do biofilme em até 38%, já CF e CP reduziram a biomassa de 22-30% quando isolados, e as combinações reduziram até 35 % da biomassa. O CP diminuiu a viabilidade do biofilme em até 25 % e quando o CF e CP foram combinados com AmB a redução chegou a 11 %. Além disso, todos os fármacos isolados e combinados reduziram o tamanho da cápsula da levedura, de 48-72 %. Em *G. mellonella* os fármacos não apresentaram toxicidade, eficácia ou ação na concentração de hemócitos. Assim, os fármacos avaliados apresentaram potencial antifúngico frente *C. neoformans* em todos os ensaios *in vitro*, podendo ser considerados novas alternativas para o tratamento destes patógenos.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*. Anfotericina B. Reposicionamento de fármacos. Sinergismo.

Pereira TC. Effect of verapamil hydrochloride, fluoxetine hydrochloride and paroxetine alone and combined with amphotericin B against Cryptococcus neoformans: in vitro and in vivo study [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans are yeasts that mainly affect immunocompromised individuals, and may cause meningoencephalitis depending on the immunological state of the host. Conventional treatments have faced major challenges. Verapamil hydrochloride (CV), fluoxetine hydrochloride (CF) and paroxetine hydrochloride (CP) were isolated and combined with amphotericin B (AmB) against C. neoformans. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and minimum Fungicidal Concentration (CFM) values were determined according to the broth microdilution technique proposed by the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Subsequently, the synergistic activity of drugs combined with AmB (EUCAST) was evaluated. The effects of MICs and selected synergistic concentrations were evaluated in biofilms, quantifying the biomass by violet crystal and its viability by colony-forming unit analysis (CFU / mL). In addition, the effects of the same in the induced capsule of this yeast were evaluated. In vivo assays were performed in Galleria mellonella evaluating the toxicity of the compounds and the efficacy by analysis of survival curve and also the effect on hemocyte concentration. The CV, CF and CP drugs had MIC values of 113, 9.6 and 41 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively, and when combined with AmB resulted in twenty synergistic concentrations, and a concentration of each combination was chosen for the following trials. CV reduced biofilm biomass to 38%, while CF and CP reduced biomass to 22-30% when isolated, and combinations reduced to 35% of biomass. CP decreased biofilm viability to 25% and when CF and CP were combined with AmB the reduction reached to 11%. In addition, all drugs isolated and combined reduced the size of the yeast capsule to 48-72%. In G. mellonella the drugs did not present toxicity, efficacy or action in the concentration of hemocytes. We suggest that the liposolubility of the compounds has been a limiting factor in vivo analyzes. Thus, the evaluated drugs presented antifungal potential against C. neoformans in all in vitro assays, and could be considered new alternatives for the treatment of these pathogens.

Keywords: Cryptococcus neoformans. Amphotericin B. Repositioning of drugs. Synergism.

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas invasivas aumentaram significativamente nas últimas décadas (Spitzer et al., 2017). Entre as causas dessa alta incidência está o aumento de pacientes imunocomprometidos, como os portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e indivíduos que passaram por tratamentos quimioterápicos ou transplante de órgãos (Richardson, Lass-Flörl, 2008; Spitzer et al., 2017). Cerca de 90 % das mortes associadas a doenças fúngicas estão relacionadas com infecções causadas pelos gêneros *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e *Pneumocystis* (Brown et al., 2012).

O gênero *Cryptococcus* é composto por leveduras as quais podem ser encontradas em fontes ambientais e no trato gastrointestinal de alguns animais, como por exemplo de pombos, além de estar presente em solo contaminado com excretas dos mesmos (Casadevall, Perfect, 1998). As espécies *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* podem causar infecções em humanos, acometendo principalmente indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos, respectivamente (Wilson, 1957; Mitchell, Perfect, 1995; Casadevall, Perfect, 1998; Lester et al., 2011). Anualmente, são diagnosticados aproximadamente 200.000 casos de meningite causadas por *Cryptococcus* spp., e os tratamentos convencionais utilizados vem enfrentando grandes desafios devido à alta toxicidade e limitações farmacocinéticas (Afeltra, Verweij, 2003; Day et al., 2013; Jarvis et al., 2014; Agostinho et al., 2018) .

As infecções causadas por *Cryptococcus* spp. ocorrem por inalação de leveduras ou esporos que atingem os pulmões causando primeiramente a pneumonia, podendo evoluir para meningoencefalite dependendo do estado imunológico do hospedeiro (Khawcharoenporn et al., 2007; Harris et al., 2013; Coelho et al., 2014).

Essa levedura possui diferentes fatores de virulência que auxiliam na manutenção da infecção e também na resistência ao sistema imune (Vidotto et al., 1996; Archer, Peberdy, 1997). As leveduras são intracelulares facultativas, e podem realizar suas atividades metabólicas dentro de células fagocíticas e resistir a fagocitose (Alvarez, Casadevall, 2006, 2007). Para dificultar o reconhecimento pelo sistema imunológico, *C. neoformans* possui a cápsula polissacarídea que auxilia na infecção e dificulta também a fagocitose devido ao aumento capsular durante a infecção em mamíferos (Cross, Bancroft, 1995; Rivera et al., 1998; Rakesh et al., 2008).

A produção de melanina também é um fator de virulência importante na proteção das leveduras contra ao sistema imune do hospedeiro e ao estresse oxidativo, causado por altas temperaturas, raios UV e medicamentos antifúngicos. Além desses mecanismos de defesa citados, a levedura pode interferir no processo de fagocitose e se proteger de radicais livres e agentes antimicrobianos, pois possui a capacidade de formar células gigantes (Wang, Casadevall, 1994; Casadevall et al., 2000; Van Duin et al., 2002; Okagaki et al., 2010; Zaragoza et al., 2010). Além disso, *C. neoformans* é capaz de produzir e liberar enzimas que degradam as células hospedeiras, como por exemplo as proteases, fosfolipases e DNases (Vidotto et al., 1996; Archer, Peberdy 1997).

A formação de biofilme também é um dos fatores de virulência de *C. neoformans*, pois contribui no aumento da resistência aos antifúngicos e ao sistema imune do hospedeiro (Martinez, Casadevall, 2006; Ramage, Williams, 2013). A formação do mesmo se dá pela liberação do polissacarídeo glucuronoxilomanana (GXM) nos tecidos durante a infecção fúngica e podem formar-se em equipamentos médicos protéticos no tratamento de meningoencefalite criptocócica (Martinez, Casadevall, 2005, 2007). Estudos mostraram que os biofilmes de *Cryptococcus* spp. são resistentes aos fármacos fluconazol e voriconazol, e suscetível a anfotericina B (AmB) quando

administrada em doses acima das consideradas terapêuticas, gerando um quadro de toxicidade e ao surgimento de cepas mais resistentes aos antifúngicos convencionais (Fanning, Mitchell, 2012; Delattin et al., 2014).

Além do aumento na incidência das infecções fúngicas e relatos de resistência aos antifúngicos, os medicamentos disponíveis estão limitados e apresentam alta toxicidade a qual pode ser explicada pela semelhança entre as células fúngicas e humanas (Bicanic, Harrison, 2004; Arendrup 2014; Liu et al., 2014). Assim, a busca por alternativas de tratamentos antifúngicos tornou-se imprescindível.

O tratamento recomendado para criptococoses é realizado com AmB, administrada pelo menos por duas semanas. Também pode-se utilizar a associação de AmB e flucitosina no mesmo período, já para os casos mais graves os tratamentos são realizados com fluconazol por pelo menos oito semanas. O recurso terapêutico varia de acordo com a gravidade do paciente e geralmente possui custo elevado o que dificulta a acessibilidade dos mesmos (Perfect, Cox, 1999; Merry, Boulware, 2016).

A AmB possui a capacidade de se ligar ao ergosterol e causar poros na membrana celular fúngica e consequentemente a perda do conteúdo intracelular alterando a permeabilidade da mesma (Zaragoza et al., 2005; Santos et al., 2012). A flucitosina é um análogo das pirimidinas e age inibindo a síntese de ácidos nucleicos do fungo, já o fluconazol e outros azóis, causam o rompimento das membranas fúngicas devido a interrupção na síntese de ergosterol (Santos et al., 2012).

O tratamento com AmB pode causar aos pacientes quadros de disfunções renais, febres, dores de cabeça e até convulsões, e quando o tratamento é realizado com flucitosina em concentrações altas pode causar náuseas, vômitos, e problemas hematológicos (Benson, Nahata, 1988; Hamill, 2013; Vidal et al., 2016).

A busca por alternativas de tratamento para a criptococose tem sido pesquisada por vários autores (Cruz et al., 1994; Liu et al., 2016; Ogundeji et al., 2016; Joffe et al., 2017). Diferentes estratégias para evitar e combater as infecções fúngicas, como por exemplo a imunoterapia e uso de vacinas em grupos considerados de risco, modificações moleculares nos compostos convencionalmente utilizados, combinações de compostos com atividade sinérgica e o reposicionamento de fármacos, tem apresentado resultados promissores no combate as infecções fúngicas (Oliveira et al., 2014; Gu et al., 2016; Liu et al., 2016; Scorzoni et al., 2017).

As combinações entre compostos têm sido descritas como alternativa terapêutica promissora. Com uso sinérgico de fármacos é possível diminuir as doses e seus efeitos tóxicos, além de aumentar a eficácia do tratamento e diminuir a possibilidade de resistência antimicrobiana (Azevedo et al., 2015; Liu et al., 2014). Um estudo realizado por Sangalli et al. (2016), avaliou a atividade sinérgica da pedalitina e anfotericina B e mostrou que essa combinação pode ser uma boa opção para o tratamento contra *C. neoformans* (Sangalli-Leite et al., 2016). Portanto, são necessários mais estudos envolvendo sinergismos, a fim de identificar com maior precisão a eficácia dos tratamentos sinérgicos (Santos et al., 2012).

Em relação ao reposicionamento, ou reutilização de fármacos, para o tratamento de outras doenças, oferece vantagens em comparação ao desenvolvimento de novos fármacos para tratamento de doenças fúngicas, entre essas a criptococose, isso porque os estudos envolvendo essa alternativa baseia-se em toxicologia e farmacologia já estabelecidas (Katragkou et al., 2016). Além disso, o desenvolvimento de fármacos é um processo longo e com altos custos (Oprea, Mestres, 2012; Katragkou et al., 2016) . A agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos “Administração de Alimentos e Medicamentos” (Food and Drug Administration - FDA) aprovou

a reutilização de medicamentos existentes para a aplicação contra infecções fúngicas (Holbrook et al., 2017).

Estudos mostraram que fármacos utilizados para outras enfermidades como estratégia no tratamento de doenças fúngicas, podem apresentar atividade antifúngica de amplo espectro podendo ser utilizados sozinhos ou em combinação com antifúngicos convencionais (Afeltra, Verweij, 2003). Por exemplo, o composto mebendazol, que é um anti-helmíntico, possui atividade frente a *C. neoformans* e *C. gattii* causando alterações morfológicas e é uma alternativa promissora (Cruz et al., 1994; Joffe et al., 2017).

O bloqueador dos canais de cálcio, cloridrato de verapamil, tem sido estudado no gênero *Candida*. Yu et al. (2013) reportaram que este fármaco possui atividade antifúngica isolado e combinado com fluconazol ou tunicamicina em biofilmes de *C. albicans* e relata que o fármaco pode ser uma alternativa para aumentar a eficácia de antifúngicos contra os biofilmes (Yu et al., 2013). Em outro estudo, Yu et al. (2014) identificaram que a ação antifúngica desse fármaco se dá pela capacidade do mesmo inibir o desenvolvimento de hifas, adesão e colonização gastrointestinal, e sugere que o cloridrato de verapamil pode ser considerado uma alternativa para a terapia antifúngica contra a espécie *C. albicans* (Yu et al., 2014). Estudos envolvendo o cloridrato de verapamil frente às outras leveduras, como *Cryptococcus* spp. não estão bem descritos na literatura.

Os Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina (ISRS) estão sendo estudados para o tratamento das candidoses (Lass-Flörl et al., 2002; Zhai et al., 2012; Oliveira et al., 2014; Costa et al., 2017). Estudos mostraram que os ISRS (sertralina, fluoxetina e paroxetina) possuem atividade antifúngica frente leveduras de *Candida* spp. , e o fármaco fluoxetina reduz o biofilme maduro da espécie, além disso, a combinação de fluconazol e fluoxetina resulta em atividade sinérgica contra *Candida* spp. mostrando que os ISRS podem ser uma alternativa promissora no tratamento de infecções fúngicas (Oliveira et al., 2014; Costa et al.,

2017). Porém, até o momento não há relatos da atividade antifúngica dos ISRS (cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina) frente leveduras de *Cryptococcus* spp.

Esses estudos realizados *in vitro* são necessários pois proporcionam conhecimentos indispensáveis sobre os fármacos que serão estudados, porém é importante avaliar os mesmos em organismos complexos, realizando os ensaios *in vivo* (Scorzoni et al., 2016).

O modelo *in vivo* *Galleria mellonella* é considerado um modelo de infecção experimental confiável (Junqueira, 2012; Maekawa et al., 2015). Seu ciclo de vida inclui os estágios larvais e pupal antes da transformação final, sendo o invertebrado normalmente utilizado em estudos no último estágio larval (Fuchs et al., 2010; Trevijano-Contador, Zaragoza, 2014). O sistema imunológico de *G. mellonella* compartilha alto grau de similaridade com o sistema de defesa dos vertebrados, possuindo a imunidade celular e humoral interligadas, beneficiando os estudos envolvendo virulência de patógenos bacterianos e fúngicos (Lionakis, 2011; Pereira MF et al., 2015; Pereira T et al., 2018).

Mylonakis et al. (2005) relataram que *C. neoformans* é capaz de infectar *G. mellonella* e essas leveduras se proliferam dentro da hemolinfa matando a larva. O resultado do tratamento com antifúngicos nesse modelo possui correlação com o que é observado em mamíferos (Mylonakis et al., 2005). O aumento de sobrevivência das larvas foi relatado quando as mesmas foram infectadas com *C. neoformans* e receberam doses sinérgicas de pedalitina e AmB (Sangalli-Leite et al., 2016). Em outro estudo, foi reportado que os biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii* foram mais virulentos em relação às células planctônicas em *G. mellonella*, podendo compreender melhor a interação das leveduras em modelo alternativo *in vivo* (Benaducci et al., 2016). Firacative et al. (2014) identificaram que o tamanho da cápsula de *C. gattii* aumentaram consideravelmente em *mellonella*, portanto, a infecção de *Cryptococcus* spp. no modelo mencionado

possui diversas semelhanças com o que ocorre em mamíferos (Mylonakis et al., 2005; Firacative et al., 2014).

Dessa forma, acredita-se que a descoberta de novos fármacos que possuem atividades antifúngicas isolados ou em combinação com outros fármacos é de extrema importância para futuros tratamentos das infecções causadas por *C. neoformans*, e os estudos *in vitro* e *in vivo* em *G. mellonella* determinam a efetividade dos fármacos no modelo em estudo (Mylonakis et al., 2005; Kavanagh, Sheehan, 2018).

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica dos fármacos: cloridrato de verapamil, cloridrato de fluoxetina, e cloridrato de paroxetina isolados e combinados com anfotericina B frente leveduras de *C. neoformans* e analisar o efeito desses fármacos, *in vitro* e *in vivo* em modelo invertebrado *G. mellonella*.

2.1.1 Objetivos específicos

- a) avaliar a atividade dos fármacos: cloridrato de verapamil, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina frente a *C. neoformans* pela técnica de microdiluição em caldo e as concentrações fungicidas mínimas dos mesmos, mediante de técnicas adaptadas e padronizadas baseadas no Comitê Europeu de Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST);
- b) avaliar a atividade antifúngica desses fármacos buscando atividade sinérgica quando combinados com anfotericina B;
- c) analisar os efeitos dos fármacos isolados e da combinação sinérgica em biofilmes e cápsulas de *C. neoformans*;
- d) investigar a toxicidade, eficácia e efeito na concentração hemocitária dos fármacos isolados e das combinações sinérgicas em modelo *G. mellonella*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos e condições de cultivo

Para a realização dos ensaios, foi utilizada a cepa de referência ATCC (The American Type Culture Collection) de *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90112) e a cepa de *Cryptococcus neoformans* H99 (ATCC 208821) para as análises de cápsulas, e como controle nos testes de microdiluição em caldo, foi utilizada a cepa *Candida krusei* ATCC 6258. Todas provenientes do laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista (ICT/UNESP) de São José dos Campos-SP. Todos os micro-organismos foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose.

