



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

LETÍCIA RAMPAZZO DA GAMA VIVEIRO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIFÚNGICOS DE FÁRMACOS
INIBIDORES SELETIVOS DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA
EM *Cryptococcus gattii***

2023

LETÍCIA RAMPAZZO DA GAMA VIVEIRO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIFÚNGICOS DE FÁRMACOS INIBIDORES
SELETIVOS DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA EM *Cryptococcus gattii***

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 CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Microbiologia e Imunologia. Linha de pesquisa: Agentes antimicrobianos e métodos de controle para infecções de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Dra. Liliana Scorzoni

São José dos Campos

2023

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2023]. 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).

Viveiro, Letícia Rampazzo da Gama

Avaliação dos efeitos antifúngicos de fármacos inibidores seletivos da recaptação de serotonina em *Cryptococcus gattii* / Letícia Rampazzo da Gama Viveiro. - São José dos Campos : [s.n.], 2023.
61 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2023.

Orientadora: Liliana Scorzoni.

1. *Cryptococcus gattii*. 2. Biofilme. 3. Antifúngico. 4. Inibidores seletivos da recaptação de serotonina. 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

Prof^a. Dr^a. Liliana Scorzoni (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof^a. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof^a. Dr^a. Cristina Pacheco Soares

Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 20 de março de 2023.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Roseli Rampazzo da Gama por ser minha maior força e inspiração na vida e ao meu pai Marcelo Guimarães Viveiro (*in memorian*) por todo o amor, carinho e dedicação. Agradeço-lhes por tudo de bom que fizeram por mim.

Ao meu filho, Henrique que a cada dia me motiva a ser uma pessoa melhor.

À minha família, que está comigo presente em todos os momentos e etapas da minha vida.

Ao meu namorado, Josué Juliano Adib Da Hora Oliveira, pelo carinho, paciência, motivação e por acreditar em meus sonhos. Tê-lo ao meu lado tornou essa caminhada mais tranquila.

Aos meus amigos, pelo incentivo, alegria e apoio também nos momentos críticos e por estarem juntos comigo nesta etapa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais: Roseli Rampazzo e Marcelo Viveiro (*in memorian*), que me educaram e me apoiam em todas as minhas decisões. Obrigada por sempre se esforçarem para que eu pudesse ter uma boa educação. Eu amo vocês e prometo sempre ser o orgulho de vocês.

Agradeço ao meu filho Henrique por me ensinar tanto todos os dias sobre amor, paciência e a viver um dia de cada vez.

Agradeço ao meu namorado Josué Da Hora que é um exemplo de dedicação e força de vontade, que diariamente está comigo em todos os momentos me inspirando a ir atrás dos meus sonhos.

Agradeço à toda minha família pelo apoio constante nessa jornada.

À minha amiga, Amanda Rehem, que compartilhei todos os momentos deste mestrado, trabalhando comigo e tornando os dias mais alegres.

Agradeço a todos os colegas de laboratório, em especial à Maira, Evelyn, Livia e Paulo por estarem sempre dispostos a tirarem minhas dúvidas e me proporcionar momentos de muito aprendizado no laboratório.

À Professora Juliana Campos Junqueira, por ser extremamente atenciosa e sempre dispostas a me ajudar.

À minha orientadora Dr^a. Liliana Scorzoni, que me ensinou a ser uma profissional melhor, sempre disposta a ajudar e orientar com muito carinho, paciência e sabedoria.

Agradeço aos membros da equipe da Seção Técnica de Pós-graduação, do Escritório de Apoio à Pesquisa e Internacionalização e à secretária Carla por sempre estarem

dispostos a solucionar nossas dúvidas, com muita paciência, sendo gentis e atenciosos com todos.

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

"... On ne peut rien écrire dans l'indifférence. " Simone de Beauvoir

RESUMO

Viveiro LRG. Avaliação dos efeitos antifúngicos de fármacos inibidores seletivos da recaptação de serotonina em *Cryptococcus gattii* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2023.

A criptococose é uma infecção fúngica que acomete tanto indivíduos imunocomprometidos como imunocompetentes. O arsenal antifúngico é limitado, existem relatos de desenvolvimento de resistência fúngica a esses compostos e também alta toxicidade ao paciente. O reposicionamento de fármacos dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) tem mostrado ação contra espécies fúngicas, tornando estes compostos alternativas a serem estudadas para o tratamento das infecções criptocócicas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos antifúngicos em cápsula, biofilme e células planctônicas de *Cryptococcus gattii* (cepa ATCC 56990 e isolado clínico 5) dos fármacos ISRS, cloridrato de fluoxetina (CF) e cloridrato de paroxetina (CP). Para isso, foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo de acordo com European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), sendo a CIM de 31,25 µg/mL determinada para os fármacos CF e CP e ambos os fármacos demonstraram ação fungicida (CIM/CFM = 1). Em seguida foi verificada atividade sinérgica dos fármacos CF e CP combinados com anfotericina B (AmB), como resultado encontramos três concentrações sinérgicas, para CF reduzindo 8 e 4x em relação ao valor de CIM, para CP reduzindo 4x em relação ao valor de CIM e para AmB houve redução de 4x em relação ao valor de CIM. Posteriormente, o efeito dos fármacos mencionados foi avaliado na redução da biomassa do biofilme, por meio da técnica de cristal violeta. Nas concentrações 10x (312,5 µg/mL) e 20x (625 µg/mL) CIM observou-se a redução da biomassa do biofilme de *C. gattii* em 57,72% a 76,66% para CF e redução entre 42,69 a 68,03% para CP. Além disso, em concentrações sub-inibitórias, ambos os fármacos reduziram o tamanho da cápsula da levedura em até 62,46% para CF e 58,94% para CP. Também foi analisada a viabilidade do biofilme pela contagem de unidades formadoras de colônia/mL, após tratamento com CF e CP 20x valor de CIM e foi observada redução entre 1,21 a 1,446 log na viabilidade do biofilme ($p < 0,0001$). Ainda, o efeito dos fármacos em biofilme foi avaliado quanto ao efeito na atividade metabólica pelo ensaio XTT nas concentrações 10x e 20x CIM de ambos os fármacos foi possível observar redução entre 39,05% a 84,62% para CF e redução entre 56,99% a 67,64% para CP. Assim, os fármacos avaliados apresentaram potencial antifúngico frente *C. gattii* em todos os ensaios *in vitro*, podendo ser considerados novas alternativas para o tratamento deste patógeno.

Palavras-chave: *Cryptococcus gattii*; biofilme; antifúngicos; inibidores seletivos da recaptação de serotonina; cloridrato de fluoxetina; cloridrato de paroxetina;

ABSTRACT

Viveiro LRG. Evaluation of the antifungal effects of selective serotonin reuptake inhibitors in *Cryptococcus gattii* [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2023.

Cryptococcosis is a fungal infection that affects both immunocompromised and immunocompetent individuals. The antifungal arsenal is limited, there are reports of the development of fungal resistance to these compounds and also high toxicity to the patient. The drug repositioning of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) has shown action against fungal species, making these compounds alternatives to be studied for the treatment of cryptococcal infections. Thus, the aim of this study was to evaluate the antifungal effects on capsule, biofilm and planktonic cells of *Cryptococcus gattii* (ATCC strain 56990 and clinical isolate 5) of the SSRI drugs, fluoxetine hydrochloride (FLH) and paroxetine hydrochloride (PAH). For this, the broth microdilution technique was used according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), and the MIC of 31.25 µg/mL was determined for the drugs (FLH) and PAH and both drugs demonstrated fungicidal action (MIC/CFM = 1). Then it was verified synergistic activity of the drugs FLH and PAH combined with amphotericin B (AmB), as a result we found three synergistic concentrations, for FLH reducing 8 and 4x compared to the MIC value, for PAH reducing 4x compared to the MIC value and for AmB there was 4x reduction compared to the MIC value. Subsequently, the effect of the mentioned drugs was evaluated in the reduction of biofilm biomass by means of the crystal violet technique. At 10x (312.5 µg/mL) and 20x (625 µg/mL) MIC concentrations of it was observed the reduction of *C. gattii* biofilm biomass by 57.72% to 76.66% for FLH and reduction between 42.69 to 68.03% for PAH. Furthermore, at sub-inhibitory concentrations, both drugs reduced the yeast capsule size by up to 62.46% for FLH and 58.94% for PAH. The biofilm viability was also analyzed by counting colony forming units/mL, after treatment with FC and CP 20x the MIC value and a reduction between 1.21 to 1.446 log in biofilm viability was observed ($p < 0.0001$). Also, the effect of the drugs in biofilm was evaluated as the effect on the metabolic activity by the XTT assay in concentrations 10x and 20x MIC of both drugs was possible to observe reduction between 39.05% to 84.62% for FC and reduction between 56.99% to 67.64% for CP. Thus, the drugs evaluated showed antifungal potential against *C. gattii* in all in vitro assays, and may be considered new alternatives for the treatment of this pathogen.