Cryptococcus neoformans foi incubado por 48 h a 30 °C e *C. krusei* por 24 h a 37 °C antes dos experimentos. Durante os ensaios as incubações foram realizadas a 37 °C para todos os micro-organismos.

3.2 Fármacos não-antifúngicos e o antifúngico AmB

Para a avaliação da atividade antifúngica foram utilizados os fármacos cloridrato de verapamil (FRAGON, Itália), cloridrato de fluoxetina (FRAGON, Itália) e cloridrato de paroxetina (INFINITY Pharma, Hong Kong). O antifúngico anfotericina B (Sigma-Aldrich), foi utilizado como controle em todos os experimentos, além de ser utilizado nos ensaios sinérgicos. Todos os fármacos foram obtidos comercialmente.

3.3 Avaliação da atividade antifúngica dos fármacos *in vitro*

3.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fármacos

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima, os testes foram realizados pela técnica de microdiluição em caldo de acordo com Comitê Europeu de Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST), com algumas modificações (EUCAST 2017).

Os fármacos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), posteriormente os mesmos foram diluídos na concentração de 1.000 μM em meio de cultura RPMI -1640 (com L-glutamina, pH 7,0, sem bicarbonato de sódio) e acrescido de 2 % de glicose tamponado com ácido 3- (N- morfolino) propanossulfônico (MOPS) 0,165 M.

Foram realizadas diluições seriadas de 100 μL de cada fármaco em placas de 96 poços, e as concentrações finais podem ser observadas no quadro 1.

Como controle desse experimento foi utilizada AmB nas concentrações: 8 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,12 $\mu\text{g/mL}$, 0,06 $\mu\text{g/mL}$ e 0,03 $\mu\text{g/mL}$.

Quadro 1 - Diluições seriadas dos fármacos

FÁRMACOS	DILUIÇÕES DOS FÁRMACOS										
Cloridrato de verapamil	$\mu\text{g/mL}$	227	113	56,7	28,3	14	7	3,5	1,7	0,8	0,4
Cloridrato de fluoxetina	$\mu\text{g/mL}$	154	77	38	19	9,6	4,8	2,4	1,2	0,6	0,3
Cloridrato de paroxetina	$\mu\text{g/mL}$	164	82	41	20	10	5	2,5	1,2	0,6	0,3

Fonte: Elaborado pela autora.

Após as diluições seriadas dos fármacos, a suspensão fúngica foi preparada. Para isso, *C. neoformans* foi cultivado em caldo Sabouraud a 30 °C por 48 h, com agitação de 150 rotações por minuto (rpm). Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 rpm por 5 min, lavadas três vezes com tampão fosfato-salino (PBS), padronizada a $2,5 \times 10^5$ células/mL e preparada em RPMI 1640 (com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose) tamponado com MOPS 0,165 M, pH 7,0.

Foram acrescentados 100 µL de inóculo $2,5 \times 10^5$ células/mL (5×10^4 células/poço) em cada poço da placa de 96 poços e incubada na estufa a 37 °C com agitação por 48 h. A levedura *C. krusei* ATCC 6258 foi utilizada como controle do experimento, como preconizado pelo protocolo do EUCAST.

Os resultados foram analisados por leitura visual e espectrométrica a 530 nanômetros (nm) após o período de incubação. A CIM foi considerada a menor concentração em que se observou ausência de turbidez indicando inibição do crescimento fúngico, como observa-se na figura 1A. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

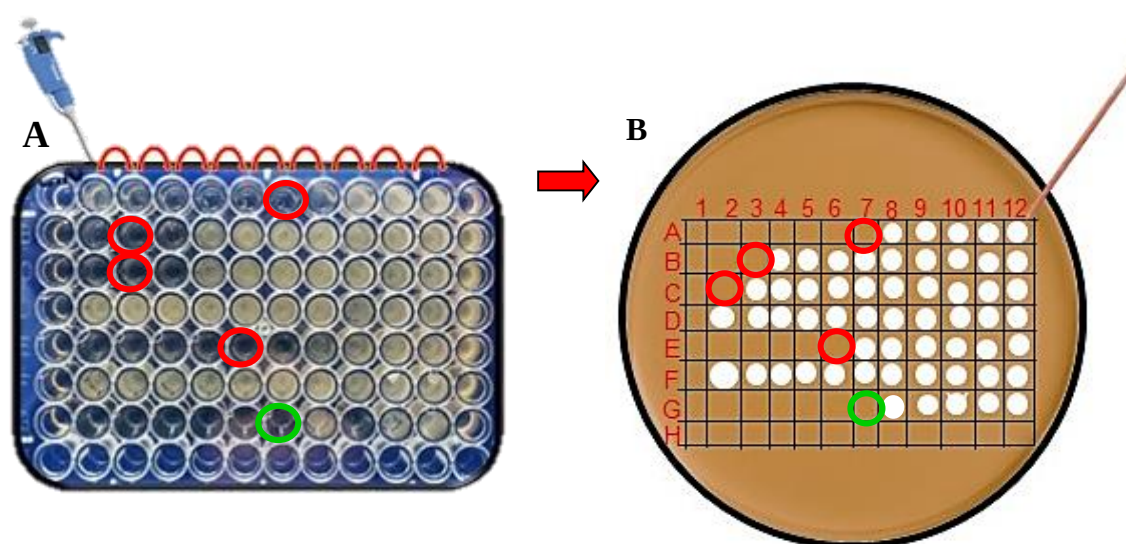
3.3.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos fármacos

Para o ensaio de CFM, placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose foram previamente demarcadas de acordo com as posições das diluições dos fármacos e os controles presentes na placa de 96 poços.

Após o tempo necessário de incubação para os testes de microdiluição, uma alíquota de cada um dos 96 poços da placa de microdiluição foi retirada com o auxílio de um palito de madeira estéril e colocada em ágar Sabouraud nas placas

previamente demarcadas. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e após este período foi observado o crescimento ou não de colônias e as respectivas concentrações, como demonstrado na figura 1B. A CFM é determinada pela menor concentração onde não se observa o crescimento de colônias.

Figura 1 – Representação do procedimento para determinação da CIM e CFM dos fármacos



Legenda: A) representa o ensaio de microdiluição em caldo onde os círculos vermelhos indicam a CIM dos fármacos não-antifúngicos. B) representa o ensaio de CFM dos mesmos. Em ambas imagens os círculos verdes representam a CIM e CFM da AmB, respectivamente.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.3.3 Avaliação do efeito combinatório dos fármacos com anfotericina B

A atividade sinérgica dos fármacos foi avaliada pela técnica “tabuleiro de xadrez”. A técnica é baseada no teste de sensibilidade por microdiluição em caldo preconizada pelo EUCAST (EUCAST 2017). O meio de cultura RPMI 1640 (com

L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose) tamponado com MOPS 0,165M, pH 7,0 foi utilizado no ensaio.

Os fármacos foram adicionados nas placas em concentrações quatro vezes maiores em relação ao valor da concentração final e foram realizadas diluições seriadas. Em relação ao antifúngico anfotericina B, o mesmo já estava diluído em diferentes concentrações e foi adicionado nas placas em concentrações quatro vezes maiores à concentração final desejada.

Para isso, na coluna 1 de A a D, foi adicionado 200 µL de RPMI, como controle negativo, e na mesma coluna, de E a H, foi adicionado 100 µL de RPMI juntamente com 100 µL de suspensão fúngica padronizada em $2,5 \times 10^5$ células/mL, como controle positivo. Na fileira H, foi acrescentado o fármaco não antifúngico (1), nos poços 2 ao 11, e realizado diluições seriadas de 100 µL. O mesmo ocorreu na fileira 12 (de A a H), porém utilizando o antifúngico AmB (2). Nas fileiras de A a G, foram colocados 50 µL do fármaco 1 em diluições seriadas (cada fileira uma diluição). Nas colunas de 2 ao 11, de A a G, foi adicionado 50 µL do fármaco 2 onde cada coluna havia uma concentração diferente, o fármaco 2 foi previamente preparado nas todas concentrações desejadas. Portanto, na placa pode-se observar a inibição do crescimento de *C. neoformans* frente a dois fármacos isolados e combinados.

No quadro 2, pode-se observar a disposição dos fármacos e as concentrações finais dos mesmos na placa. A concentração da suspensão fúngica foi padronizada em $2,5 \times 10^5$ células/mL em meio RPMI 1640, conforme o item 3.3.1. Foram colocados 100 µL de inóculo em todos os poços, exceto no controle negativo da coluna 1 de A a D. As placas foram incubadas a 37° C por 48 h, com agitação de 150 rpm. Após o período de incubação, foram analisadas por leitura visual e espectrométrica a 530 nm. O resultado do experimento é a menor concentração de cada fármaco, que inibiu o crescimento fúngico, representado por ausência de turbidez.

Quadro 2 - Esquema de combinação do fármaco 1 (cloridrato de paroxetina) e fármaco 2 (anfotericina B) na placa de 96 poços, simulando a técnica “tabuleiro de xadrez” (EUCAST, 2017)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+	41 2	41 1	41 0,5	41 0,25	41 0,125	41 0,06	41 0,03	41 0,01	41 0,005	41 0,005	4
B	C+	20,5 2	20,5 1	20,5 0,5	20,5 0,25	20,5 0,125	20,5 0,06	20,5 0,03	20,5 0,01	20,5 0,005	20,5 0,005	2
C	C+	10,2 2	10,2 1	10,2 0,5	10,2 0,25	10,2 0,125	10,2 0,06	10,2 0,03	10,2 0,01	10,2 0,005	10,2 0,005	1
D	C+	5,1 2	5,1 1	5,1 0,5	5,1 0,25	5,1 0,125	5,1 0,06	5,1 0,03	5,1 0,01	5,1 0,005	5,1 0,005	0,5
E	C-	2,5 2	2,5 1	2,5 0,5	2,5 0,25	2,5 0,125	2,5 0,06	2,5 0,03	2,5 0,01	2,5 0,005	2,5 0,005	0,25
F	C-	1 2	1 1	1 0,5	1 0,25	1 0,125	1 0,06	1 0,03	1 0,01	1 0,005	1 0,005	0,125
G	C-	0,5 2	0,5 1	0,5 0,5	0,5 0,25	0,5 0,125	0,5 0,06	0,5 0,03	0,5 0,01	0,5 0,005	0,5 0,005	0,06
H	C-	164	82	41	20,5	10,2	5,1	2,5	1	0,5	0,25	0,45

Legenda: Esquema representativo em cores, onde o fármaco 1 e suas concentrações estão representados pela cor azul, e o fármaco 2 e suas concentrações pela cor vermelha. O controle positivo está representado pelo C+ e o negativo pelo C-.

Fonte: Elaborado pela autora.

Para avaliar o efeito sinérgico dos fármacos, foi adotado o índice de concentração inibitória fracionária (ICIF), que classifica as combinações em sinérgicas, aditivas, indiferente ou antagônicas. O ICIF é calculado através da soma da concentração inibitória fracionada (CIF) do composto 1 mais a CIF do composto 2.

A ICIF pode ser definida como:

$$\frac{\text{CIM combinada}}{\text{CIM fármaco 1 isolado}} + \frac{\text{CIM combinada}}{\text{CIM fármaco 2 isolado}}$$

Uma combinação foi considerada sinérgica a uma ICFI $\leq 0,5$, aditiva quando ICFI é $>0,5$ e $\leq 1,0$, indiferente quando ICFI > 1 e ≤ 4 e antagonista em ICFI $> 4,0$. A mesma fórmula foi utilizada para calcular o índice de concentração fungicida fracionária (ICFF), usando valores CFM em vez de CIM (Odds, 2003).

3.3.4 Formação do biofilme de *C. neoformans*

Os biofilmes foram formados de acordo com Martinez, Casadevall (2006), com algumas modificações (Martinez, Casadevall, 2006). A suspensão fúngica foi preparada em caldo Sabouraud, incubada a 30 °C por 48 h, com agitação de 150 rpm. Após o período de incubação, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas três vezes com PBS e a concentração de 10^8 células/mL foi padronizada com o auxílio da Câmara de Neubauer e preparada em meio RPMI 1640 (com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose) tamponado com MOPS 0,165 M, pH 7,0.

Para a formação do biofilme, foram adicionados 100 μ L da suspensão fúngica de 10^8 células/mL em poços individuais de poliestireno em placas de 96 poços (N=10/grupo). Posteriormente as placas foram incubadas a 37 °C sem agitação por um período de 5 h (pré-adesão), em seguida foi trocado o meio de cultura dos poços. As placas foram incubadas novamente por 48 h e a cada 24 h ocorreu a troca do meio de cultura para manter os nutrientes necessários para as células.

Após este período de incubação, os poços foram lavados três vezes com PBS para a remoção de leveduras não aderentes. Células que permanecerem aderidas à superfície foram consideradas verdadeiros biofilmes.

3.3.5 Tratamento do biofilme

Após o período de 48 h de incubação do biofilme, o mesmo foi tratado por 24 h com 100 µL dos fármacos isolados cloridrato de verapamil, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina nos valores de CIM (1 x CIM) e duas vezes a CIM (2 x CIM), e tratados com duas vezes as combinações sinérgicas eleitas destes fármacos juntamente com anfotericina B (2 x fármaco 1 e AmB). O valor de CIM dos fármacos isolados foi obtido no ensaio de CIM realizado anteriormente, já as concentrações sinérgicas foram determinadas de acordo com o resultado obtido no ensaio do efeito combinatório dos compostos com anfotericina B. Todos os ensaios foram realizados com n=10.

Foram incluídos neste ensaio os controles de esterilidade (controle negativo) utilizando meio de cultura sem acréscimo de fungo, e biofilmes sem tratamento (controle positivo).

O efeito dos fármacos isolados e das combinações na biomassa do biofilme foi quantificado a partir da coloração por Cristal Violeta, e o efeito na viabilidade do biofilme a partir da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

3.3.6 Avaliação da biomassa pela coloração Cristal Violeta

A quantificação da biomassa do biofilme de *C. neoformans* foi avaliada pela coloração por Cristal Violeta conforme Mowat et al. (2007), com algumas modificações (Mowat et al., 2007).

Os biofilmes foram formados em meio RPMI 1640 (com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose) tamponado com MOPS 0,165M, pH 7,0, em placas de 96 poços por 48 h sem agitação, conforme o item 3.3.4. A seguir, os biofilmes formados foram incubados com os tratamentos por 24 h.

Após o período de tratamento do biofilme, os fármacos foram retirados dos poços e os mesmos foram lavados três vezes com PBS para remoção de células não aderentes. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de etanol absoluto por 20 min para fixação dos mesmos. Em seguida o etanol foi retirado e a placa incubada a 37 °C por 24 h para secagem total. Após este período, foi adicionado 100 µL do corante Cristal Violeta a 0,5 % por 15 min. O corante foi retirado e os poços lavados novamente para retirar o excesso de coloração, os biofilmes foram descorados pela adição de 100 µL de etanol absoluto e homogeneizados gentilmente com pipeta por 1 min.

Por fim, as soluções dos poços foram transferidas para nova placa de 96 poços e lida no espectrofotômetro a 570 nm. As densidades ópticas (DOs) foram proporcionais à quantidade de biomassa do biofilme, compreendida pelo material extracelular.

Como controles deste ensaio, foram utilizados biofilmes sem tratamento, e poços contendo somente os meios de cultura (controle de esterilidade).

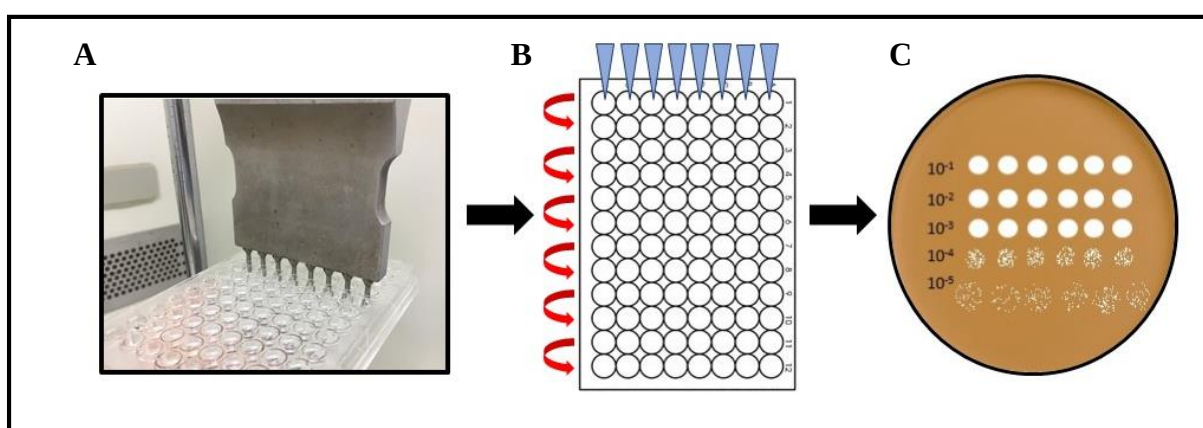
3.3.7 Determinação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)

Após o período de incubação do tratamento do biofilme, conforme o item 3.3.5, os poços foram lavados três vezes com PBS. Em seguida, foi utilizado o homogeneizador ultra-sônico (Sonics Vibra Cell, Connecticut, USA) com potência de 50 W, por 20 s nos poços para dispersão das células aderidas nos poços, como demonstrado na figura 2A.