Keywords: *Cryptococcus gattii*; biofilm; antifungal; serotonin reuptake inhibitors; fluoxetine hydrochloride; paroxetine hydrochloride;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Infecções Fúngicas e Criptococose.....	14
2.2 Terapia Convencional para Criptococose	16
2.3 Reposicionamento de Fármacos Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina.....	18
3 PROPOSIÇÃO	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Microrganismos e condições de cultivo.....	22
4.2 Fármacos e antifúngicos	22
4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	23
4.4 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)	24
4.5 Avaliação da atividade sinérgica dos fármacos ISRS com anfotericina B.....	25
4.6 Efeitos dos fármacos ISRS sobre a cápsula de <i>Cryptococcus gattii</i>	26
4.7 Efeito dos fármacos ISRS no conteúdo do ergosterol.....	28
4.8 Avaliação dos compostos frente a biofilme de <i>Cryptococcus gattii</i>	29
4.8.1 Formação e tratamento do biofilme	29
4.8.2 Efeito dos fármacos na biomassa do biofilme.....	29
4.8.3 Determinação do efeito dos fármacos na viabilidade do biofilme por determinação do número de Unidades Formadora de Colônia por mililitro (UFC/mL)	31
4.8.4 Atividade metabólica dos microrganismos pelo teste de XTT	33
4.9 Análise estatística	34
5 RESULTADO	35
5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	35
5.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	35
5.3 Determinação do efeito combinatório dos compostos com anfotericina B	36
5.4 Avaliação dos fármacos ISRS sobre a cápsula de <i>Cryptococcus gattii</i>	37
5.5 Efeito dos fármacos ISRS no conteúdo do ergosterol.....	39

5.6 Atividade antibiofilme dos fármacos ISRS.....	40
5.6.1. Efeito dos fármacos ISRS na biomassa do biofilme de <i>C. gattii</i>	40
5.6.2 Determinação do efeito dos fármacos ISRS na viabilidade do biofilme por determinação do número de Unidades Formadora de Colônia por mililitro (UFC/mL)	43
5.6.3 Avaliação da viabilidade do biofilme pelo ensaio de XTT.....	44
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas destacaram-se nos últimos anos como um problema de saúde pública devido ao aumento na incidência de casos tanto em pessoas imunocomprometidas quanto em pessoas imunocompetentes (Gullo et al., 2013; Martinez, Fries, 2010). Atualmente estima-se que as micoses, doenças causadas por fungos, atingem mais de 300 milhões de pessoas no mundo e cerca de 25 milhões correm grave risco de óbito, segundo dados apresentados pelo Global Action Fund for Fungal Infections (GAFFI - Fundo Global de Ações contra Infecções Fúngicas) (Guo, 2022). Podemos citar *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Paracoccidioides* spp. como os principais responsáveis pelas doenças fúngicas invasivas (DFI) (Svedese et al., 2022).

De acordo com as características epidemiológicas, bioquímicas e a especificidade antigênica distinguem-se em cinco sorotipos e oito genótipos moleculares de *Cryptococcus* que foram fundamentados com base nas diferenças estruturais capsulares, do DNA e entre o sequenciamento genômico desses sorotipos (Severo et al., 2009). Logo as cepas com sorotipos A, D e AD e genótipos VNI, VNII, VNIII e VNIV pertencem a *C. neoformans*, enquanto as cepas com sorotipos B e C e genótipos VGI, VGII, VGII e VGIV pertencem a *C. gattii* (Chayakulkeeree, Perfect, 2006; Júnior et al., 2017), sendo capazes de manifestar-se como uma infecção oportunista em indivíduos imunocomprometidos - *C. neoformans*, ou como uma infecção primária em indivíduos imunocompetentes - *C. gattii* (Santos, Figueiredo, 2021).

Cryptococcus spp. é uma levedura capsulada, em que a capsula é composta principalmente pelos polissacarídeos glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM) (Colombo et al., 2019). A cápsula desempenha uma função protetora durante a infecção, visto que exerce um papel inibitório contra a fagocitose de modo a diminuir a capacidade dos macrófagos na apresentação dos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) as células T, ou seja, a presença da cápsula oculta a presença do patógeno, impedindo a ligação com macrófagos e consequentemente a fagocitose, repercutindo em uma redução na resposta humoral ou alérgica do hospedeiro (Zaragoza, 2019). Em conjunto com a

ação das enzimas urease, fosfolipases, proteinases e fenol-oxidase associadas à proteção contra o estresse oxidativo, constituem os principais fatores de virulência para as leveduras dessa espécie (Pessoa et al., 2012).

A formação do biofilme atribui maior resistência aos microrganismos para ampliarem os mecanismos de defesa frente aos antifúngicos, meio ambiente e hospedeiros (Gullo et al., 2013). Biofilme é definido pelo conjunto de microrganismos que ao agruparem-se formam microcolônias (Ramage et al., 2009) e que tem habilidade de aderir tanto em superfícies abióticas quanto em tecidos. Essa adesão é facilitada por produtos metabólicos e uma matriz de polímeros extracelular que age como uma barreira reduzindo a eficiência de drogas antifúngicas (Martinez, Casadevall, 2006; Ramage et al., 2012). Os biofilmes possuem uma espécie de comunicação, “quorum sensing”, que auxilia na regulação de características relacionadas desde à sobrevivência como as determinantes da patogenicidade (Harding et al., 2009).

De forma geral, a infecção inicialmente atinge os pulmões ocorrendo de maneira assintomática ou minimamente sintomática para posteriormente se espalhar para os tecidos extrapulmonares (Zavala, Baddley, 2020; Perfect, Casadevall, 2002). *Cryptococcus* spp. utiliza o cérebro como um nicho de sobrevivência (Maziarz, Perfect, 2016) em consequência da elevada concentração de nutrientes assimiláveis pelo fungo presentes no líquido cefalorraquidiano (LCR) e a falta de atividade do sistema complemento neste local com baixa atividade de uma resposta inflamatória no tecido cerebral (Severo et al., 2009). Desse modo ocorre o comprometimento do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo a meningoencefalite a principal manifestação clínica da criptococose com índices consideráveis de mortalidade (Pereira et al., 2021).

As estratégias para a escolha do antifúngico no tratamento da criptococose depende do sítio de infecção tal qual a imunidade do paciente, deste modo os principais antifúngicos utilizados são a anfotericina B, o fluconazol e a flucitosina, muitas vezes sendo usados em combinação devido ao surgimento de resistência em monoterapias (Spadari et al., 2020; Perfect, Casadevall, 2002). Apesar da eficácia, os fármacos utilizados apresentam limitações farmacocinéticas e alta toxicidade celular para o hospedeiro, especialmente uma nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (Monk et al., 2020) em razão da semelhança entre a célula fúngica e a célula humana (Rodrigues, Nosanchuk, 2020). Outro grande desafio no tratamento da meningite

criptocócica e de infecções fúngicas disseminadas para o SNC se deve pela fraca penetração dos antifúngicos convencionais através da barreira hematoencefálica (BHE) (Zhai et al., 2012).

Assim, em virtude tanto do aumento de cepas resistentes aos fármacos antifúngicos convencionais quanto pelo aumento destas infecções em indivíduos imunocompetentes e imunossuprimidos, se faz necessário o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento das micoses sistêmicas. Nesta busca por novas tecnologias encontram-se alternativas promissoras desde o uso das nanopartículas, o reposicionamento de fármacos, a imunoterapia e a terapia fotodinâmica na distribuição dos fármacos para o local específico da infecção (Scorzoni et al., 2017; Scorzoni et al., 2016; Gullo et al., 2013).