Foram realizadas diluições decimais das suspensões dos biofilmes utilizando PBS (Figura 2B), e posteriormente as mesmas foram semeadas (5 μ L) com $n = 6$, em placas contendo ágar Sabouraud dextrose.

As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e as colônias foram contadas para determinação das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), representado na figura 2C.

Figura 2 - Representação do ensaio de UFC



Legenda: A) demonstra a utilização do homogeneizador ultra-sônico para a dispersão das células dos biofilmes. B) representa o método utilizado para realizar as diluições decimais em placas de 96 poços. C) ilustra as placas com as UFCs em diluições seriadas após serem incubadas por 48 h a 37 °C.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.3.8 Efeitos dos fármacos isolados e das combinações sinérgicas sobre a cápsula de *C. neoformans*

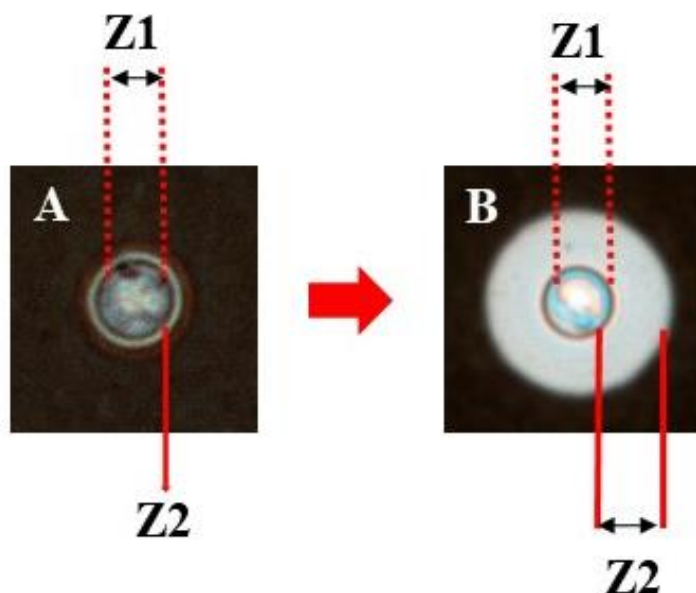
Cryptococcus neoformans cepa H99 (ATCC 208821) passou por procedimento de indução da cápsula de acordo com protocolo descrito por Zaragoza e Casadevall (2004). Para isso *C. neoformans* foi cultivado em 10 mL de meio Sabouraud com agitação (150 rpm) por 48 h a 30 °C. Após a incubação, as células foram coletadas por centrifugação, por 5 min a 5000 rpm, lavadas três vezes com PBS e padronizadas em 5×10^6 células/mL. Após a padronização, as células foram incubadas em tubos de 1,5 mL, contendo 1000 µL do meio de indução de cápsula (Sabouraud diluído 1/10 em 50 mM de MOPS, pH 7,3), por 24 h a 37 °C.

Posteriormente, as células com as cápsulas induzidas receberam o tratamento com as concentrações sub-inibitórias relacionadas as CIMs dos fármacos isolados, e com as três concentrações sinérgicas selecionadas. Como controle, foi utilizada células com as cápsulas induzidas sem tratamento, e células sem indução de cápsula. O tratamento foi realizado por 24 h com agitação, a 37 °C. Para a análise, as células foram coradas por Tinta da China (Nankin, Acrilex) e analisadas com o auxílio do microscópio óptico (Zeiss, Germany) com o aumento de 400 vezes.

O tamanho da cápsula foi calculado utilizando o Software ImageJ, para isso foram medidos o corpo da célula juntamente com a cápsula das células que sofreram indução da mesma, e posteriormente somente o corpo da célula. Nas figuras 3A e 3B é possível observar as zonas de medidas citadas.

Após as medições foi realizada a subtração desses dois valores, obtendo o valor referente ao tamanho da cápsula da levedura.

Figura 3 - Esquematização da indução de cápsula e o corpo celular de *C. neoformans*



Legenda: A) *C. neoformans* sem indução de cápsula. B) *C. neoformans* após indução da cápsula. Z1= corpo da célula. Z2= somente a cápsula.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.4 Atividade antifúngica *in vivo* em modelo experimental *G. mellonella*

As larvas de *G. mellonella* utilizadas nesse estudo foram cultivadas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia/ UNESP São José dos Campos –SP como descrito por Jorjão et al. (2017). Para os experimentos foram utilizadas *G. mellonella* em último estágio larval com peso corporal de 250-300 mg e sem alterações de cor.

Foram utilizadas 10 larvas para cada grupo e as mesmas foram armazenadas em placas de Petri uma noite anterior aos experimentos e incubadas a 37 °C, com ausência de luz e sem alimentação, como pode ser observado na figura 4.

Figura 4 - Incubação das larvas em placas de Petri antes dos experimentos, protegidas da luz e sem alimentação



Fonte: Elaborado pela autora.

Antes de iniciar os experimentos, as regiões das *prolegs* foram limpas com etanol 70 % e a seringa de precisão (Hamilton Inc., EUA) foi utilizada a realização das inoculações, conforme a figura 5.

Os grupos controles foram as larvas sem manuseio e injetadas com PBS.

Figura 5 - Demonstração da inoculação utilizando a seringa Hamilton Inc., EUA, na *proleg* da larva



Fonte: Elaborado pela autora.

3.4.1 Ensaio de toxicidade dos fármacos

Para o ensaio de toxicidade dos fármacos, os três fármacos foram utilizados: cloridrato de verapamil, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina.

Cada fármaco foi diluído em DMSO na concentração inicial de 400 mg/mL, e posteriormente as concentrações desejadas foram transformadas em doses de acordo com o peso das larvas. A partir dessa concentração inicial, cada fármaco foi preparado nas concentrações finais correspondentes a 1 x CIM, 2 x CIM, 3 x CIM e diluído em PBS em tubos de 1,5 ml.

Após a preparação dos fármacos, as larvas receberam 10 μ L das

concentrações na última *proleg* direita. Os grupos de cada concentração foram formados com 10 larvas, totalizando 4 grupos (PBS, 1 x CIM, 2 x CIM, 3 x CIM), sendo o grupo PBS considerado o controle do experimento.

Após as inoculações, as larvas foram incubadas a 37 °C por 7 dias. Durante esse período, as larvas foram monitoradas diariamente, por inspeção visual baseado na falta de movimento ao ser tocada. O ensaio foi realizado em duplicata.

3.4.2 Contagem de hemócitos

Grupos com 10 larvas cada foram tratados com os fármacos cloridrato de verapamil, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina, nas concentrações correspondentes a 1 x CIM, 2 x CIM e 3 x CIM. As larvas foram incubadas em placas de Petri a 37 °C durante 3 h.

Posteriormente, a hemolinfa de cada a larva foi coletada individualmente em tubos de 1,5 mL e diluída 1:20 em solução anticoagulante gelada (2 % de Cloreto de sódio - NaCl, 0,1M glicose, 30 mM citrato de sódio, 26 mM ácido cítrico, 10 mM ácido etilenodiaminotetracético-EDTA) para a contagem dos hemócitos. Neste ensaio analisamos se houve alterações nas quantidades de hemóctos em *G. mellonella* ocasionados pelos tratamentos com fármacos.

O número de hemócitos foi quantificado utilizando Câmara de Neubauer. Como controle foram usadas larvas tratadas com PBS.

3.4.3 Padronização da dose letal de *C. neoformans* por ensaio de sobrevivência

Antes dos ensaios de tratamentos, foi realizada a padronização da dose letal de *C. neoformans* para *G. mellonella*. Para isso, foram utilizadas três concentrações de *C. neoformans* para determinar a concentração do inóculo ideal capaz de matar as larvas dentro de 7 dias e como controle dos experimentos foi utilizado um grupo injetado com PBS e larvas sem manuseio.

As concentrações utilizadas neste experimento foram 10^6 , 5×10^6 , 10^7 células/larva com o total de 10 larvas para cada concentração. Essas concentrações foram baseadas no estudo de Sangalli et al. (2016).

O cultivo da levedura foi realizado de acordo com item 3.3.1, a suspensão foi padronizada em PBS nas concentrações desejadas e inoculadas 10 μ L da mesma na última *proleg* esquerda de cada larva. Posteriormente, as larvas foram incubadas em placas de Petri, a 37 °C durante 7 dias.

Durante esse período, as larvas foram monitoradas diariamente por inspeção visual baseado na falta de movimento ao ser tocada. O ensaio foi realizado em duplicata.

3.4.4 Efeito do tratamento de fármacos isolados e combinados com AmB *in vivo*

Os ensaios de eficácia dos fármacos isolados e das combinações sinérgicas foram realizados após as padronizações necessárias.

As larvas foram infectadas com a suspensão fúngica letal eleita no item

anterior e tratadas com os fármacos isolados (cloridrato de verapamil, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina) nas concentrações 1 x CIM, 2 x CIM e 3 x CIM, e com a combinação sinérgica desses compostos e AmB, nas concentrações de 1 x Sinergismo, 2 x Sinergismo e 3 x Sinergismo. Como controle, foi utilizado um grupo que recebeu somente PBS e um grupo que recebeu a suspensão fúngica sem tratamento.

Os antifúngicos foram administrados 1 h após a infecção. Posteriormente, as larvas foram incubadas a 37 °C e a sobrevivência monitorada diariamente durante 7 dias consecutivos. Para cada experimento, foram utilizados grupos contendo 10 larvas. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.5 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o software *GraphPad Prism* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Os dados obtidos pelos testes de atividade antifúngica em biofilmes e efeito dos fármacos sobre a cápsula passaram pelo One-way ANOVA (Tukey) e teste t (Mann-Whitney test) com nível de significância de $p \leq 0.05$. As curvas de sobrevivência em *Galleria mellonella* foram analisadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação dos fármacos não-antifúngicos *in vitro*

4.1.1 Determinação da CIM e CFM dos fármacos

A avaliação da susceptibilidade de *C. neoformans* aos fármacos mostrou que essa levedura foi sensível aos três fármacos avaliados, como pode ser observado na tabela 1. Os compostos também apresentaram como CFM os mesmos valores de CIM.

Candida krusei foi utilizada como controle, a CIM da AmB apresentou 0,5 µg/mL.

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima dos fármacos

Fármacos	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
CV	113	113
CF	9,6	9,6
CP	41	41
AmB	0,5	0,5

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima; CFM: Concentração Fungicida mínima; AmB: anfotericina B; CV: cloridrato de verapamil; CF: cloridrato de fluoxetina; CP: cloridrato de paroxetina.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.2 Avaliação do efeito combinatório dos compostos com anfotericina B

A avaliação do efeito sinérgico dos fármacos cloridrato de verapamil, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina com a anfotericina B, apresentaram valores sinérgicos, de acordo com o cálculo de ICIF, como pode ser observado na tabela 2.

As combinações de cloridrato de verapamil e AmB (CV+AmB), cloridrato de fluoxetina e AmB (CF+AmB), e cloridrato de paroxetina e AmB (CP+AmB), resultaram em dez, quatro e seis concentrações sinérgicas, respectivamente. Todas as concentrações reduziram significativamente os valores de CIM dos fármacos e AmB.

Tabela 2 - Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fármacos sozinhos e combinados com anfotericina B contra *C. neoformans*, e a verificação da atividade dos fármacos quando combinados.

Combinação	Uso isolado CIM		Combinação		Valores ICIF	Redução da CIM	
	1F	2F	1F	2F		1F	2F
CV +AmB	113	0,5	28,3	0,125	0,50	3 x	4 x
CV +AmB	113	0,5	28,3	0,06	0,37	3 x	8 x
CV +AmB	113	0,5	14	0,125	0,37	8 x	4 x
CV +AmB	113	0,5	14	0,06	0,24	8 x	8 x
CV +AmB	113	0,5	7	0,125	0,31	16 x	4 x
CV +AmB	113	0,5	7	0,06	0,18	16 x	8 x
CV +AmB	113	0,5	3,5	0,125	0,28	32 x	4 x
CV + AmB	113	0,5	3,5	0,06	0,15	32 x	8 x
CV +AmB	113	0,5	1,7	0,125	0,26	66 x	4 x
CV +AmB	113	0,5	1,7	0,06	0,13	66 x	8 x
CF +AmB	9,6	0,5	2,4	0,125	0,50	4 x	4 x
CF +AmB	9,6	0,5	2,4	0,06	0,37	4 x	8 x
CF +AmB	9,6	0,5	1,2	0,125	0,37	8 x	4 x
CF +AmB	9,6	0,5	1,2	0,06	0,24	8x	8x
CP +AmB	41	0,5	5	0,125	0,37	8 x	4 x
CP +AmB	41	0,5	5	0,06	0, 24	8 x	8 x
CP +AmB	41	0,5	2,5	0,125	0,31	16 x	4 x
CP +AmB	41	0,5	2,5	0,06	0,18	16 x	8 x
CP +AmB	41	0,5	1,2	0,125	0,27	34 x	4 x
CP +AmB	41	0,5	1,2	0,06	0,14	34 x	8 x

Legenda: 1F: primeiro fármaco (não-antifúngico); 2F: segundo fármaco (anfotericina B); CV: cloridrato de verapamil; CF: cloridrato de fluoxetina; CP: cloridrato de paroxetina.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.3 Avaliações dos compostos e combinações em biofilme de *C. neoformans*

Para o tratamento do biofilme, foram usadas as concentrações 1 x CIM e 2 x CIM de cada fármaco isolado (cloridrato de verapamil, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina) e duas vezes a concentração sinérgica baseada nos valores de ICIF.

Todas as concentrações dos fármacos avaliadas no biofilme estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Concentrações dos fármacos isolados e em concentrações sinérgicas para avaliações dos efeitos em biofilmes

Tratamentos do biofilme (N = 10)		
Fármacos isolados	CIM	
1) 1 x CV	113 µg/mL	
2) 2 x CV	226 µg/mL	
3) 1 x CF	9,6 µg/mL	
4) 2 x CF	19,2 µg/mL	
5) 1 x CP	41 µg/mL	
6) 2 x CP	82 µg/mL	
Fármacos sinérgicos (2x)	Fármaco 1 (2x)	AmB (2x)
1) CV + AmB	14 µg/mL	0,12 µg/mL
2) CF + AmB	4,8 µg/mL	0,24 µg/mL
3) CP + AmB	5 µg/mL	0,12 µg/mL

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima; CV: cloridrato de verapamil; CF: cloridrato de fluoxetina; CP: cloridrato de paroxetina; Fármaco 1: não-antifúngico; Fármaco 2: anfotericina B.

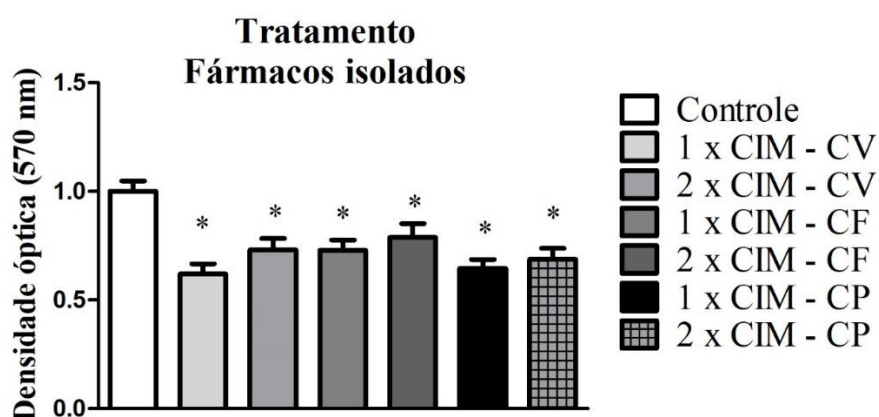
Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.4 Quantificação da massa do biofilme a partir da coloração por Cristal Violeta

Todos os fármacos isolados avaliados nas concentrações equivalentes a 1 x CIM e 2 x CIM, apresentaram redução da biomassa significativa em relação ao controle sem tratamento ($p < 0,5$), como pode ser observado na figura 6.

As concentrações de 1 x CIM de CV e 2 x CIM de CV apresentaram reduções da biomassa equivalentes a 38 % ($p = 0,0002$) e 27 % ($p = 0,0048$), respectivamente. Já para as concentrações 1 x CIM de CF e 2 x CIM de CF as reduções foram de 28 % ($p = 0,0013$) e 22 % de redução ($p = 0,0216$). Por fim, 1 x CIM de CP e 2 x CIM de CP a redução chegou a 36 % ($p = 0,0002$) e 32 % ($p = 0,0010$), respectivamente.

Figura 6 - Quantificação da biomassa por Cristal Violeta após tratamentos com os fármacos isolados no valor de CIM



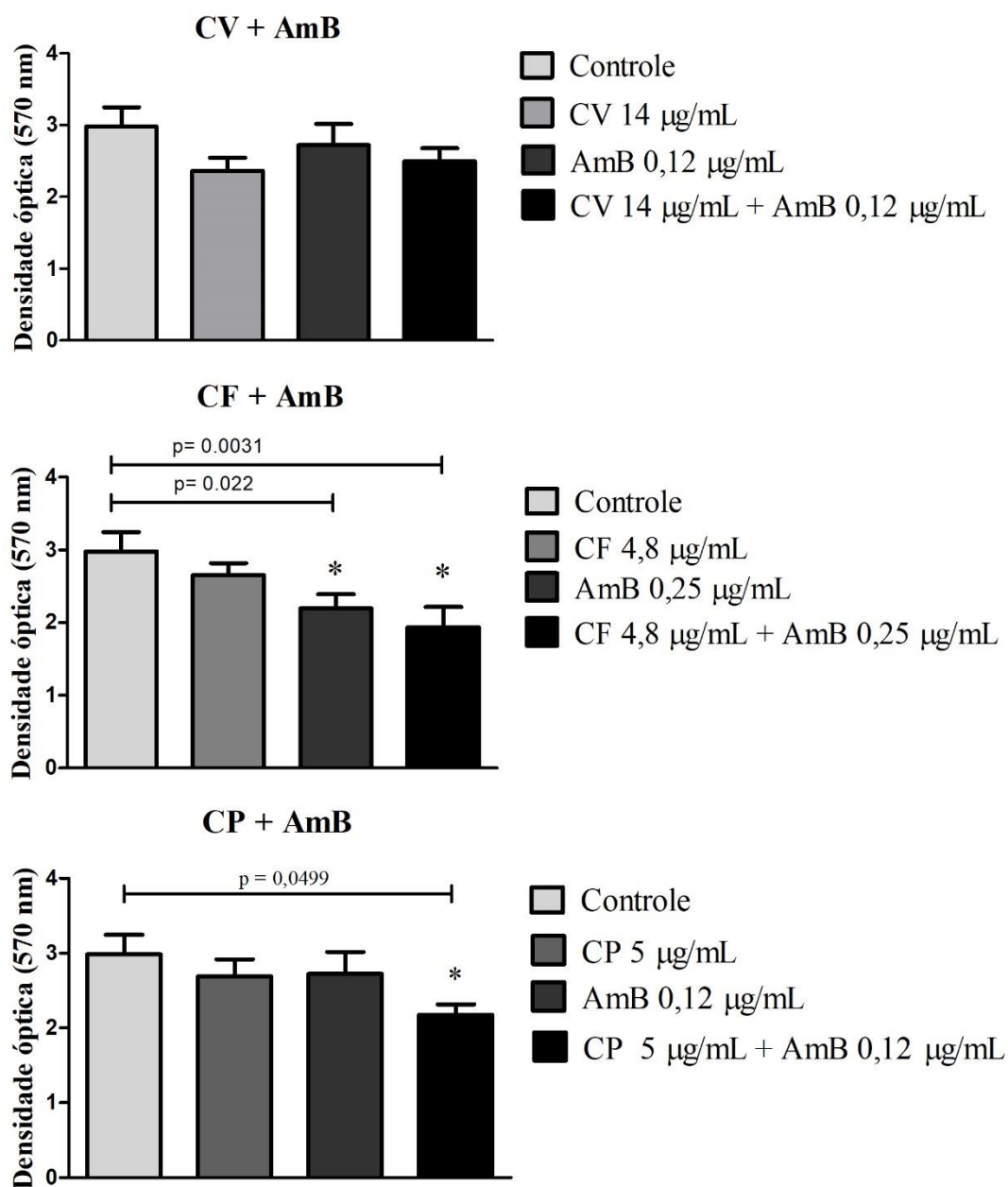
Legenda: CIM:Concentração Inibitória Mínima; CV – cloridrato de verapamil; CF – cloridrato de fluoxetina; CP – cloridrato de paroxetina; AmB: anfotericina B. 1 x CIM – CV (113 µg/mL), 2 x CIM – CV (226 µg/mL), 1 x CIM – CF (9,6 µg/mL), 2 x CIM – CF (19,2 µg/mL), 1 x CIM – CP (41 µg/mL) e 2 x CIM –CP (82 µg/mL). O asterisco (*) indica significância estatística ($p < 0,5$) em relação ao controle sem tratamento.

Fonte: Elaborado pela autora.

Em relação as combinações sinérgicas avaliadas neste ensaio, a combinação de cloridrato de verapamil (14 µg/mL) e anfotericina B (0,12 µg/mL) não apresentou redução significativa da biomassa do biofilme.

Em contrapartida, a combinação de cloridrato de fluoxetina (4,8 µg/mL) e anfotericina B (0,25 µg/mL) apresentou 35 % de redução ($p= 0.0031$) da biomassa em 24 h de tratamento. Além disso, a AmB (0,25 µg/mL) quando avaliada isoladamente apresentou 27 % ($p=0,022$) de redução do biofilme, similar ao que ocorreu quando testada a combinação de cloridrato de paroxetina (5 µg/mL) e anfotericina B (0,12 µg/mL) que também reduziu 27 % da biomassa ($p=0,0499$) nas mesmas condições (Figura 7).

Figura 7 - Quantificação da biomassa por Cristal Violeta após tratamentos sinérgicos



Legenda: CV – cloridrato de verapamil; CF – cloridrato de fluoxetina; CP – cloridrato de paroxetina; AmB: anfotericina B. O asterisco (*) indica significância estatística ($p < 0,5$) em relação ao controle sem tratamento.

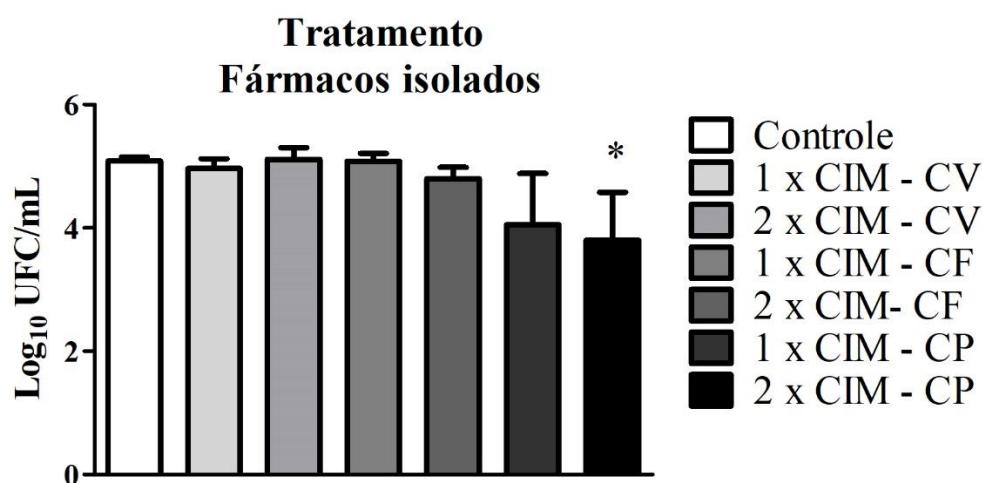
Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.5 Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)

Os efeitos dos fármacos isolados e das combinações sinérgicas na viabilidade celular do biofilme foi determinado pela quantificação de UFC.

O biofilme de *C. neoformans* tratado com os fármacos isolados não apresentou redução estatística da viabilidade celular nas concentrações testadas, exceto em 2 x CIM do CP ($p=0,0301$), como pode ser observado na figura 8. A concentração mencionada reduziu 25 % da viabilidade celular quando comparada ao controle sem tratamento.

Figura 8 - Quantificação da viabilidade celular do biofilme após tratamentos com os fármacos isolados no valor da CIM



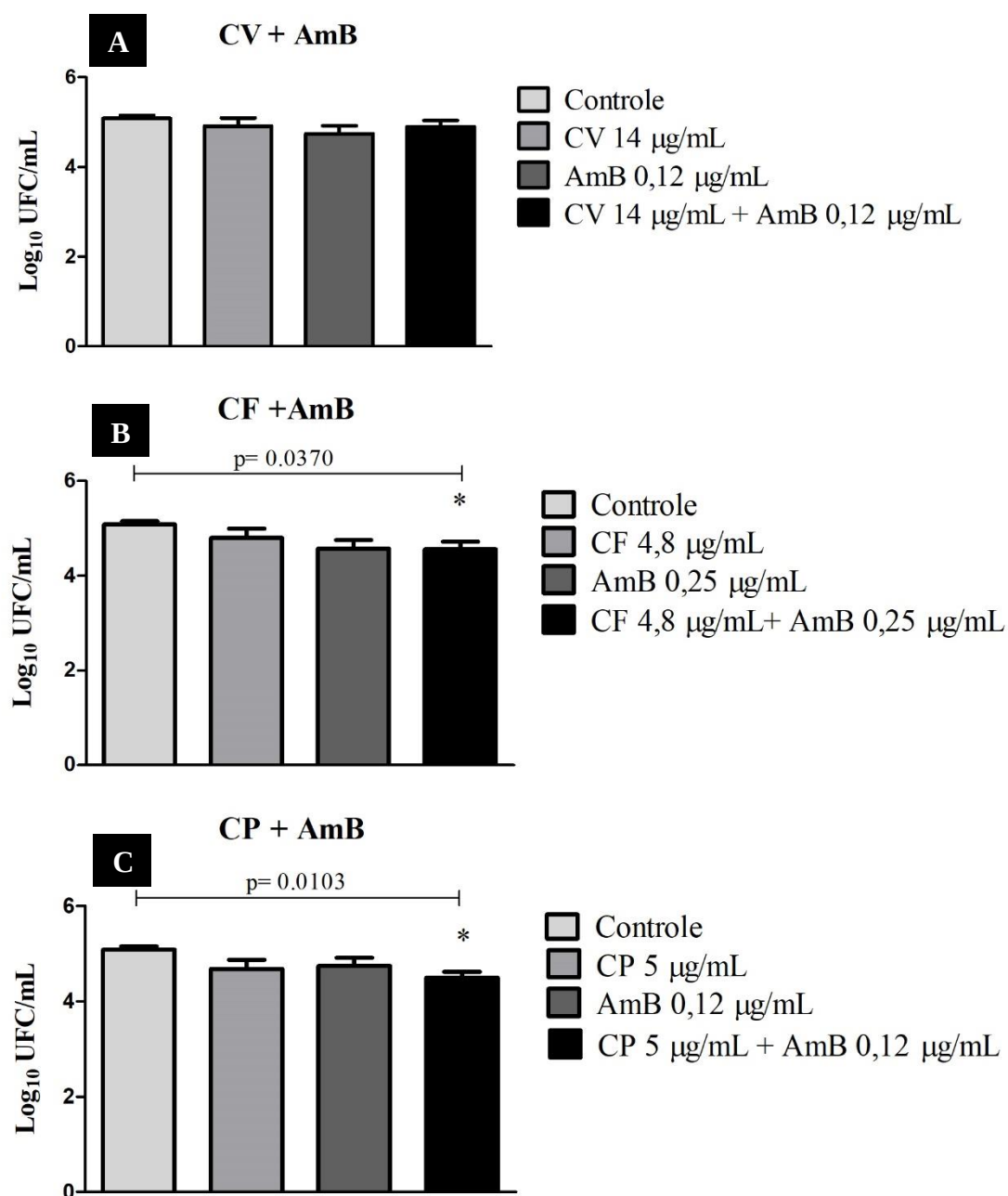
Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima; CV – cloridrato de verapamil; CF – cloridrato de fluoxetina; CP – cloridrato de paroxetina; AmB: anfotericina B. 1 x CIM – CV (113 µg/mL), 2 x CIM – CV (226 µg/mL), 1 x CIM – CF (9,6 µg/mL), 2 x CIM – CF (19,2 µg/mL), 1 x CIM – CP (41 µg/mL) e 2 x CIM – CP (82 µg/mL). O asterisco (*) indica significância estatística ($p < 0,5$).

Fonte: Elaborado pela autora.

O tratamento do biofilme resultou em redução estatística significativa da viabilidade quando tratado com as combinações sinérgicas CF (4,8 µg/mL) e AmB (0,25 µg/mL), e CP (5 µg/mL) e AmB (0,12 µg/mL). A primeira combinação mencionada reduziu 10 % da viabilidade do biofilme ($p=0.0370$), já CP (5µg/mL) e AmB (0,12 µg/mL) foi verificado uma redução de 11 % após o tratamento ($p=0.0103$), como mostra a figura 9.

A combinação CV (14 µg/mL) e AmB (0,12 µg/mL) não apresentou redução significativa da viabilidade do biofilme.

Figura 9 - Quantificação da viabilidade celular do biofilme após tratamentos sinérgicos



Legenda: CV – cloridrato de verapamil; CF – cloridrato de fluoxetina; CP – cloridrato de paroxetina; AmB: anfotericina B. O asterisco (*) indica significância estatística ($p < 0,5$) em relação ao controle sem tratamento.

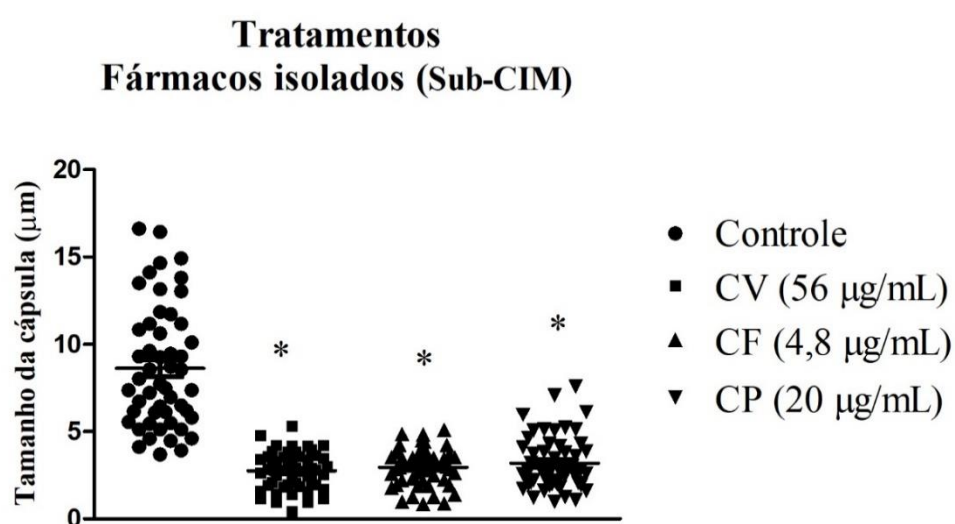
Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.6 Efeito dos fármacos isolados e das combinações sinérgicas sobre a cápsula de *C. neoformans*

Após as células serem cultivadas em meio de indução de cápsula, as mesmas receberam os tratamentos isolados e sinérgicos por 24 h.

O fármaco CV isolado, em sua concentração sub-inibitória (56 µg/mL) reduziu 68 % do tamanho da cápsula ($p < 0.0001$) de *C. neoformans* em relação ao controle sem tratamento, os compostos CF (4,8 µg/mL) e CP (20 µg/mL) reduziram consideravelmente o tamanho capsular das leveduras, com 65 % e 63 % ($p < 0.0001$), respectivamente, como mostra a figura 10.

Figura 10 - Efeitos dos tratamentos com fármacos isolados em concentrações Sub-inibitórias em cápsula de *C. neoformans*



Legenda: CV – cloridrato de verapamil; CF – cloridrato de fluoxetina; CP – cloridrato de paroxetina; AmB: anfotericina B. O asterisco (*) indica significância estatística ($p < 0,5$) em relação ao controle sem tratamento.