O reposicionamento de fármacos é uma estratégia interessante, é mais rápida, barata e segura, uma vez que utiliza drogas já conhecidas para novos fins terapêuticos (Pushpakom et al., 2019). Diversos estudos demonstram que os antidepressivos da classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina têm apresentado resultados bastante promissores quanto a atividade antifúngica frente a *Cryptococcus neoformans* (Costa Silva et al., 2017; Pereira et al., 2021).

AS infecções fúngicas são descritas como doenças negligenciadas são de difícil diagnóstico e tratamento, sendo responsáveis por altas taxas de mortalidade por todo mundo. Um caminho promissor no tratamento contra *C. gattii* é o reposicionamento de fármacos, que se apresenta vantajoso devido ao prévio conhecimento das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas das substâncias, sendo capaz de diminuir consideravelmente custos e o tempo relacionados ao desenvolvimento de um novo fármaco. A classe dos fármacos Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (IRSS) já se destacam com resultados promissores em diversos estudos frente a infecções fúngicas, com *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp.

Apesar disso, ainda são escassos ou mesmo inexistente os estudos sobre a atividade antifúngica dos ISRSs, particularmente o cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina, frente a *Cryptococcus gattii*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções Fúngicas e Criptococose

Os fungos são organismos heterotróficos e eucarióticos, isto é, suas células contêm material genético envolto por um núcleo definido e delimitado por uma membrana celular, podendo distinguir-se morfológicamente em unicelulares (leveduriformes) ou multicelulares (filamentosos) (Botelho, 2021; Carmin et al., 2021). Os fungos difundiram-se extensamente ao redor do mundo sendo encontrados em abundância na natureza, no solo, em vegetais, em animais, no homem e em detritos no geral (Cavalcante et al., 2021; Queiroz et al., 2006).

Em humanos, os fungos podem ser patógenos verdadeiros, oportunistas ou transitórios da microbiota (Fajardo et al., 2017; Rangel et al., 2016). Diferentes espécies que podem causar diversas doenças em humanos, sendo essas classificadas em Micoses Superficiais - aquelas que atingem a parte superficial da pele e haste dos pelos; Cutâneas - os fungos atingem as camadas mais profundas da pele, pelos ou unha; e Sistêmicas - causadas por fungos patogênicos que têm como porta de entrada o trato respiratório e podem disseminar para todo o organismo (Steidinger et al., 2019).

Micoses denominadas sistêmicas são infecções profundas disseminadas por todo o organismo, podendo ter o trato respiratório como porta de entrada através da inalação de esporos ou propágulos fúngicos encontrados no ambiente (Maziarz, Perfect, 2016; Perfect, Casadevall, 2002). Destacam-se entre os fungos causadores de micoses sistêmicas e oportunistas os gêneros: *Paracoccidioides*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces* e *Cryptococcus* (Prado et al., 2009), sendo o *Cryptococcus gattii* o agente etiológico de estudo neste trabalho.

A patogenicidade dos fungos envolve mecanismos complexos que ainda não estão totalmente esclarecidos, de modo que cepas de *C. neoformans* crescem mais rapidamente no cérebro ocasionando óbitos por meningoencefalite e apenas 35% dos pacientes apresentaram infecção pulmonar, enquanto as cepas de *C. gattii* crescem mais rapidamente nos pulmões, aproximadamente 70% dos casos, ocasionando

óbitos sem a presença de uma meningoencefalite fatal (Ngamskulrungrroj et al., 2012). Infecções causadas por *C. gattii* ocorrem predominantemente em hospedeiros saudáveis (Santos, Figueiredo, 2021).

Cryptococcus gattii é tipicamente encontrado em espécies de eucaliptos e considerado endêmico em regiões tropicais e subtropicais, mas nas últimas décadas tem ocorrido relatos de propagação em novos nichos geográficos, como o aparecimento de infecção por *C. gattii* na Ilha de Vancouver e British Columbia (BC), no Canadá e no Noroeste do Pacífico dos Estados Unidos (Harris et al., 2011; Kidd et al., 2004; Zavala, Baddley, 2020).

Em 2010, (Perfect et al., 2010) constataram que infecções por *C. gattii* estão associadas a maiores complicações neurológicas e a uma resposta tardia às terapias do que a infecção por *C. neoformans*, apesar de ambas as espécies apresentarem propensões semelhantes aos fármacos antifúngicos quando testados *in vitro* e seguirem os mesmos protocolos de tratamento. Contudo em 2016, (Maziarz, Perfect, 2016) evidenciaram que a compreensão dos subtipos moleculares de *Cryptococcus* spp. pode elucidar diferenças entre a apresentação clínica das espécies, predileções pelo hospedeiro e a presença ou não de condições preexistentes, incluindo defeitos imunológicos subclínicos que implicam fatores de risco para esta infecção.

Cryptococcus spp. pode prolongar sua latência dentro das células hospedeiras por anos, visto que a maioria dos seres humanos tem contato com o microrganismo ainda na primeira infância, onde pode ocorrer manifestações como uma pneumonia não reconhecida (Alanio et al., 2015), no entanto é controlada pelo sistema imunológico até que ocorra alguma imunossupressão e a infecção se torne latente (Alanio et al., 2015; do Carmo et al., 2022).

A origem dessas diferenças entre espécies de *Cryptococcus* pode envolver desde o modo como a passagem das leveduras ocorre através da barreira hematoencefálica, onde são transportadas como células livres ou dentro de células fagocitárias mononucleares, mecanismo cavalo de Tróia, aumentando a fagocitose e a transmigração de leveduras dentro das células THP-1 (Gibson, Johnston, 2015; Sorrell et al., 2016), quanto a uma inibição na migração de neutrófilos para os pulmões durante o estágio inicial da infecção e um lapso na produção de citocinas protetoras, como o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) e Interferon-gama (IFN- γ), que acabam suprimindo as respostas imunes do hospedeiro de maneira mais efetiva

(Cheng et al., 2009).

Até o momento, quanto as diferenças clínicas, há evidências em estudos com modelos murinos que *C. gattii* tem um nicho de infecções pulmonares maior do que a propagação para o SNC (Ngamskulrungron et al., 2012).

Biofilme são mecanismos de virulências que podem ser definidos como comunidades biológicas que possuem elevado grau de organização, onde microrganismos de uma única ou diferentes espécies formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais com habilidade de aderir a superfícies bióticas ou abióticas (Davey, O'toole, 2000). São envoltos por uma matriz extracelular que além de favorecer a adesão a superfícies também conferem proteção contra drogas antifúngicas, o sistema imunológico do hospedeiro e ao meio ambiente (Martinez, Casadevall, 2006; Ramage et al., 2012).

Além disso, possuem um mecanismo de comunicação, denominado “quorum sensing”, o qual, através da regulação gênica permite ao microrganismo restringir expressão de genes específicos, formar biofilmes, evidenciar fatores de virulência, motilidade, entre outras ações (Bassler, 2001).

Cryptococcus spp. é capaz de produzir biofilmes mais virulentos do que as células planctônicas, visto que genes de virulência como LAC1, URE1 e CAP59 são altamente expressos e estão associados com a lacase, urease e cápsula de polissacarídeo, respectivamente (Benaducci et al., 2016; do Carmo et al., 2022). Os biofilmes *Cryptococcus neoformans* se mostraram resistentes ao fluconazol e ao voriconazol, mas se mostraram suscetíveis à anfotericina B (AmB), quando administrada em doses acima das consideradas seguras terapeuticamente, que como consequência resulta em toxicidade ao hospedeiro e desenvolvimento de cepas resistentes a estas drogas (Delattin et al., 2014; Fanning, Mitchell, 2012).

2.2 Terapia Convencional para Criptococose

Atualmente, a terapia convencional de fármacos antifúngicos disponíveis para o tratamento da criptococose está limitada a três medicamentos, que podem ser utilizados isoladamente ou em combinação: anfotericina B (AmB), flucitosina (5-FC) e

fluconazol (FLC) (Spadari et al., 2020).

A anfotericina B continua sendo o principal medicamento utilizado para o tratamento de infecções fúngicas, possui quatro formulações diferentes: anfotericina B deoxicolato (AmB), AmB lipossomal (LAmB), complexo lipídico AmB (ABLC) e dispersão coloidal AmB (ABCD) (Spadari et al., 2020). A ligação da AmB ao ergosterol na membrana da célula fúngica caracteriza o seu efeito fungicida, visto que o fármaco promove o extravasamento do conteúdo celular que leva à morte por disfunção celular (Liu et al., 2017; Wilcock et al., 2013). Geralmente essas formulações convencionais incluem efeitos adversos significativos como nefrotoxicidade (Messori et al., 2013), dentre estas, a AmB lipossomal é a mais eficaz e menos tóxica, contudo o custo do tratamento pode ser de até 100.000 dólares por paciente (Rodrigues, Nosanchuk, 2020) de forma que seja bastante limitada a sua utilização de maneira generalizada em práticas clínicas.

O antifúngico flucitosina (5-FC) é um antimetabólito que atua somente quando entra em contato com a célula fúngica, através da enzima citosina deaminase (CD) que é capaz de converter a citosina em uracila (Blau et al., 2006), é convertida então na sua forma ativa 5-fluorouracil (5-FU) que age desordenando a síntese de RNA e também inibe a síntese do DNA dentro da célula fúngica (Bellmann, Smuszkiwicz, 2017; Edlind, Katiyar, 2010). A monoterapia utilizando 5-FC é pouco aplicada devido ao frequente desenvolvimento de resistência, contudo em combinação com a anfotericina B pode ser utilizada para tratar micoses sistêmicas graves, tal qual a criptococose (Allen et al., 2015). Dentre os efeitos colaterais podem-se incluir hepatotoxicidade, mielototoxicidade, e problemas gastrointestinais (Vermes, 2000).

Já o fluconazol (FLC) pertence à família dos azóis, os quais tem seu mecanismo de ação através da inibição da enzima lanosterol 14- α -demetilase (CYP51, Erg11, LDM) que está presente na biossíntese do ergosterol, um componente indispensável na membrana da célula fúngicas (Allen et al., 2015). A falta do ergosterol afeta tanto a estrutura da membrana quanto suas funções e concomitantemente com o acúmulo de precursores tóxicos contribuem para a atividade fungistática dos azóis (Hargrove et al., 2015; Monk et al., 2020). Na medicina, a classe dos azóis são frequentemente escolhidos para o tratamento antifúngico por ser de fácil acesso, apresentar baixo custo, ter uma boa biodisponibilidade oral e tendem a ter poucos efeitos secundários, entretanto

manifesta-se cada vez mais a resistência a estes compostos antifúngicos (Mourad, Perfect, 2018).

Seguindo diretrizes da Infectious Diseases Society of America (IDSA) e da World Health Organization (WHO) (Fisher et al., 2018; Perfect et al., 2010), o tratamento da meningite criptocócica deve consistir em três fases, a primeira fase denominada de indução com duração de 2 semanas, utiliza-se 1 semana de anfotericina B deoxicolato (1.0 mg/kg/dia) e flucitosina (100 mg/kg/dia) e 1 semana de fluconazol (1200 mg/dia para adultos). A segunda fase é denominada de consolidação com duração de 8 semanas, utilizando o fluconazol (800 mg diários para adultos) e a terceira fase denominada de manutenção com duração de 6 a 12 meses utilizando o Fluconazol (200 mg diários para adultos). Vale enfatizar a importância da utilização de drogas fungicidas potentes durante a fase de indução, das quais as doses dos fármacos para o tratamento a ser escolhida dependem tanto do estado imunológico do paciente quanto da forma clínica da infecção, contudo os preços elevados e o acesso mundial a estas drogas antifúngicas ainda são inadequados, o que realça a importância de estratégias de tratamentos alternativos.

2.3 Reposicionamento de Fármacos Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina

O reposicionamento de fármacos é uma estratégia que visa identificar novos usos terapêuticos para fármacos comercializados ou ainda em desenvolvimento, dispondo da vantagem de já possuírem uma farmacocinética conhecida e bem delineada, o que traz redução de custos e tempo de pesquisa no desenvolvimento de um novo medicamento (Nosengo, 2016).

Quanto a esta estratégia de reposicionamento dos fármacos, pode-se citar alguns exemplos bem-sucedidos, como o citrato de sildenafil (VIAGRA®) inicialmente desenvolvido para o tratamento de hipertensão e angina, mas que durante o período de estudos clínicos manifestou resultados inesperados e que nos dias de hoje é comercializada para tratamento de disfunção erétil (Pushpakom et al.,

2019). Outro exemplo de medicamento que teve o reposicionamento devido a resultados adversos foi o Minoxidil, a princípio elaborado com a capacidade de reduzir a pressão arterial promovendo uma vasodilatação potente e de longa duração, contudo entre os efeitos colaterais foi apontado o crescimento excessivo de pelos terminais e atualmente é associado a cremes para tratamento da calvície e de alopecia (Van Zuuren et al., 2016).

Entretanto há outros casos onde o reposicionamento acontece de maneira intencional, após a busca de novas indicações terapêuticas para medicamentos já existente, como exemplo Zidovudina (AZT) que falhou em sua indicação original para o tratamento quimioterápico e ainda assim foi o primeiro fármaco aprovado para tratar a AIDS e o micofenolato de mofetila, um fármaco imunomodulador comumente utilizado na profilaxia de rejeição em órgãos transplantados e que da mesma forma pode ser utilizado para a nefrite lúpica (Cha et al., 2018).

Emergiu na década de 1980 uma nova classe de antidepressivos denominados de inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) que incluíam os princípios ativos cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina, cloridrato de sertralina, citalopram e fluvoxamina, cuja principal função é inibir de forma potente e seletiva a recaptação de serotonina, ocasionando a potencialização do neurotransmissor serotoninérgico (Cruz et al., 2020; Murphy et al., 2021). Apesar do propósito bem estabelecido dos ISRSs, diversos estudos apontaram a presença de ação antifúngica, seja do fármaco isolado ou em associação, contra infecções fúngicas incluindo candidíase e criptococose (Costa Silva et al., 2017; Pereira et al., 2021; Zhai et al., 2012).

Em 2012, os estudos de (Zhai et al., 2012) apontaram que o cloridrato de sertralina exibiu atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans*, *in vitro* ainda foi considerada fungicida para todos os isolados de *Cryptococcus* spp. Ainda, desse mesmo estudo foi observado que o cloridrato de sertralina atua sinergicamente ou aditivamente com o fluconazol, reduzindo a carga fúngica no cérebro, rim e baço. Posteriormente, (Costa Silva et al., 2017) demonstraram em seus estudos que a classe de ISRSs apresentaram atividade antifúngica ao causar alterações na membrana e diminuir a viabilidade do biofilme *in vitro* em diferentes cepas de *Candida* spp. Mais recentemente, (Pereira et al., 2021) constataram a ação dos fármacos o cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina na redução de cápsula e biofilme de

C. neoformans, essa ação foi verificada tanto com os ISRS isolados quando em combinação com AmB.

3 PROPOSIÇÃO

3.1. Objetivo geral

A proposta deste estudo é avaliar a atividade antifúngica e antibiofilme de fármacos Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina (ISRS), cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina, frente a *Cryptococcus gattii*.

3.1.1 Objetivos específicos

- a) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fármacos cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina frente a *C. gattii*;
- b) Determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos fármacos cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina frente a *C. gattii*;
- c) Avaliar o efeito sinérgico dos fármacos cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina em combinação com do antifúngico anfotericina B;
- d) Avaliar a ação do cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina em cápsula e corpo celular de *Cryptococcus gattii*;
- e) Avaliar o efeito dos fármacos cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina na quantidade de ergosterol de *Cryptococcus gattii*;
- f) Avaliar a ação de cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina em biofilme de *Cryptococcus gattii*;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos e condições de cultivo

Para a realização dos ensaios, foi utilizada a cepa de referência ATCC (The American Type Culture Collection) de *Cryptococcus gattii* (ATCC 56990) e a cepa clínica 5 de *Cryptococcus gattii*, provenientes de pacientes com culturas positivas para *Cryptococcus* spp. (Carmo, 2021) e posteriormente mantidas no laboratório de Microbiologia e Imunologia ICT-UNESP.