Fonte: Elaborado pela autora.

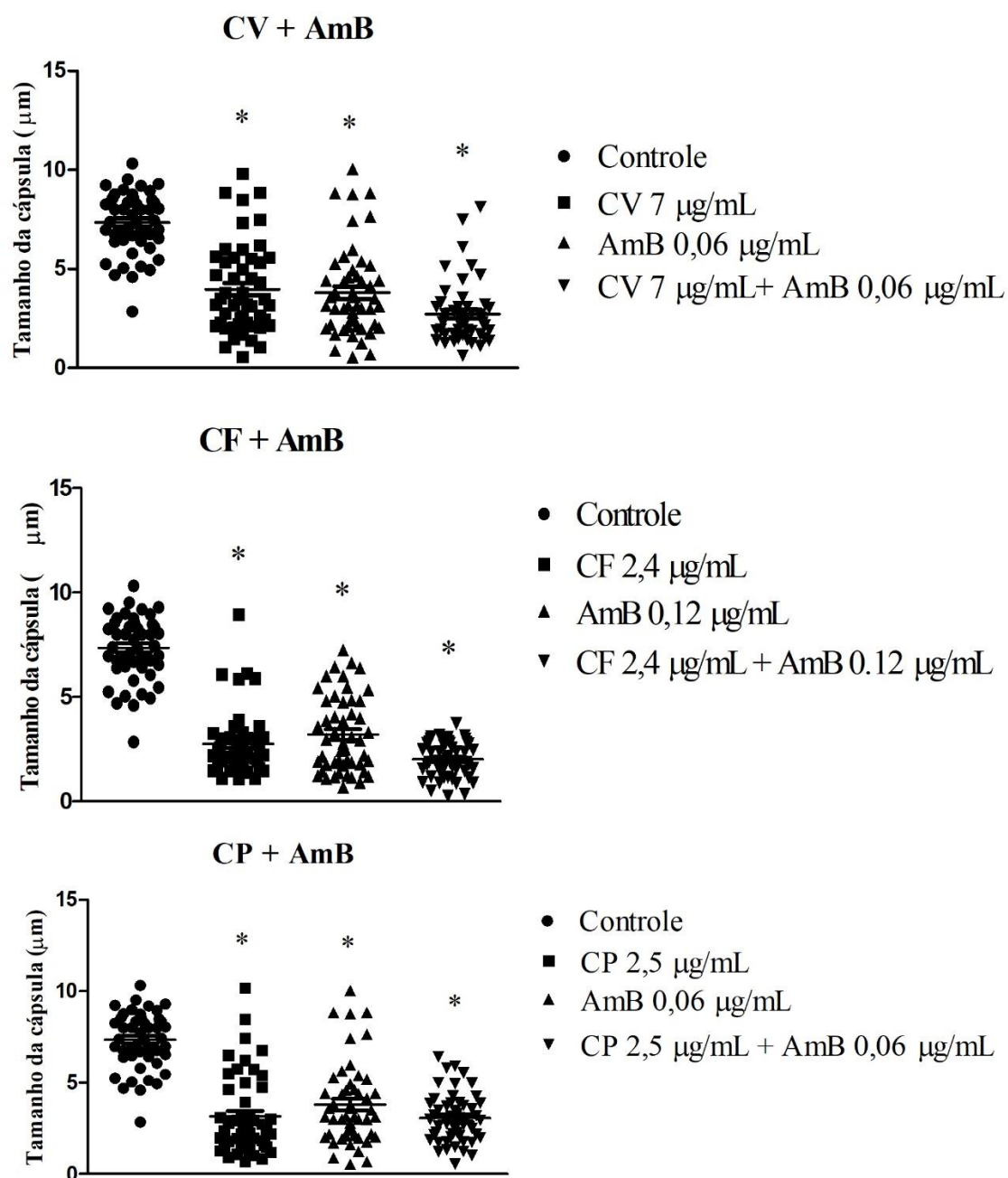
Em relação aos tratamentos sinérgicos realizados, observamos uma redução significativa do tamanho capsular das células quando tratadas com as três concentrações sinérgicas e com os fármacos separadamente, como pode ser observado na figura 11. Apesar de os compostos analisados separadamente apresentarem redução significativa, as combinações sinérgicas resultaram em reduções mais altas.

A combinação CV (7 $\mu\text{g/mL}$) e AmB (0,06 $\mu\text{g/mL}$) reduziu 63 % do tamanho da cápsula ($p < 0.0001$) entretanto os fármacos separados apresentaram 45 % de redução ($p < 0.0001$) quando tratado com CV (7 $\mu\text{g/mL}$) e 48 % ($p < 0.0001$) quando tratado somente com AmB (0,06 $\mu\text{g/mL}$). Os fármacos CV isolado e a combinação CV e AmB apresentaram diferença estatística ($p = 0,0016$), e o mesmo foi observado quando comparada AMB isolada e a combinação ($p = 0,0037$).

A concentração sinérgica de CF (2,4 $\mu\text{g/mL}$) e AmB (0,12 $\mu\text{g/mL}$) foi responsável por reduzir 72 % do mesmo ($p < 0.0001$), e quando os fármacos CF e AmB foram testados separadamente, apresentaram redução de 62 % e 56 % ($p < 0.0001$), respectivamente. Quando comparados CF isolado e AmB isolada com a combinação CF e AmB, foi observado diferenças estatísticas ($p = 0,0150$) e ($p = 0,0022$), respectivamente.

Por fim a combinação de CP (2,5 $\mu\text{g/mL}$) e AmB (0,06 $\mu\text{g/mL}$) resultou em 59 % de redução ($p < 0.0001$) quando comparado ao controle, e os fármacos sozinhos apresentaram 57 % e 48 % de redução ($p < 0.0001$), para CV e AmB nesta ordem. A comparação entre CP isolado e AmB isolado com a combinação sinérgica CP e AmB, não resultou em diferenças estatísticas.

Figura 11 - Efeitos dos tratamentos com as combinações sinérgicas em cápsula de *C. neoformans*



Legenda: CV – cloridrato de verapamil; CF – cloridrato de fluoxetina; CP – cloridrato de paroxetina; AmB: anfotericina B. O asterisco (*) indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle sem tratamento.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Ensaios *in vivo* em *Galleria mellonella*

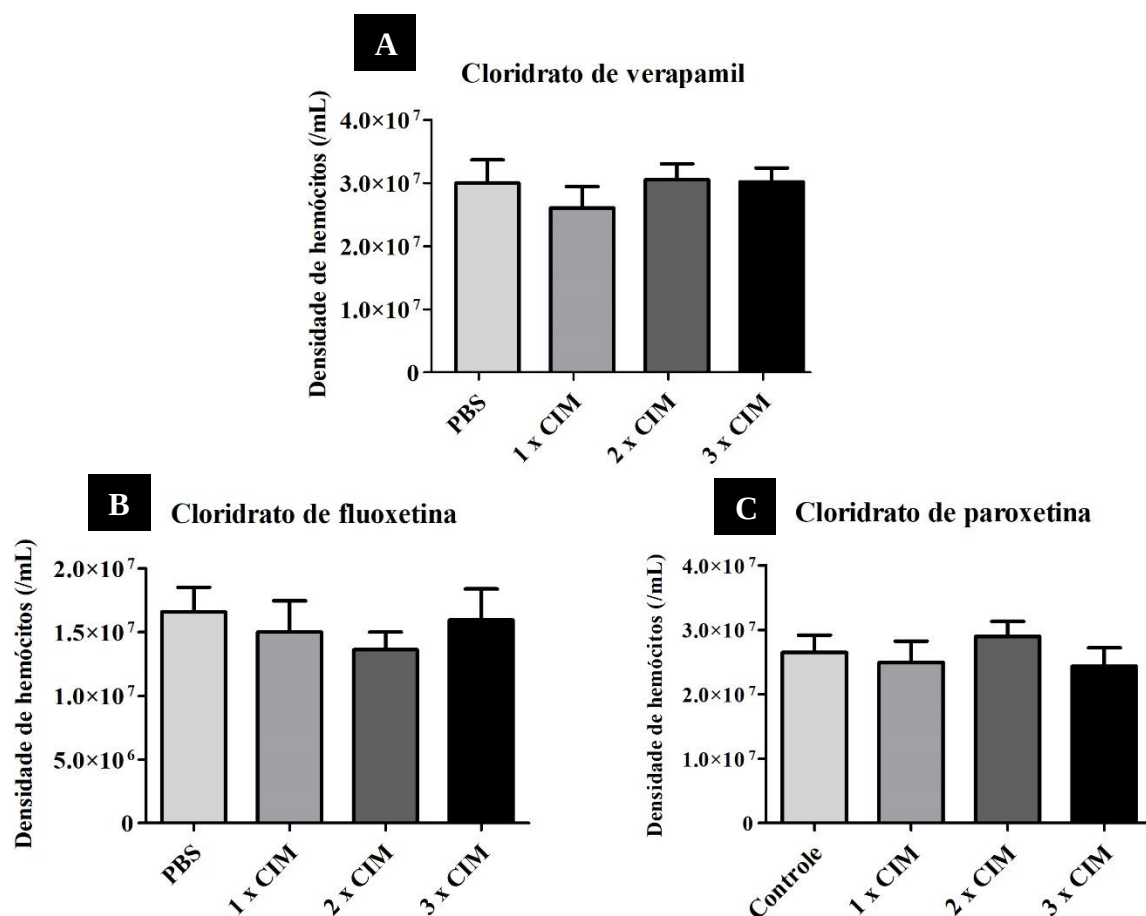
4.2.1 Ensaio de toxicidade dos fármacos não-antifúngicos

No ensaio de toxicidade foram avaliadas as concentrações cloridrato de verapamil (113 µg/larva, 226 µg/larva e 339µg/larva), cloridrato de fluoxetina (9,6 µg/larva, 19,2 µg/larva, 288 µg/larva) e cloridrato de paroxetina (41,1 µg/larva; 82,2 µg/larva e 123,3 µg/larva), os valores são respectivamente 1 x CIM, 2 x CIM, 3 x CIM transformados em doses por larvas. Os resultados mostram que nenhum fármaco apresentou toxicidade nas concentrações avaliadas, as larvas se mantiveram vivas por 7 dias e não apresentaram mudança de coloração ou comportamento indicando uma possível toxicidade.

4.2.2 Contagem de hemócitos

As larvas tratadas com cloridrato de verapamil (113 µg/larva, 226 µg/larva e 339µg/larva), cloridrato de fluoxetina (9,6 µg/larva, 19,2 µg/larva, 288 µg/larva) e cloridrato de paroxetina (41,1 µg/larva; 82,2 µg/larva e 123,3 µg/larva) concentrações equivalente a 1 x CIM, 2 x CIM e 3 x CIM, respectivamente não apresentaram alterações significativas em relação a concentração dos hemócitos em relação ao grupo controle (PBS) com os demais grupos, como pode ser observado na figura 12.

Figura 12 – Quantidade de hemócitos após inoculações dos fármacos em *Galleria mellonella*



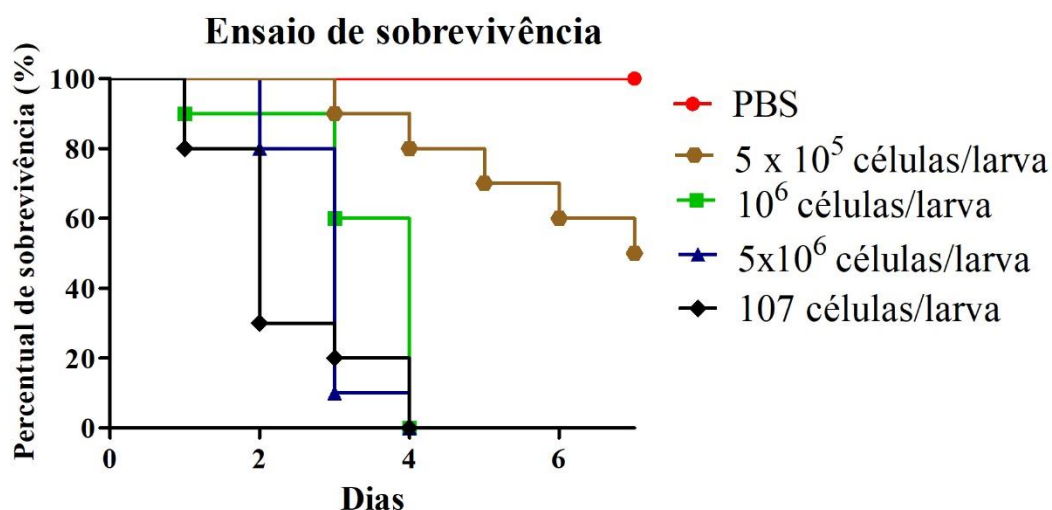
Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima. Cloridrato de verapamil 1 x CIM (113 $\mu\text{g/mL}$), 2 x CIM (226 $\mu\text{g/mL}$), 3 x CIM (339 $\mu\text{g/mL}$). Cloridrato de fluoxetina 1 x CIM (9,6 $\mu\text{g/mL}$), 2 x CIM (19,2 $\mu\text{g/mL}$), 3 x CIM (28,8 $\mu\text{g/mL}$). Cloridrato de paroxetina 1 x CIM (41 $\mu\text{g/mL}$), 2 x CIM (82 $\mu\text{g/mL}$), 3 x CIM (123 $\mu\text{g/mL}$). Todas concentrações não apresentaram significância estatística em relação ao controle tratado com PBS.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.3 Determinação da concentração letal de *C. neoformans*

As larvas infectadas com as concentrações 10^6 , 5×10^6 e 10^7 células/larva apresentaram 100 % de morte após quatro dias de infecção e não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. Já as larvas infectadas com 5×10^5 células/larva, 50 % ainda permaneceram vivas após 7 dias de infecção. O grupo controle, composto por larvas tratadas com PBS não apresentou redução em sua sobrevivência após 7 dias de experimento. Portanto, foi selecionada a concentração 10^6 células/larva para os ensaios posteriores, por ser a menor concentração e não apresentar diferenças estatísticas com as concentrações mais altas. A curva de sobrevivência das larvas pode ser observada na figura 13.

Figura 13 - Ensaio de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com *C. neoformans*



Fonte: Elaborado pela autora.