Como controle no ensaio de microdiluição em caldo foi utilizada *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.

Para a realização dos experimentos, *Cryptococcus gattii* foi incubado a 30 °C, em agitação de 80 - 100 rpm por um período de 48 horas e *Candida krusei* por 24 horas a 37 °C. Durante os ensaios as incubações foram realizadas a 37 °C para todos os micro-organismos.

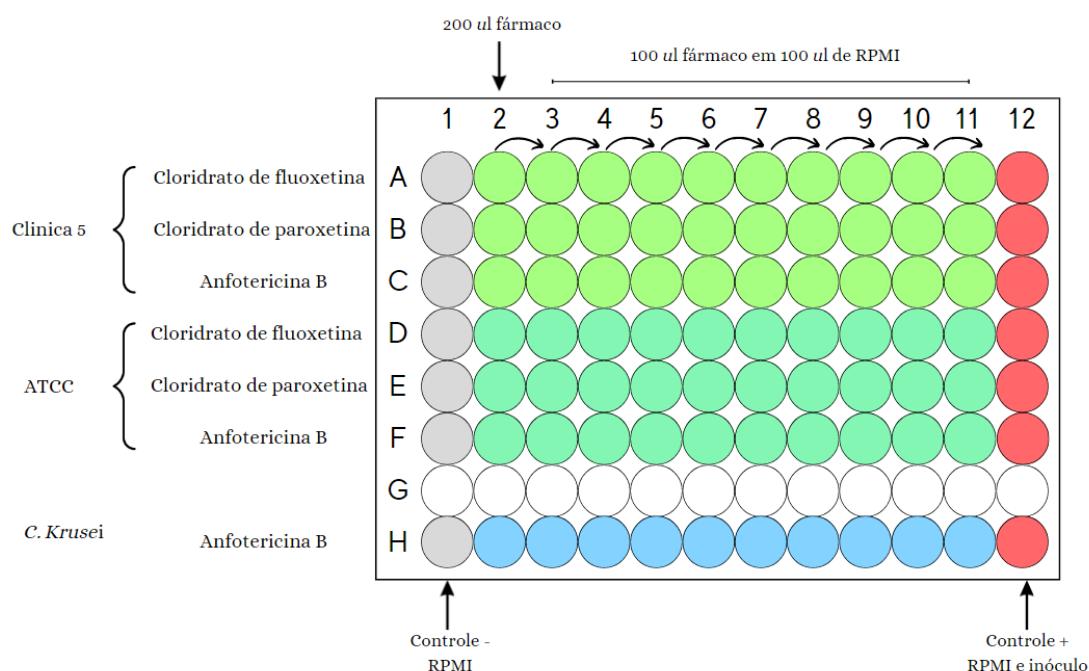
4.2 Fármacos e antifúngicos

Para a avaliação da sensibilidade e dos efeitos sinérgicos foram utilizados fármacos Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina (ISRS), cloridrato de fluoxetina (Fagron, Bolonha, Itália), cloridrato de paroxetina (Infinity Pharma, Hong Kong, China) e anfotericina B (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Uma solução fresca de cada droga foi preparada antes de cada ensaio usando uma concentração máxima de 1% dimetil sulfoxido (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) como co-solvente para maximizar a solubilidade. A solução intermediária foi preparada em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) para os ensaios.

4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada a técnica de microdiluição em caldo de acordo com o Comitê Europeu de Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST) (Arendrup et al., 2016). Para isso, o meio de cultura RPMI-1640 (com L-glutamina, pH 7,0, mas sem bicarbonato de sódio) e acrescido de 2% de glicose tamponado com MOPS 0,165 M foi utilizado. A concentração da suspensão fúngica foi de $2,5 \times 10^5$ cels/mL. O controle do teste foi realizado com anfotericina B e a levedura *Candida krusei* ATCC 6258 foi utilizada como controle do experimento. Os resultados foram analisados por leitura visual e por leitura espectrométrica a 530 nm após 48 h de incubação. A CIM é considerada a menor concentração em que se observou a inibição do crescimento de fúngico.

Figura 1 – Divisão da placa de microdiluição com 96 poços para microrganismos *C. gattii* ATCC, *C. gattii* Clínica 5 e *C. krusei* e os fármacos cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina e anfotericina B



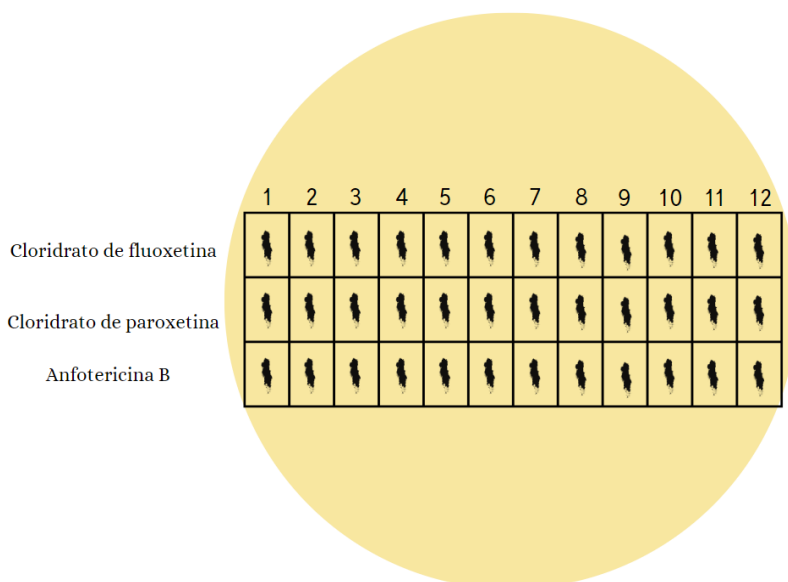
Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Após o tempo necessário de incubação para os testes, uma alíquota de cada um dos 96 poços da placa de microdiluição foi retirada e colocada cuidadosamente em ágar Sabouraud. Após 48 h de incubação a 37 °C foi verificado o crescimento ou não de colônias e as respectivas concentrações. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) é determinada pela menor concentração onde não se observa o crescimento.

A proporção encontrada entre CFM e CIM foi utilizada para interpretar os resultados, definindo a droga como fungistático (CFM / CIM: > 4) ou fungicida (CFM / CIM: ≤ 4) (Siddiqui et al., 2013).

Figura 2 – Divisão da placa ágar Sabouraud para determinar o CFM para os microrganismos *C. gattii* ATCC e *C. gattii* Clínica 5 com os fármacos cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina e anfotericina B



Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 Avaliação da atividade sinérgica dos fármacos ISRS com anfotericina B

A atividade sinérgica dos ISRS com a anfotericina B foi avaliada pela técnica do “tabuleiro de xadrez”. Essa técnica é baseada no teste de sensibilidade por microdiluição em caldo, preconizada pelo EUCAST (Arendrup et al., 2016). Os compostos foram adicionados nas placas em concentração quatro vezes maior e foram realizadas diluições seriadas com os compostos a serem combinados. A concentração da suspensão fúngica foi de 5×10^5 cels/mL. As placas foram incubadas a 37 °C e lidas após 48 horas por leitura visual e espectrofotométrica a 570 nm. O resultado do teste é a menor concentração de cada droga, que inibiu completamente o crescimento da fúngico. Para o cálculo foi utilizado o índice de concentração inibitória fracionária (FICI), calculado usando a equação: $\Sigma FIC = FICA + FICB$, onde o FIC é a razão da CIM do fármaco em combinação com a CIM sozinha (Odds, 2003). Uma combinação foi considerada sinérgica a uma $FICI \leq 0,5$, indiferente a $FICI > 1$ e

≤ 4 e antagonista em FICI $> 4,0$. A mesma fórmula foi utilizada para calcular o índice de concentração fungicida fracionária (FFCI), usando valores CFM em vez de CIM.