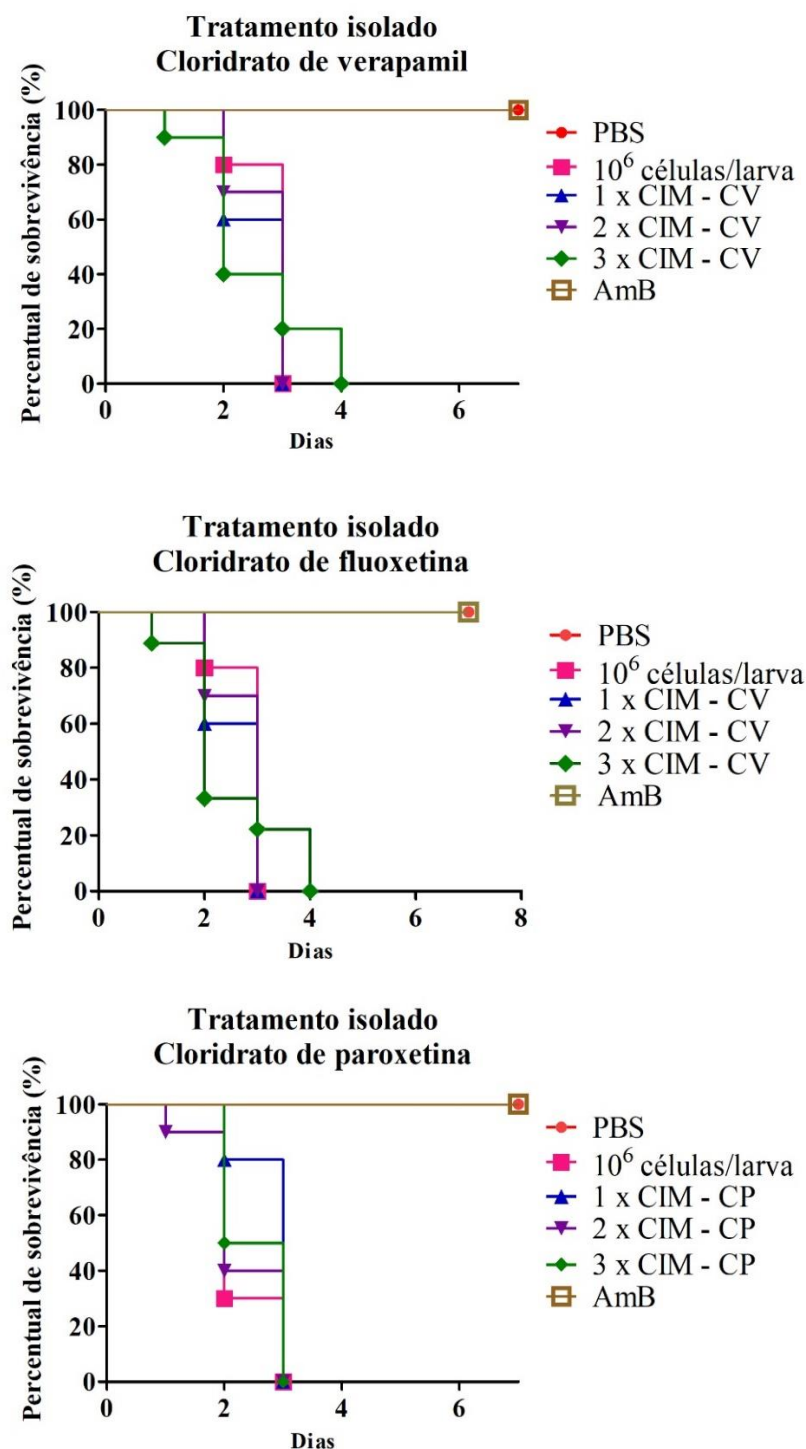
4.2.4 Efeito do tratamento de fármacos isolados e das combinações sinérgicas *in vivo* em *Galleria mellonella*

Os tratamentos das larvas foram realizados utilizando as seguintes concentrações: cloridrato de verapamil (113 µg/larva, 226 µg/larva e 339µg/larva), cloridrato de fluoxetina (9,6 µg/larva, 19,2 µg/larva, 288 µg/larva) e cloridrato de paroxetina (41,1 µg/larva; 82,2 µg/larva e 123,3 µg/larva). Os valores são respectivamente 1 x CIM, 2 x CIM, 3 x CIM transformados em doses por larvas. Como controle de todos os ensaios de eficácia, foi utilizada AmB 4 mg/kg.

Os fármacos analisados não aumentaram o percentual de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* em relação ao grupo controle (figura 14). Os tratamentos isolados dos fármacos CV e CF não aumentaram a sobrevivência das larvas por mais de quatro dias juntamente com o controle sem tratamento.

Para o ensaio realizado com o fármaco CP, observamos morte de todas as larvas do grupo controle e dos tratamentos em 3 dias de infecção.

Figura 14 – Tratamentos com os fármacos isolados em *G. mellonella*

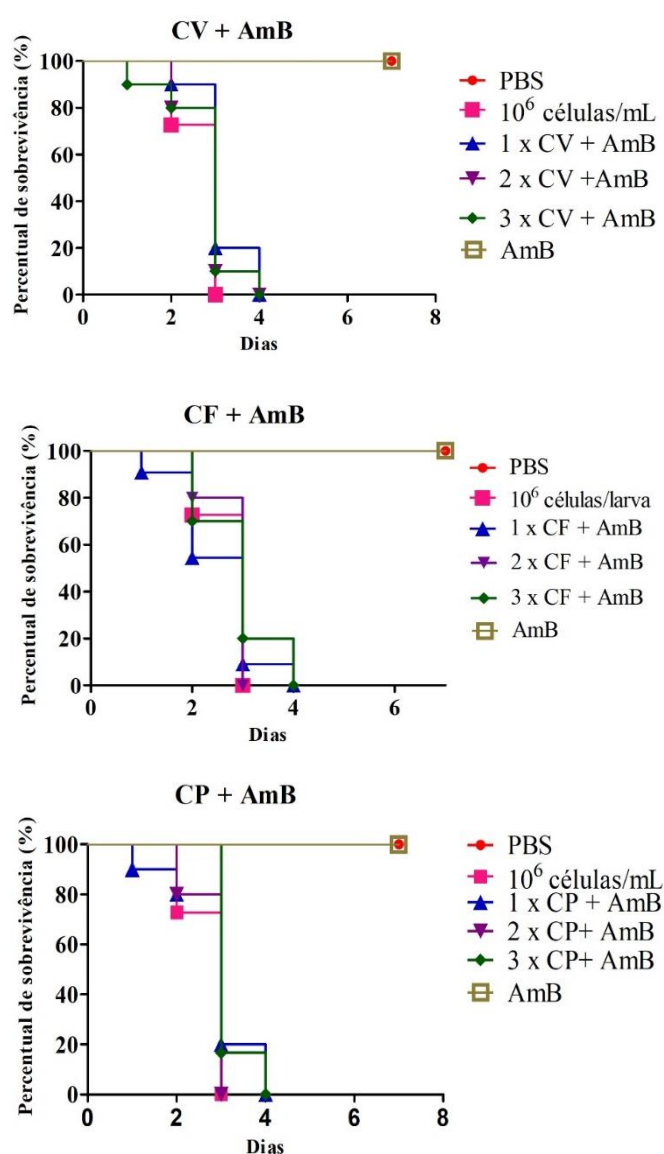


Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima. Cloridrato de verapamil 1 x CIM (113 µg/mL), 2 x CIM (226 µg/mL), 3 x CIM (339 µg/mL). Cloridrato de fluoxetina 1 x CIM (9,6 µg/mL), 2 x CIM (19,2 µg/mL), 3 x CIM (28,8 µg/mL). Cloridrato de paroxetina 1 x CIM (41 µg/mL), 2 x CIM (82 µg/mL), 3 x CIM (123 µg/mL).

Fonte: Elaborado pela autora.

O tratamento realizado com as concentrações sinérgicas: CV (14 µg/mL) e AmB (0,12 µg/mL), e CF (4,8 µg/mL) e AmB (0,25 µg/mL), CP (5µg/mL) e AmB (0,12 µg/mL), transformados em doses por larva, não apresentaram aumento no percentual de sobrevivência das larvas, como pode ser observado na figura 15. Em quatro dias de infecção, as larvas do grupo controle e dos tratamentos estavam mortas.

Figura 15 – Tratamentos com os fármacos em sinergismo em *G. mellonella*



Legenda: CV: cloridrato de verapamil; CF: cloridrato de fluoxetina; CP: cloridrato de paroxetina; AmB: anfotericina B.

Fonte: Elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

Devido ao aumento da taxa de mortalidade de infecções fúngicas e mudanças epidemiológicas das mesmas, tornou-se indispensável a procura de novas alternativas de tratamento (Kauffman, 2004; Sun et al., 2017). A resistência de *C. neoformans* ao tratamento convencional vem sendo relatado (Perfect, Cox, 1999; Smith et al., 2015; Mpoza et al., 2018). Além disso, a toxicidade dos antifúngicos administrados durante a infecção e o alto custo dos mesmos, tem gerado estudos a fim de encontrar tratamentos menos tóxicos e alternativos (Day et al., 2013; Jarvis et al., 2014; Agostinho et al., 2018).

O reposicionamento de fármacos e o sinergismo entre compostos foram relatados como tratamentos alternativos promissores (Liu et al., 2014; Azevedo et al., 2015; Sangalli-Leite et al., 2016; Joffe et al., 2017; Truong et al., 2018). Neste presente estudo, empregamos os fármacos cloridrato de verapamil, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina para avaliar as suas ações antifúngicas em *C. neoformans*, já que os mesmos apresentaram atividade antifúngica relatada em diversos estudos envolvendo *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. (Yu et al., 2013, 2014; Oliveira et al., 2014, Gu et al., 2016; Jorjão et al., 2017; Nazik et al., 2017; Oliveira et al., 2018), porém não há relatos de suas atividades em *C. neoformans*.

Neste estudo, identificamos que o fármaco cloridrato de verapamil, um bloqueador dos canais de cálcio, possui a capacidade de inibição de *C. neoformans* com CIM equivalente a 113 µg/mL, e quando combinado com AmB resultou em dez concentrações sinérgicas. Além disso, identificamos uma redução significativa da biomassa do biofilme da espécie em até 38 % quando testado isoladamente, e quando combinado com AmB em 2 x a concentração sinérgica (CV 14 µg/mL e AmB 0,12 µg/mL) não houve redução considerável da biomassa. Nenhuma das concentrações avaliadas alteraram a viabilidade das

células do biofilme de *C. neoformans*. A ação antifúngica do fármaco, também foi demonstrada em *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* (Krajewska-Kułak, Niczyporuk, 1993; Yu et al., 2013; Yu et al., 2014; Nazik et al., 2017). Um estudo realizado por Krajewska-Kułak e Niczyporuk (1993), identificou que o verapamil possui atividade antifúngica em isolados clínicos de *C. albicans* (CIM de 1.020 µg/mL). Em biofilmes, o fármaco isolado e combinado com fluconazol ou tunicamicina também se mostrou promissor para a redução do mesmo, e de acordo com o estudo a concentração de 20 µg/mL reduziu significativamente a atividade metabólica dos biofilmes pré-formados e as concentrações altas do fármaco (20 - 1280 µg/mL) reduziu mais de 50 % da atividade metabólica de biofilmes maduros (Yu et al., 2013). Em *Aspergillus fumigatus*, o verapamil inibiu a formação de biofilme e o metabolismo do biofilme pré-formado, porém em crescimento planctônico o mesmo foi inativo (Nazik et al., 2017). Segundo Yu et al. (2014) essa capacidade de ação antifúngica em biofilmes se dá pela atuação do fármaco na formação de hifas causando o estresse oxidativo e na adesão das leveduras.

Relatos apontam que o cloridrato de verapamil auxilia na captação de AmB pela barreira hematoencefálica, isso devido a capacidade do verapamil inibir P-glicoproteína (proteína transportadora presente na barreira hematoencefálica). A AmB possui fraca capacidade de atravessar as barreiras cerebrais e o verapamil pode auxiliar na melhor captação de AmB (Wu et al., 2014). Com isso, acredita-se que além da capacidade de ação antifúngica contra *C. neoformans*, o fármaco quando combinado com AmB pode ter maior eficácia no tratamento de meningoencefalite, já que o mesmo auxilia na penetração do antifúngico na barreira hematoencefálica. Ainda não foi reportado sobre atividade antifúngica do cloridrato de verapamil contra *C. neoformans*, mas de acordo com nossos estudos, o fármaco mencionado é uma alternativa promissora para inibição do mesmo e deve ser investigado nos próximos estudos.

Os Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina, também estão sendo

estudados para serem utilizados contra infecções fúngica (Lass-Flörl et al., 2002; Oliveira et al., 2014; Gu et al., 2016; Oliveira et al., 2018). Estudos mostraram que os ISRS possuem efeito inibitório comprovado contra *Candida* spp. e reduzem significativamente os biofilmes de várias espécies do gênero, pois agem danificando o plasma e a membrana mitocondrial, induzindo morte celular por apoptose (Costa et al., 2017; Oliveira et al., 2018). Em *C. albicans* e *C. parapsilosis* o valor de CIM chegou a 625 µg/mL, em *C. glabrata* a CIM foi de 12 µg/mL, para *C. krusei* apresentou a CIM de até 312 µg/mL, por último para *C. tropicalis* a fluoxetina inibiu a concentração fúngica quando testada nos valores de 156-312µg/mL. Em biofilmes, foram reportados redução para *Candida* spp. de até 96 % quanto tratados com fluoxetina (Oliveira et al., 2014, 2018). Costa et al. (2017), avaliou o potencial antifúngico da fluoxetina, sertralina e paroxetina em *Candida* spp., as cepas apresentaram CIM de 20-160 µg/mL para fluoxetina, 10-20 µg/mL para sertalina, e 10-100 µg/mL para paroxetina. Em nosso estudo a paroxetina obteve CIM de 41 µg/mL frente *C. neoformans*. Já a fluoxetina apresentou CIM de 9,6 µg/mL e reduziu a biomassa do biofilme quando tratado com concetrações isoladas e sinérgicas.

A sertralina possui atividade antifúngica contra *Cryptococcus* spp. de acordo com Zhai et al. (2012), os autores encontraram o valor de CIM do fármaco de 6 µg/mL para *C. neoformans*, os mesmos relataram que a dificuldade dos antifúngicos tradicionais em atravessarem a barreira hematoencefálica é alta, por outro lado, os ISRS possuem alta penetração no sistema nervoso central e atividade antifúngica contra *Cryptococcus* spp. Portanto, alguns ISRS podem ter atividade antifúngica contra essas leveduras e podem funcionar sinergicamente com antifúngicos convencionais (Zhai et al., 2012). Nosso estudo corrobora com o de Zhai et al. (2012), pois idenficamos a atividade antifúngica dos ISRS, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina, frente *C. neoformans*, os quais ainda não foram reportados.

Os valores de CIM encontrados para cloridrato de fluoxetina e paroxetina (9,6 µg/mL e 41µg/mL, respectivamente), foram maiores quando contrastado a sertralina (2 a 6 µg/mL), contra *Cryptococcus* spp encontrado por Zhai et al. (2012). Além disso, cloridrato de fluoxetina apresentou quatro concentrações sinérgicas quando combinada com AmB, reduzindo a dose dos fármacos em até oito vezes a CIM de ambos os fármacos, e a combinação do cloridrato de paroxetina juntamente com AmB resultaram em seis concentrações sinérgicas reduzindo dezesseis e oito vezes os valores de CIM de paroxetina e AmB, respectivamente. Gu et al. (2016), identificaram que as concentrações sinérgicas de fluoxetina e azóis diminuíram até 8 vezes a CIM da fluoxetina e até 128 vezes a CIM de antifúngicos azóis (fluconazole, itraconazole, and voriconazole) quando testados em *Candida* spp. Em isolados de *Cryptococcus* os valores de CIM da sertralina variaram de 2 a 6 µg/mL e foram reduzidos de 1-3 vezes quando combinados com fluconazol (Zhai et al., 2012).

Neste estudo, identificamos que as concentrações isoladas de cloridrato de fluoxetina reduziu a biomassa do biofilme de *C. neoformans* em 27 e 36 % nas concentrações equivalente a 9,6-19,2 µg/mL, já a combinação de cloridrato de fluoxetina (4,8 µg/mL) e AmB (0,25 µg/mL) apresentou 35 % de redução da biomassa e a AmB (0,25 µg/mL) e a AmB isolada (0,25 µg/mL) utilizada como controle da combinação reduziu 27 % da biomassa. Em relação a viabilidade do biofilme, as concentrações isoladas de CF não reduziram significativamente, porém a combinação sinérgica apresentou ação na atividade do biofilme (redução de 10 %), o que mostra ser promissor para futuros estudos. O ISRS, cloridrato de paroxetina mostrou-se ser o mais promissor na atividade antifúngica contra biofilmes de *C. neoformans*, em concentrações isoladas reduziu a biomassa em até 36 %, porém não interferiu na viabilidade celular. Quando avaliada a combinação sinérgica de CP (5µg/mL) e AmB (0,12 µg/mL) constatamos uma diminuição da biomassa de 27 % e na viabilidade de 11 %, mostrando, assim que

os fármacos podem ser uma alternativa contra biofilmes de *C. neoformans*. Neste estudo, mostramos que os ISRS (cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina) tiveram ação na viabilidade celular do biofilme somente quando foram combinados com AmB, portanto pressupomos que o antifúngico foi primordial nesta atividade. A AmB possui ação em biofilmes de *C. neoformans* quando utilizada em altas concentrações que são consideradas fora da faixa terapêutica recomendada gerando toxicidade (Fanning, Mitchell; 2012, Delattin et al., 2014). Entretanto, nosso estudo apontou que a concentração de AmB pode ser diminuída quando combinada com os ISRS e essa combinação possui ação em biofilme de *C. neoformans*, porém são necessários mais estudos para avaliar esta interação.

O efeito dos ISRS também foi descrito por Oliveira et al. (2018) em *Candida* spp., os quais identificaram que fluoxetina (3,9 mg/mL) reduziu o metabolismo do biofilme em 96 % (*C. krusei*) e biomassa em 82 % (*C. glabrata*), já a sertralina alcançou uma redução de 88 % na biomassa do biofilme (*C. glabrata*) e de 90 % no metabolismo do biofilme (*C. parapsilosis*) (Oliveira et al., 2018). Em biofilmes de cepas resistentes de *C. albicans* a concentração de 128 µg/mL de fluoxetina reduziu 50 % do biofilme quando comparado ao controle. Quando combinados os fármacos fluoxetina e fluconazol, houve uma redução de 4 vezes a CIM e 128 vezes a CIM, respectivamente, reduzindo o biofilme em 50 % (Gu et al., 2016).