Figura 3 – Divisão na placa de microdiluição de 96 poços para ensaio de sinergismo dos microrganismos *C. gattii* ATCC e *C. gattii* clínica 5 com os fármacos cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina e anfotericina B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+	4 500	4 250	4 125	4 62,5	4 31,25	4 15,62	4 7,81	4 3,90	4 1,95	4 0,97	8
B	C+	2 500	2 250	2 125	2 62,5	2 31,25	2 15,62	2 7,81	2 3,90	2 1,95	2 0,97	4
C	C+	1 500	1 250	1 125	1 62,5	1 31,25	1 15,62	1 7,81	1 3,90	1 1,95	1 0,97	2
D	C+	0,5 500	0,5 250	0,5 125	0,5 62,5	0,5 31,25	0,5 15,62	0,5 7,81	0,5 3,90	0,5 1,95	0,5 0,97	1
E	C-	0,25 500	0,25 250	0,25 125	0,25 62,5	0,25 31,25	0,25 15,62	0,25 7,81	0,25 3,90	0,25 1,95	0,25 0,97	0,5
F	C-	0,125 500	0,125 250	0,125 125	0,125 62,5	0,125 31,25	0,125 15,62	0,125 7,81	0,125 3,90	0,125 1,95	0,125 0,97	0,25
G	C-	0,0625 500	0,0625 250	0,0625 125	0,0625 62,5	0,0625 31,25	0,0625 15,62	0,0625 7,81	0,0625 3,90	0,0625 1,95	0,0625 0,97	0,125
H	C-	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90	1,95	0,0625

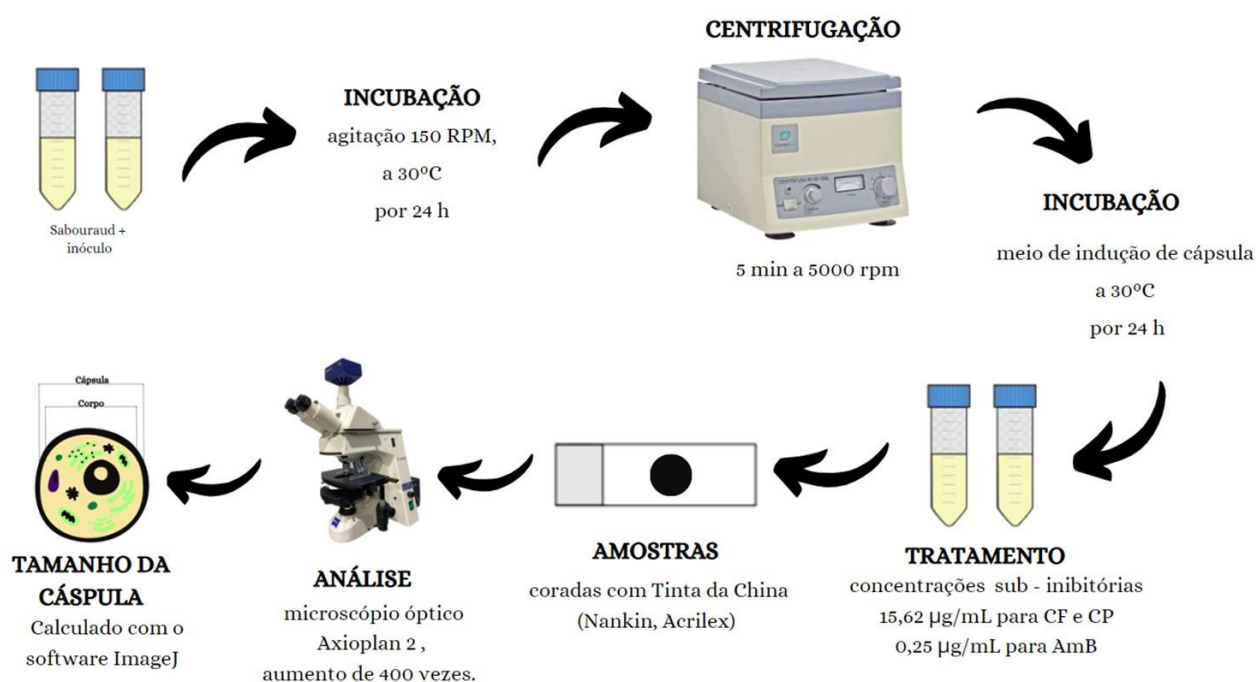
Fonte: Elaborado pela autora.

4.6 Efeitos dos fármacos ISRS sobre a cápsula de *Cryptococcus gattii*

Cryptococcus gattii cepa ATCC 56990 e a cepa clínica 5 passaram por procedimentos de indução da cápsula de acordo com protocolo descrito por (Zaragoza, Casadevall, 2004). Para isso *C. gattii* foi cultivado em 10 mL de meio Sabouraud com agitação (150 rpm) por 24 h a 30 °C. Após a incubação, as células foram coletadas por centrifugação, por 5 min a 5000 rpm, lavadas duas 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 μ L do meio de indução de cápsula (Sabouraud diluído 1/10 em 50 mM de MOPS, pH 7,3), por 24 h a 30 °C.

Posteriormente, as células com as cápsulas induzidas receberam o tratamento com as concentrações sub-inibitórias relacionadas as CIMs dos fármacos: 15,62 µg/mL para cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina e 0,25 µg/mL para anfotericina B. Como controle, foi utilizada células com as cápsulas induzidas sem tratamento. O tratamento foi realizado por 24 h com agitação, a 30 °C. Para a análise, as células foram coradas por Tinta da China (Nankin, Acrilex) e analisadas com o auxílio do microscópio óptico Axioplan 2 (Zeiss, Alemanha) com o aumento de 400 vezes. O tamanho da cápsula foi calculado usando o software ImageJ (Rueden et al., 2017), medindo a diferença entre a célula inteira – corpo e cápsula – e o tamanho do corpo celular. Foram analisadas 20 células de cada grupo para medição.

Figura 4 – Esquema demonstrando como todo processo de preparação, incubação, tratamento, análises e a medição do tamanho do corpo e da cápsula da célula de *C. gattii*



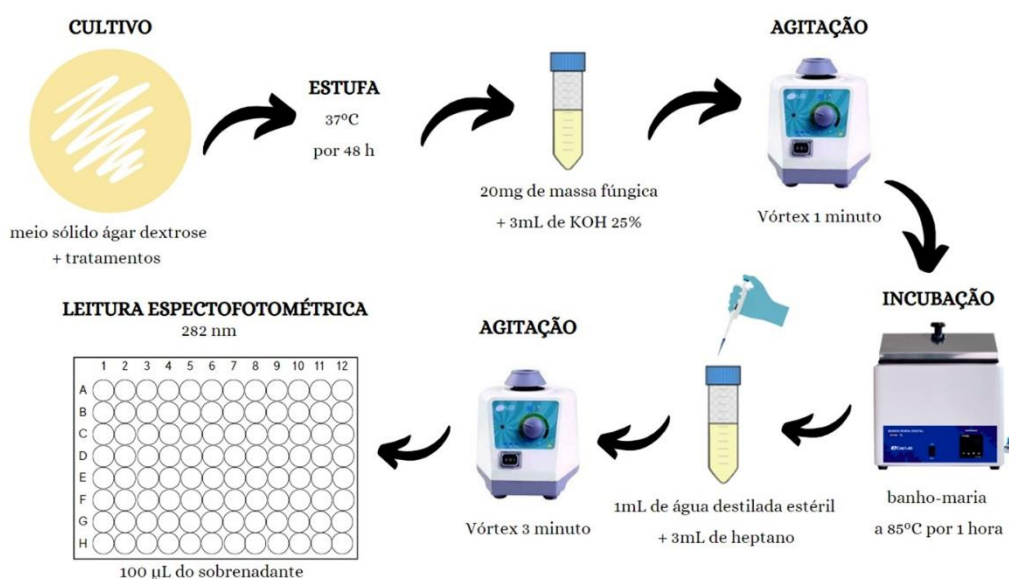
Fonte: Elaborado pela autora.

4.7 Efeito dos fármacos ISRS no conteúdo do ergosterol

Cepas de *C. gattii* ATCC 56990 e clínica 5 foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose e adicionados os fármacos cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina e anfotericina B, isoladamente em concentrações de 1x e 2x valor de CIM em estufa por 48 h a 37 °C. Após o período de cultivo, foram coletados 20 mg de massa fúngica úmida em tubos falcon de 15 mL e adicionados 3 mL de solução etanólica de KOH 25% (em etanol 70%) e levados ao vórtex por 1 minuto em agitação para em então, incubarem os tubos em banho-maria a 85 °C por 1 hora.

Após as amostras esfriarem a temperatura ambiente, foram adicionados 1 mL de água destilada estéril e 3 mL de heptano, em seguida as amostras foram levadas ao vórtex por 3 minutos e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente para então remover 500 µL do sobrenadante e dispensar 100 µL do sobrenadante de cada cultura em uma placa de 96 poços de quartzo e ler em espectrofotômetro a 282 nm junto a curva padrão de ergosterol. Solução padrão de ergosterol de 2000 µg/mL (em etanol) e a concentração da curva de 0,5 µg/mL a 1024 µg/mL.

Figura 5 – Esquema demonstrando como o processo de cultivo e preparação passo a passo para determinar os efeitos dos fármacos ISRS no conteúdo do ergosterol de *C. gattii*



Fonte: Elaborado pela autora.

4.8 Avaliação dos compostos frente a biofilme de *Cryptococcus gattii*

4.8.1 Formação e tratamento do biofilme

A formação de biofilme foi realizada de acordo com (Martinez, Casadevall, 2006), sendo feitas algumas modificações. Foram adicionadas 10^8 cels/mL a poços individuais de placas de 96 poços e posteriormente essas placas foram incubadas a 37 °C sem agitação durante 24 h para que ocorra a pré-adesão. Após o estágio de pré-adesão, os poços foram lavados 3 vezes com PBS para remover as leveduras não aderentes e os biofilmes maduros foram formados por 48 h sem agitação a 37 °C em meio RPMI. Após sua formação o biofilme foi tratado com os fármacos em concentrações de 10x e 20x valor de CIM por um período de 24 h e o efeito dos fármacos sobre o biofilme foi avaliado a partir da biomassa quantificada por cristal violeta e da contagem de colônias (UFC/mL).

Quadro 1- Valores obtidos de CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos fármacos cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina e anfotericina B e as concentrações utilizadas para o tratamento do biofilme sobre *C.gattii*

Fármaco	Microrganismo	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração do fármaco para tratamento do biofilme ($\mu\text{g/mL}$)	
Cloridrato de fluoxetina	<i>C.gattii</i> ATCC	31,25	10x MIC	312,5 $\mu\text{g/mL}$
	<i>C. gattii</i> CLINICA 5	$\mu\text{g/mL}$	20x MIC	625 $\mu\text{g/mL}$
Cloridrato de paroxetina	<i>C.gattii</i> ATCC	31,25	10X MIC	312,5 $\mu\text{g/mL}$
	<i>C. gattii</i> CLINICA 5	$\mu\text{g/mL}$	20x MIC	625 $\mu\text{g/mL}$
Anfotericina B	<i>C.gattii</i> ATCC	0,5 $\mu\text{g/mL}$	5x MIC	2,5 $\mu\text{g/mL}$
	<i>C. gattii</i> CLINICA 5		10x MIC	5 $\mu\text{g/mL}$

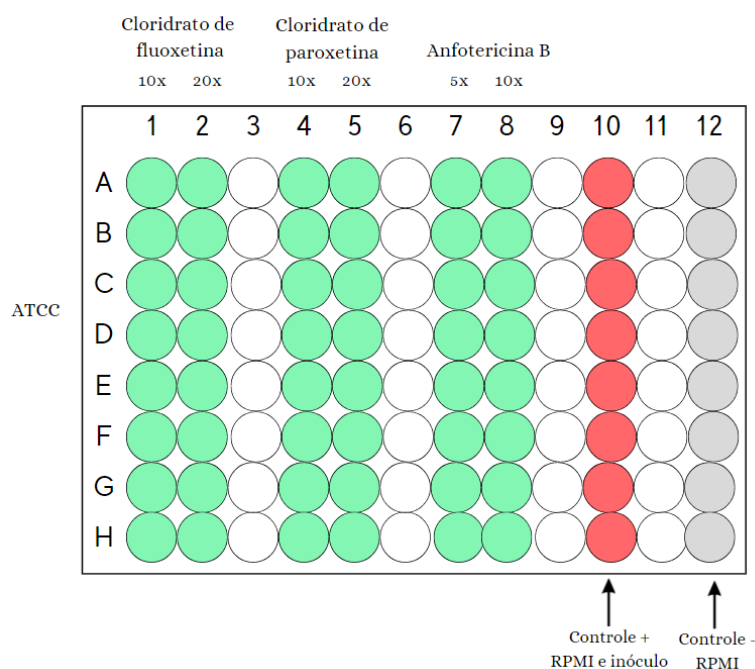
Fonte: Elaborado pela autora.

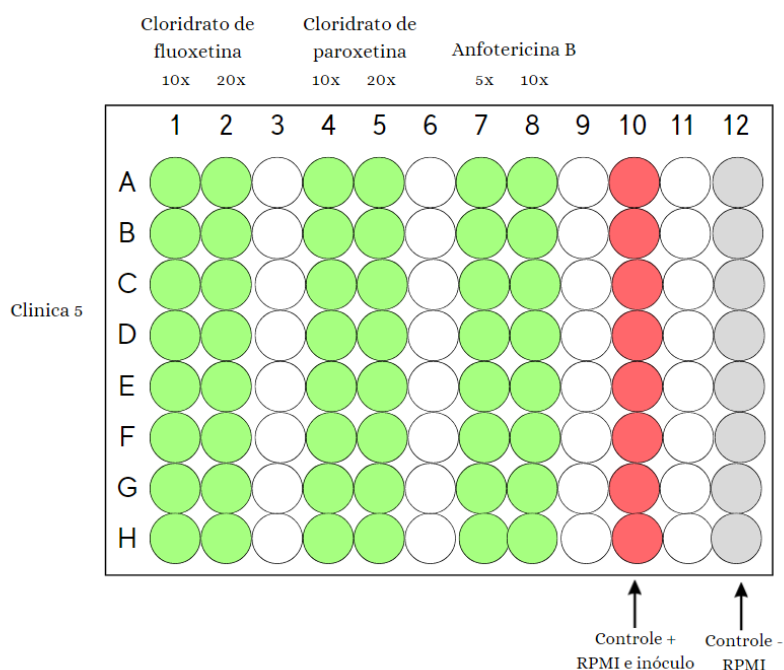
4.8.2 Efeito dos fármacos na biomassa do biofilme

Com a finalidade de quantificar a biomassa dos biofilmes foi utilizada a metodologia descrita de acordo com (Peeters et al., 2008). Os biofilmes formados e

tratados com os fármacos cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina por um período de 24 horas foram lavados com PBS e fixados com etanol absoluto durante 15 minutos, então o etanol foi removido e a placa foi mantida a temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas, até completa evaporação do etanol. Posteriormente, 100 µL de cristal violeta a 0,5% foram adicionados a cada poço, e após 20 minutos, o excesso do corante foi removido com PBS. Em seguida, foram adicionados 100 µL de etanol absoluto em cada poço da placa para diluir o corante para então serem lidas em leitor Elisa com comprimento de onda de 570 nm.