Cryptococcus neoformans é um fungo encapsulado, ou seja, possui uma cápsula formada por glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), que está localizada em torno do corpo celular da levedura e esta é considerada um fator de virulência importante deste patógeno (Zaragoza et al., 2008). No hospedeiro, a mesma possui a função de proteção, reduzindo a resposta imune e protegendo o fungo contra a fagocitose (Retini et al., 1998; Panepinto et al., 2007), e quando o fungo é fagocitado pelos macrófagos a cápsula atua na

proteção contra antioxidantes liberados pelo hospedeiro (Zaragoza et al., 2008). Já em relação a resistência aos antifúngicos, a cápsula pode interferir na atividade destes fármacos dificultando o tratamento.

A cápsula também pode variar de tamanho dependendo das condições em que o fungo se encontra, por exemplo, quando o fungo infecta mamíferos, observa-se um aumento exacebado do tamanho da cápsula facilitando assim, a infecção criptocócica principalmente por inibição da fagocitose no hospedeiro (Zaragoza et al., 2008). Neste contexto, os estudos envolvendo a cápsula são muito importantes para identificar tratamentos capazes de minimizar este fator de virulência (Zaragoza et al., 2003, 2004). Condições experimentais foram publicadas para a realização de indução da cápsula *in vitro* (Zaragoza, Casadevall, 2004), e os nossos resultados revelaram que os fármacos em questão quando avaliados em cápsulas induzidas, em concentrações sub-inibitórias e sinérgicas (isoladas e combinadas), diminuíram o tamanho capsular das leveduras entre 59 a 72 %. A redução de cápsulas também foi identificado por Joffe et al. (2017) que avaliaram a concentração sub-inibitória do anti-helmíntico mebendazol e mostraram uma redução significativa das dimensões da cápsula e alterações morfológicas na mesma. A combinação de AmB e sertralina foi avaliada contra grupos de *C. neoformans* com cápsula induzida e sem indução e mostrou ser promissora com 60 % de efeito sinérgico contra os dois grupos (Rossato et al., 2016).

Esses estudos realizados *in vitro* são necessários pois proporcionam conhecimentos indispensáveis sobre os fármacos estudados, porém é importante avaliar os mesmos em organismos complexos, realizando os ensaios *in vivo* (Scorzoni et al., 2016).

Os modelos animais invertebrados possuem inúmeras vantagens em relação aos modelos convencionais mamíferos, pois possuem baixo custo, resultados mais rápidos, menos questões éticas e estão sendo bem aceitos pela

comunidade científica (Mylonakis et al., 2005; Arvanitis et al., 2013). Devido a essas vantagens os estudos dos compostos com ação antifúngica estão aumentando nesses modelos (Mylonakis et al., 2005; Kavanagh, Sheehan, 2018).

Galleria mellonella é considerada um modelo alternativo para estudo de micro-organismos, entre esses *C. neoformans*. Em *G. mellonella* a levedura pode se proliferar na larva mesmo que ocorra a fagocitose (Mylonakis et al., 2005). A eficácia dos compostos neste modelo alternativo é semelhante ao que ocorre em humanos, porém existem algumas limitações, pois as diferenças nos genótipos, e as condições de manutenção ou reprodução podem interferir nos resultados de susceptibilidade a infecções (Tsai et al., 2016).

O modelo possui sistema imunológico semelhante a resposta imune inata dos mamíferos, a resposta humoral das larvas está relacionada com peptídeos antimicrobianos, propenoloxidase e melanização, coagulação da hemolinfa, espécies reativas de oxigênio e imunização primária, já a resposta imune celular é mediada por hemócitos que dependendo da infecção microbiana ou tratamento com fármacos, a concentração dos mesmos pode variar na hemolinfa, e realizar processos de nodulação, encapsulamento e fagocitose (Kavanagh, Sheehan, 2018; Pereira T et al., 2018; Sheehan, Kavanagh, 2018). Neste estudo, não foram encontradas atividades relacionadas com a resposta imune celular, identificamos que a quantidade de hemócitos não foi alterada após inoculação dos fármacos.

Tratamentos realizados com sertralina em larvas de *G. mellonella* melhoraram a sobrevivência das larvas infectadas com *Aspergillus fumigatus* quando administrado doses de 10 e 15 mg/kg (Treviño-Rangel et al., 2019). A combinação sinérgica de fluoxetina e fluconazol (320 e 128 µg/mL) também mostrou aumento na sobrevivência das larvas infectadas com *Candida albicans* (Gu et al., 2016). Porém, em nosso estudo, em todas as concentrações estudadas, tanto em fármacos isolados quanto em combinações sinérgicas, observamos que os fármacos não apresentaram toxicidade para as larvas, entretanto não

aumentaram a sobrevivência das larvas infectadas com *C. neoformans*. Este fato poderia ser explicado pois os fármacos cloridrato de verapamil, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina, são fármacos altamente lipossolúveis, o tecido adiposo armazena esses compostos e elimina os mesmos lentamente (Bell, 1997; Sun et al., 2015). Mediante o exposto, pressupomos, portanto, que a baixa solubilidade aquosa destes compostos dificulta a sua distribuição no invertebrado, e o tecido adiposo das larvas pode armazenar os fármacos e elimina-los lentamente na hemolinfa o qual não foi suficiente para matar as leveduras antes que as mesmas ocasionassem a morte das larvas. Portanto, o modelo invertebrado apresentou essa limitação quando utilizado para avaliar a eficácia de fármacos lipossolúveis, e este fato foi também descrito em outros estudos envolvendo compostos hidrofóbicos com atividade antifúngica (Mircus et al., 2015; Palanco et al., 2016).

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que os fármacos cloridrato de verapamil, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina apresentam importante ação antifúngica sobre *Cryptococcus neoformans* de acordo com os resultados obtidos *in vitro*, podendo ser considerados potentes para inibição destes patógenos. No modelo *in vivo* *Galleria mellonella*, os fármacos não foram tóxicos e não alteraram a concentração de hemócitos nas larvas, em contrapartida, não aumentaram a sobrevivência das larvas infectadas, o que pode estar relacionado com a lipossolubilidade dos compostos.

REFERÊNCIAS*

- Afeltra J, Verweij PE. Antifungal activity of nonantifungal drugs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003 Jul;22(7):397-407. Epub 2003 Jun 26. Review. PubMed PMID: 12884072
- Agustinho DP, Miller LC, Li LX, Doering TL. Peeling the onion: the outer layers of *Cryptococcus neoformans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(7):e180040.doi: 10.1590/0074-02760180040. Epub 2018 May 7. Review. PubMed PMID: 29742198; PubMed Central PMCID: PMC5951675
- Alvarez M, Casadevall A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol*. 2006 Nov 7;16(21):2161-5. PubMed PMID: 17084702.
- Alvarez M, Casadevall A. Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. *BMC Immunol*. 2007 Aug 16;8:16. PubMed PMID: 17705844; PubMed Central PMCID: PMC1988836.
- Archer DB, Peberdy JF. The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. *Crit Rev Biotechnol*. 1997;17(4):273-306. Review. PubMed PMID: 9397531.
- Arendrup MC. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Jun;20 Suppl 6:42-8. doi: 10.1111/1469-0691.12513. Epub 2014 Feb 3. Review. PubMed PMID: 2437270
- Arvanitis M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E. Invertebrate models of fungal infection. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Sep;1832(9):1378-83. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.03.008. Epub 2013 Mar 19. Review. PubMed PMID: 23517918.
- Azevedo MM, Teixeira-Santos R, Silva AP, Cruz L, Ricardo E, Pina-Vaz C, et al. The effect of antibacterial and non-antibacterial compounds alone or associated with antifungals upon fungi. *Front Microbiol*. 2015 Jul 3;6:669. doi:10.3389/fmicb.2015.00669. eCollection 2015. Review. PubMed PMID: 26191055; PubMed Central PMCID: PMC4490243.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2019 Jan 2019]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Benaducci T, Sardi Jde C, Lourencetti NM, Scorzoni L, Gullo FP, Rossi SA, et al. Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms *In Vitro* and *In Vivo* using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. *Front Microbiol.* 2016 Mar 9;7:290. doi:10.3389/fmicb.2016.00290. eCollection 2016. PubMed PMID: 27014214; PubMed Central PMCID: PMC4783715.

Benson JM, Nahata MC. Clinical use of systemic antifungal agents. *Clin Pharm.* 1988 Jun;7(6):424-38. Review. PubMed PMID: 3042267.

Bicanic T, Harrison TS. Cryptococcal meningitis. *Br Med Bull.* 2005 Apr 18;72:99-118. Print 2004. Review. PubMed PMID: 15838017.

Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med.* 2012 Dec 19;4(165):165rv13. doi: 10.1126/scitranslmed.3004404. Review. PubMed PMID: 23253612.

Casadevall, A.; Perfect, J.R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1998. 541p.

Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol.* 2000 Aug;3(4):354-8. Review. PubMed PMID: 10972493.

Coelho C, Bocca AL, Casadevall A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol.* 2014;87:1-41. doi: 10.1016/B978-0-12-800261-2.00001-3. Review. PubMed PMID: 24581388.

Costa Silva RA, da Silva CR, de Andrade Neto JB, da Silva AR, Campos RS, Sampaio LS, et al. *In vitro* anti-*Candida* activity of selective serotonin reuptake inhibitors against fluconazole-resistant strains and their activity against biofilm-forming isolates. *Microb Pathog.* 2017 Jun;107:341-348. doi: 10.1016/j.micpath.2017.04.008. Epub 2017 Apr 12. PubMed PMID: 28411060.

Cross CE, Bancroft GJ. Ingestion of acapsular *Cryptococcus neoformans* occurs via mannose and beta-glucan receptors, resulting in cytokine production and increased phagocytosis of the encapsulated form. *Infect Immun.* 1995 Jul;63(7):2604-11. PubMed PMID: 7790075; PubMed Central PMCID: PMC173349.

Cruz MC, Bartlett MS, Edlind TD. In vitro susceptibility of the opportunistic fungus *Cryptococcus neoformans* to anthelmintic benzimidazoles. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994 Feb;38(2):378-80. PubMed PMID: 8192471; PubMed Central PMCID: PMC284462.

Day JN, Chau TTH, Wolbers M, Mai PP, Dung NT, Mai NH, et al. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. *N Engl J Med*. 2013 Apr 4;368(14):1291-1302. doi: 10.1056/NEJMoa1110404. PubMed PMID: 23550668; PubMed Central PMCID: PMC3978204.

Delattin N, Cammue BP, Thevissen K. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. *Future Med Chem*. 2014 Jan;6(1):77-90. doi: 10.4155/fmc.13.189. Review. PubMed PMID: 24358949.

Denning DW, Hope WW. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends Microbiol*. 2010 May;18(5):195-204. doi: 10.1016/j.tim.2010.02.004. Epub 2010 Mar 6. Review. PubMed PMID: 20207544.

Fanning S, Mitchell AP. Fungal biofilms. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002585. doi:10.1371/journal.ppat.1002585. Epub 2012 Apr 5. PubMed PMID: 22496639; PubMed Central PMCID: PMC3320593.

Firacative C, Duan S, Meyer W. *Galleria mellonella* model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*. *PLoS One*. 2014 Aug 18;9(8):e105076. doi: 10.1371/journal.pone.0105076. eCollection 2014. PubMed PMID: 25133687; PubMed Central PMCID: PMC4136835.

Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*. 2010 Nov-Dec;1(6):475-82. Epub 2010 Nov 1. PubMed PMID: 21178491.

Gu W, Guo D, Zhang L, Xu D, Sun S. The Synergistic Effect of Azoles and Fluoxetine against Resistant *Candida albicans* Strains Is Attributed to Attenuating Fungal Virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Sep 23;60(10):6179-88. doi: 10.1128/AAC.03046-15. Print 2016 Oct. PubMed PMID: 27503639; PubMed Central PMCID: PMC5038273.

Hamill RJ. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*. 2013 Jun;73(9):919-34. doi: 10.1007/s40265-013-0069-4. Review. PubMed PMID: 23729001.

Harris JR, Lockhart SR, Sondermeyer G, Vugia DJ, Crist MB, D'Angelo MT, et al. *Cryptococcus gattii* infections in multiple states outside the US Pacific Northwest. *Emerg Infect Dis*. 2013 Oct;19(10):1620-6. doi: 10.3201/eid1910.130441. PubMed PMID: 24050410; PubMed Central PMCID: PMC3810751.

Holbrook SYL, Garzan A, Dennis EK, Shrestha SK, Garneau-Tsodikova S. Repurposing antipsychotic drugs into antifungal agents: Synergistic combinations of azoles and bromperidol derivatives in the treatment of various fungal infections. *Eur J Med Chem*. 2017 Oct 20;139:12-21. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.07.030. Epub 2017 Jul 19. PubMed PMID: 28797882

Jarvis JN, Bicanic T, Loyse A, Namarika D, Jackson A, Nussbaum JC, et al. Determinants of mortality in a combined cohort of 501 patients with HIV-associated Cryptococcal meningitis: implications for improving outcomes. *Clin Infect Dis*. 2014 Mar;58(5):736-45. doi: 10.1093/cid/cit794. Epub 2013 Dec 6. PubMed PMID: 24319084; PubMed Central PMCID: PMC3922213.

Joffe LS, Schneider R, Lopes W, Azevedo R, Staats CC, Kmetzsch L, Schrank A, et al. The Anti-helminthic Compound Mebendazole Has Multiple Antifungal Effects against *Cryptococcus neoformans*. *Front Microbiol*. 2017 Mar 28;8:535. doi: 10.3389/fmicb.2017.00535. eCollection 2017. PubMed PMID: 28400768; PubMed Central PMCID: PMC5368277.

Jorjão AL, Oliveira LD, Scorzoni L, Figueiredo-Godoi LMA, Cristina A Prata M, Jorge AOC, et al. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for *in vivo* microbiological studies. *Virulence*. 2018 Jan 1;9(1):383-389. doi: 10.1080/21505594.2017.1397871. PubMed PMID: 29130369; PubMed Central PMCID: PMC5955185.

Junqueira JC. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives. *Virulence*. 2012 Oct 1;3(6):474-6. doi: 10.4161/viru.22493. PubMed PMID: 23211681; PubMed Central PMCID: PMC3524145.

Katragkou A, Roilides E, Walsh TJ. Can repurposing of existing drugs provide more effective therapies for invasive fungal infections? *Expert Opin Pharmacother*. 2016 Jun;17(9):1179-82. doi: 10.1080/14656566.2016.1186647. PubMed PMID: 27217005.

Kauffman CA. New antifungal agents. *Semin Respir Crit Care Med*. 2004 Apr;25(2):233-9. PubMed PMID: 16088465.

Kavanagh K, Sheehan G. The Use of *Galleria mellonella* Larvae to Identify Novel Antimicrobial Agents against Fungal Species of Medical Interest. J Fungi (Basel). 2018 Sep 19;4(3). pii: E113. doi: 10.3390/jof4030113. Review. PubMed PMID: 30235800; PubMed Central PMCID: PMC6162640.

Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Mundy LM. Non-neoformans cryptococcal infections: a systematic review. Infection. 2007 Apr;35(2):51-8. Review. PubMed PMID: 17401707.

Krajewska-Kula E, Niczyporuk W. Effects of the combination of ketoconazole and calcium channel antagonists against *Candida albicans* *in vitro*. Arzneimittelforschung. 1993 Jul;43(7):782-3. PubMed PMID: 8369013.

Lass-Flörl C, Dierich MP, Fuchs D, Semenitz E, Ledochowski M. Antifungal activity against *Candida* species of the selective serotonin-reuptake inhibitor, sertraline. Clin Infect Dis. 2001 Dec 15;33(12):E135-6. Epub 2001 Nov 7. PubMed PMID: 11700578

Lester SJ, Malik R, Bartlett KH, Duncan CG. Cryptococcosis: update and emergence of *Cryptococcus gattii*. Vet Clin Pathol. 2011 Mar;40(1):4-17. doi:10.1111/j.1939-165X.2010.00281.x. Epub 2011 Jan 18. Review. PubMed PMID:21244455.

Lionakis MS. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. Virulence. 2011 Nov-Dec;2(6):521-7. doi: 10.4161/viru.2.6.18520. Review. PubMed PMID: 22186764; PubMed Central PMCID: PMC3260546

Liu S, Hou Y, Chen X, Gao Y, Li H, Sun S. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. Int J Antimicrob Agents. 2014 May;43(5):395-402. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.12.009. Epub 2014 Jan 22. Review. PubMed PMID: 24503221.

Liu S, Yue L, Gu W, Li X, Zhang L, Sun S. Synergistic Effect of Fluconazole and Calcium Channel Blockers against Resistant *Candida albicans*. PLoS One. 2016 Mar 17;11(3):e0150859. doi: 10.1371/journal.pone.0150859. eCollection 2016. PubMed PMID: 26986478; PubMed Central PMCID: PMC4795682.

Maekawa LE, Rossoni RD, Barbosa JO, Jorge AO, Junqueira JC, Valera MC. Different extracts of *Zingiber officinale* decrease *Enterococcus faecalis* infection in *Galleria mellonella*. Braz Dent J. 2015 Mar-Apr;26(2):105-9. doi: 10.1590/0103-6440201300199. PubMed PMID: 25831098.

Martinez LR, Casadevall A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. Infect Immun. 2005 Oct;73(10):6350-62. PubMed PMID: 16177306; PubMed Central PMCID: PMC1230912.

Martinez LR, Casadevall A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Mar;50(3):1021-33. PubMed PMID: 16495265; PubMed Central PMCID: PMC1426450.

Martinez LR, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. Appl Environ Microbiol. 2007 Jul;73(14):4592-601. Epub 2007 May 18. PubMed PMID: 17513597; PubMed Central PMCID: PMC1932807.

Merry M, Boulware DR. Cryptococcal Meningitis Treatment Strategies Affected by the Explosive Cost of Flucytosine in the United States: A Cost-effectiveness Analysis. Clin Infect Dis. 2016 Jun 15;62(12):1564-8. doi: 10.1093/cid/ciw151. Epub 2016 Mar 23. PubMed PMID: 27009249; PubMed Central PMCID: PMC4885648.

Mircus G, Albert N, Ben-Yaakov D, Chikvashvili D, Shadkchan Y, Kontoyiannis DP, et al. Identification and characterization of a novel family of selective antifungal compounds (CANBEFs) that interfere with fungal protein synthesis. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Sep;59(9):5631-40. doi: 10.1128/AAC.00850-15. Epub 2015 Jul 6. PubMed PMID: 26149982; PubMed Central PMCID: PMC4538511.

Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev. 1995 Oct;8(4):515-48. Review. PubMed PMID: 8665468; PubMed Central PMCID: PMC172874.

Mowat E, Butcher J, Lang S, Williams C, Ramage G. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. J Med Microbiol. 2007 Sep;56(Pt 9):1205-12. PubMed PMID: 17761484.

Mpoza E, Rhein J, Abassi M. Emerging fluconazole resistance: Implications for the management of cryptococcal meningitis. Med Mycol Case Rep. 2017 Nov 26;19:30-32. doi: 10.1016/j.mmcr.2017.11.004. eCollection 2018 Mar. PubMed PMID: 29234588; PubMed Central PMCID: PMC5723366.

Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. Infect Immun. 2005 Jul;73(7):3842-50. PubMed PMID:15972469; PubMed Central PMCID: PMC1168598.

Nazik H, Choudhary V, Stevens DA. Verapamil Inhibits *Aspergillus* Biofilm, but Antagonizes Voriconazole. J Fungi (Basel). 2017 Sep 20;3(3). pii: E50. doi: 10.3390/jof3030050. PubMed PMID: 29371566; PubMed Central PMCID: PMC5715943.

Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. JAntimicrob Chemother. 2003 Jul;52(1):1. Epub 2003 Jun 12. PubMed PMID: 12805255.

Ogundeji AO, Pohl CH, Sebolai OM. Repurposing of Aspirin and Ibuprofen as Candidate Anti-*Cryptococcus* Drugs. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Jul 22;60(8):4799-808. doi: 10.1128/AAC.02810-15. Print 2016 Aug. PubMed PMID: 27246782; PubMed Central PMCID: PMC4958236.

Okagaki LH, Strain AK, Nielsen JN, Charlier C, Baltes NJ, Chrétien F, Heitman J, et al. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. PLoS Pathog. 2010 Jun 17;6(6):e1000953. doi: 10.1371/journal.ppat.1000953. Erratum in: PLoS Pathog. 2010;6(6). doi: 10.1371/annotation/1b59fd9e-9ac9-4ea8-a083-14c413c80b03. PubMed PMID: 20585559; PubMed Central PMCID: PMC2887476.

Oliveira AS, Gaspar CA, Palmeira-de-Oliveira R, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira A. Anti-*Candida* activity of fluoxetine alone and combined with fluconazole: a synergistic action against fluconazole-resistant strains. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Jul;58(7):4224-6. doi: 10.1128/AAC.02623-13. Epub 2014 May 5. PubMed PMID: 24798281; PubMed Central PMCID: PMC4068595.

Oliveira AS, Martinez-de-Oliveira J, Donders GGG, Palmeira-de-Oliveira R, Palmeira-de-Oliveira A. Anti-*Candida* activity of antidepressants sertraline and fluoxetine: effect upon pre-formed biofilms. *Med Microbiol Immunol*. 2018 Aug;207(3-4):195-200. doi: 10.1007/s00430-018-0539-0. Epub 2018 Mar 19. PubMed PMID: 29556778.

Oprea TI, Bauman JE, Bologna CG, Buranda T, Chigaev A, Edwards BS, et al. Drug Repurposing from an Academic Perspective. *Drug Discov Today Ther Strateg*. 2011 Winter;8(3-4):61-69. PubMed PMID: 22368688; PubMed Central PMCID: PMC3285382.

Palanco AC, Lacorte Singulani J, Costa-Orlandi CB, Gullo FP, Strohmayer Lourencetti NM, Gomes PC, et al. Activity of 3'-hydroxychalcone against *Cryptococcus gattii* and toxicity, and efficacy in alternative animal models. *Future Microbiol*. 2017 Oct;12:1123-1134. doi: 10.2217/fmb-2017-0062. Epub 2017 Sep 6. PubMed PMID: 28876122

Panepinto JC, Komperda KW, Hacham M, Shin S, Liu X, Williamson PR. Binding of serum mannan binding lectin to a cell integrity-defective *Cryptococcus neoformans* ccr4Delta mutant. *Infect Immun*. 2007 Oct;75(10):4769-79. Epub 2007 Jul 23. PubMed PMID: 17646356; PubMed Central PMCID: PMC2044520.

Pereira MF, Rossi CC, de Queiroz MV, Martins GF, Isaac C, Bossé JT, et al. *Galleria mellonella* is an effective model to study *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Microbiology*. 2015 Feb;161(Pt 2):387-400. doi: 10.1099/mic.0.083923-0. Epub 2014 Nov 20. PubMed PMID: 25414045.

Pereira TC, de Barros PP, Fugisaki LRO, Rossoni RD, Ribeiro FC, de Menezes RT, et al. Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. *J Fungi (Basel)*. 2018 Nov 27;4(4). pii: E128. doi: 10.3390/jof4040128. Review. PubMed PMID: 30486393.

Perfect JR, Cox GM. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Drug Resist Updat*. 1999 Aug;2(4):259-269. PubMed PMID: 11504497.

Rakesh V, Schweitzer AD, Zaragoza O, Bryan R, Wong K, Datta A, et al. Finite-element model of interaction between fungal polysaccharide and monoclonal antibody in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *J Phys Chem B*. 2008 Jul 24;112(29):8514-22. doi: 10.1021/jp8018205. Epub 2008 Jun 28. PubMed PMID: 18588334; PubMed Central PMCID: PMC2680236.

Ramage G, Williams C. The clinical importance of fungal biofilms. *Adv Appl Microbiol.* 2013;84:27-83. doi: 10.1016/B978-0-12-407673-0.00002-3. Review. PubMed PMID: 23763758.

Retini C, Vecchiarelli A, Monari C, Bistoni F, Kozel TR. Encapsulation of *Cryptococcus neoformans* with glucuronoxylomannan inhibits the antigen-presenting capacity of monocytes. *Infect Immun.* 1998 Feb;66(2):664-9. PubMed PMID: 9453624; PubMed Central PMCID: PMC107954.

Richardson M, Lass-Flörl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2008 May;14 Suppl 4:5-24. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.01978.x. Review. PubMed PMID: 18430126.

Rivera J, Feldmesser M, Cammer M, Casadevall A. Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection. *Infect Immun.* 1998 Oct;66(10):5027-30. PubMed PMID: 9746613; PubMed Central PMCID: PMC108624.

Rossato L, Loreto ÉS, Zanette RA, Chassot F, Santurio JM, Alves SH. *In vitro* synergistic effects of chlorpromazine and sertraline in combination with amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. *Folia Microbiol. (Praha).* 2016;doi: 10.1007/s12223-016-0449-8. Epub 2016 Feb 4. PubMed PMID: 26847460.

Sangalli-Leite F, Scorzoni L, Alves de Paula E Silva AC, da Silva JF, de Oliveira HC, de Lacorte Singulani J, et al. Synergistic effect of pedalitin and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* by *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Int J Antimicrob Agents.* 2016 Nov;48(5):504-511. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.07.025. Epub 2016 Sep 29. PubMed PMID: 27742203

Santos JR, Gouveia LF, Taylor EL, Resende-Stoianoff MA, Pianetti GA, César IC, et al. Dynamic interaction between fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 May;56(5):2553-8. doi:10.1128/AAC.06098-11. Epub 2012 Jan 30. PubMed PMID: 22290956; PubMed Central PMCID: PMC3346628

Scorzoni L, de Paula E Silva AC, Marcos CM, Assato PA, de Melo WC, de Oliveira HC, et al. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Front Microbiol.* 2017 Jan 23;8:36. doi: 10.3389/fmicb.2017.00036. eCollection 2017. Review. PubMed PMID: 28167935; PubMed Central PMCID: PMC5253656.

Scorzoni L, Sangalli-Leite F, de Lacorte Singulani J, de Paula E Silva AC, Costa-Orlandi CB, Fusco-Almeida AM, et al. Searching new antifungals: The use of *in vitro* and *in vivo* methods for evaluation of natural compounds. *J Microbiol Methods*. 2016 Apr;123:68-78. doi: 10.1016/j.mimet.2016.02.005. Epub 2016 Feb 4. Review. PubMed PMID: 26853122.

Sheehan G, Kavanagh K. Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Virulence*. 2018 Jan 1;9(1):163-172. doi: 10.1080/21505594.2017.1370174. Epub 2017 Sep 21. PubMed PMID: 28872999; PubMed Central PMCID: PMC5955201.

Smith KD, Achan B, Hullsiek KH, McDonald TR, Okagaki LH, Alhadab AA, et al. Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Dec;59(12):7197-204. doi: 10.1128/AAC.01299-15. Epub 2015 Aug 31. PubMed PMID: 26324276; PubMed Central PMCID: PMC4649209.

Spitzer M, Robbins N, Wright GD. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. *Virulence*. 2017 Feb 17;8(2):169-185. doi: 10.1080/21505594.2016.1196300. Epub 2016 Jun 7. Review. PubMed PMID: 27268286; PubMed Central PMCID: PMC5354157.

Sun W, Wang D, Yu C, Huang X, Li X, Sun S. Strong synergism of dexamethasone in combination with fluconazole against resistant *Candida albicans* mediated by inhibiting drug efflux and reducing virulence. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 Sep;50(3):399-405. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.03.015. Epub 2017 Jun 30. PubMed PMID: 28673609.

Sun X, Sun X, Liu T, Zhao M, Zhao S, Xiao T, et al. Fluoxetine enhanced neurogenesis is not translated to functional outcome in stroke rats. *Neurosci Lett*. 2015 Aug 31;603:31-6. doi: 10.1016/j.neulet.2015.06.061. Epub 2015 Jul 18. PubMed PMID: 26197054.

Trevijano-Contador N, Zaragoza O. Expanding the use of alternative models to investigate novel aspects of immunity to microbial pathogens. *Virulence*. 2014 May 15;5(4):454-6. doi: 10.4161/viru.28775. Epub 2014 Apr 9. PubMed PMID: 24717215; PubMed Central PMCID: PMC4063805.

Treviño-Rangel RJ, Villanueva-Lozano H, Méndez-Galomo KS, Solís-Villegas EM, Becerril-García MA, Montoya AM, et al. *In vivo* evaluation of the antifungal activity of sertraline against *Aspergillus fumigatus*. J Antimicrob Chemother. 2019 Mar 1;74(3):663-666. doi: 10.1093/jac/dky455. PubMed PMID: 30403787.

Truong M, Monahan LG, Carter DA, Charles IG. Repurposing drugs to fast-track therapeutic agents for the treatment of cryptococcosis. PeerJ. 2018 May 4;6:e4761. doi: 10.7717/peerj.4761. eCollection 2018. PubMed PMID: 29740519; PubMed Central PMCID: PMC5937474.

Tsai CJ, Loh JM, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. Virulence. 2016 Apr 2;7(3):214-29. doi: 10.1080/21505594.2015.1135289. Epub 2016 Jan 5. Review. PubMed PMID: 26730990; PubMed Central PMCID: PMC4871635.

Van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Nov;46(11):3394-400. PubMed PMID: 12384341; PubMed Central PMCID: PMC128748.

Vidal JE, Toniolo C, Paulino A, Colombo A, Dos Anjos Martins M, da Silva Meira C, et al. Asymptomatic cryptococcal antigen prevalence detected by lateral flow assay in hospitalised HIV-infected patients in São Paulo, Brazil. Trop Med Int Health. 2016 Dec;21(12):1539-1544. doi: 10.1111/tmi.12790. Epub 2016 Oct 24. PubMed PMID: 27699970.

Vidotto V, Sinicco A, Di Fraia D, Cardaropoli S, Aoki S, Ito-Kuwa S. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. Mycopathologia. 1996 1997;136(3):119-23. PubMed PMID: 9276940.

Wilson JW. Cryptococcosis; torulosis, European blastomycosis, Busse-Buschke's disease. J Chronic Dis. 1957 Apr;5(4):455-59. PubMed PMID: 13416357.

Wu JQ, Shao K, Wang X, Wang RY, Cao YH, Yu YQ, et al. *In vitro* and *in vivo* evidence for amphotericin B as a P-glycoprotein substrate on the blood-brain barrier. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Aug;58(8):4464-9. doi: 10.1128/AAC.02535-14. Epub 2014 May 27. PubMed PMID: 24867970; PubMed Central PMCID: PMC4136029.

Yu Q, Ding X, Xu N, Cheng X, Qian K, Zhang B, et al. *In vitro* activity of verapamil alone and in combination with fluconazole or tunicamycin against *Candida albicans* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Feb;41(2):179-82. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.10.009. Epub 2012 Dec 21. PubMed PMID: 23265915.

Yu Q, Ding X, Zhang B, Xu N, Jia C, Mao J, et al. Inhibitory effect of verapamil on *Candida albicans* hyphal development, adhesion and gastrointestinal colonization. *FEMS Yeast Res*. 2014 Jun;14(4):633-41. doi: 10.1111/1567-1364.12150. Epub 2014 Apr 3. PubMed PMID: 24650198.

Zaragoza O, Casadevall A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol Proced Online*. 2004;6:10-15. Epub 2004 Mar 3. PubMed PMID: 15103395; PubMed Central PMCID: PMC389900.

Zaragoza O, Chrisman CJ, Castelli MV, Frases S, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL, et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol*. 2008 Oct;10(10):2043-57. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01186.x. Epub 2008 Jun 28. PubMed PMID: 18554313; PubMed Central PMCID: PMC4405381.

Zaragoza O, Mihiu C, Casadevall A, Nosanchuk JD. Effect of amphotericin B on capsule and cell size in *Cryptococcus neoformans* during murine infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Oct;49(10):4358-61. PubMed PMID: 16189121; PubMed Central PMCID: PMC1251559.

Zaragoza O, García-Rodas R, Nosanchuk JD, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL, Casadevall A. Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathog*. 2010 Jun 17;6(6):e1000945. doi: 10.1371/journal.ppat.1000945. Erratum in: *PLoS Pathog*. 2010;6(6). doi: 10.1371/annotation/0675044c-d80f-456f-bb63-4f85fb1d0c33. PubMed PMID: 20585557; PubMed Central PMCID: PMC2887474.

Zaragoza O, Taborda CP, Casadevall A. The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. *Eur J Immunol*. 2003 Jul;33(7):1957-67. PubMed PMID:12884862.

Zhai B, Wu C, Wang L, Sachs MS, Lin X. The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jul;56(7):3758-66. doi: 10.1128/AAC.00212-12. Epub 2012 Apr 16. PubMed PMID: 22508310; PubMed Central PMCID: PMC3393448.