Figura 6 – Divisão na placa de microdiluição de 96 poços para biofilme e cristal violeta dos microrganismos *C. gattii* ATCC e *C. gattii* clínica 5 com os fármacos cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina e anfotericina B



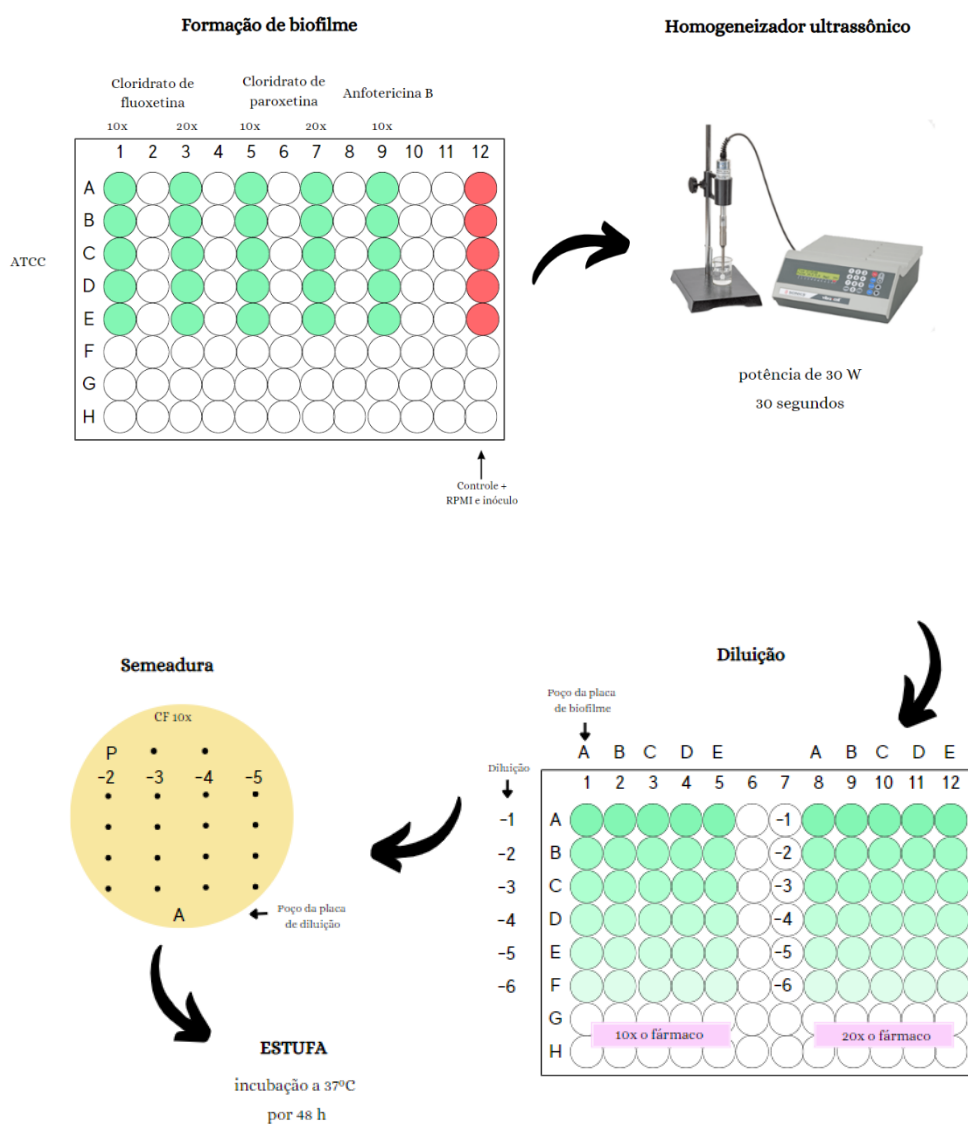


Legenda: ATCC: *C. gattii* ATCC 56990; cepa Clínica 5: *C. gattii* CLINICA 5; 5x: 5 vezes o valor de CIM; 10x: 10 vezes o valor de CIM; 20x: 20 vezes o valor de CIM; CF: cloridrato de fluoxetina; Fonte: Elaborado pela autora.

4.8.3 Determinação do efeito dos fármacos na viabilidade do biofilme por determinação do número de Unidades Formadora de Colônia por mililitro (UFC/mL)

Após a formação e o tratamento do biofilme os poços foram sonicados por 30 segundos utilizando-se homogeneizador ultrassônico (Sonics Vibra Cell) com potência de 30 W, para desagregar o biofilme. A partir das diluições obtidas foram realizadas diluições seriadas, das quais alíquotas de 5 µL foram semeadas em placas com ágar Sabouraud incubadas a 37 °C por 48 h para posterior contagem e avaliação dos efeitos dos fármacos.

Figura 7 – Experimento para determinar o número de UFC/mL após tratamento do biofilme e contagem do número de colônias por sementeira em placas de ágar

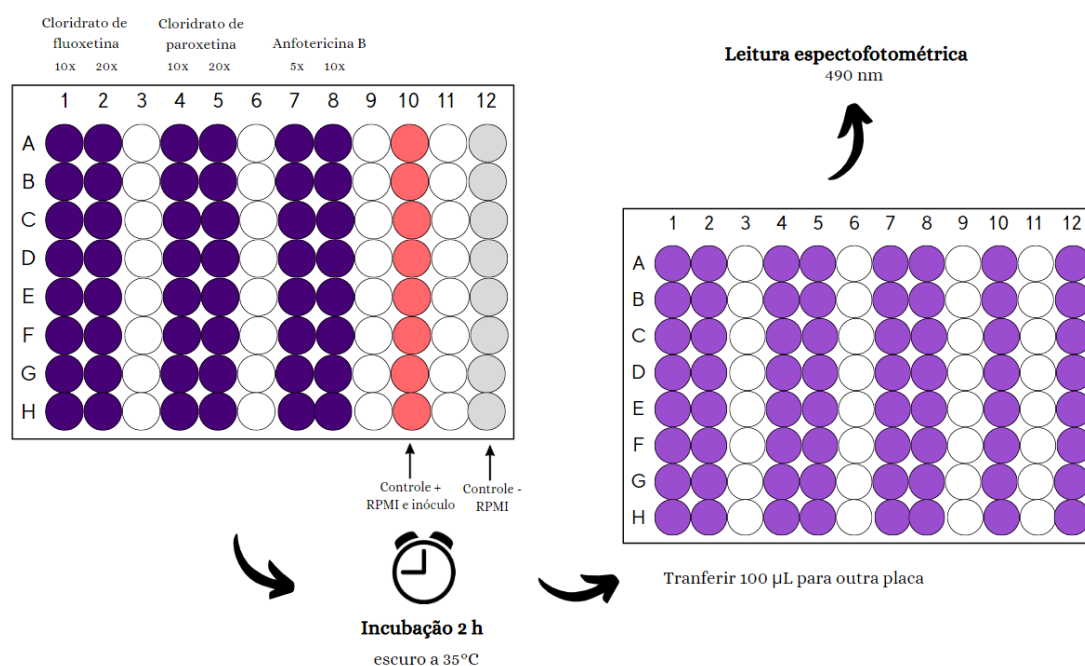


Legenda: ATCC: *C. gattii* ATCC 56990; 10x: 10 vezes o valor de CIM; 20x: 20 vezes o valor de CIM; CF: cloridrato de fluoxetina; P: puro; Controle +: inóculo e meio RPMI;
Fonte: Elaborado pela autora.

4.8.4 Atividade metabólica dos microrganismos pelo teste de XTT

A viabilidade do biofilme de *Cryptococcus gattii* foi determinada através de um ensaio de (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) (XTT). Os biofilmes foram formados conforme descrito acima. Após a formação do biofilme e o tratamento medicamentoso, cada um dos poços foi lavado com 100 μ L de PBS e posteriormente inoculado 50 μ L da de XTT (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) e 4 μ L de menadiona (1 mM) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Após 1 h de incubação no escuro a 37°C, 50 μ L de solução foram transferidos de cada poço para outra placa e sua absorção foi registrada a 490 nm.

Figura 8 - Experimento para determinar a atividade metabólica dos microrganismos pelo teste de XTT



Fonte: Elaborado pela autora.

4.9 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Os dados obtidos pelos testes de atividade antifúngica em biofilmes pelo Kruskal-Wallis test com Dunn, como pós teste. Para o a análise de UFC/ mL foi utilizado ANOVA complementado pelo Teste de Tukey. Para todos os ensaios o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADO

5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Ambos os fármacos, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina, demonstraram ação antifúngica sobre as cepas avaliadas com valores de CIM de 31,25 µg/mL. Os valores de CIM estão dispostos na Quadro 2.

Quadro 2 - Valores de Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) dos fármacos cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina frente *Cryptococcus gattii*. *Candida krusei* e anfotericina B foram utilizados como controles

Microrganismo	Cloridrato de fluoxetina	Cloridrato de paroxetina	Anfotericina B
<i>Cryptococcus gattii</i> ATCC 56990	31,25 µg/mL	31,25 µg/mL	0,5 µg/mL
<i>Cryptococcus gattii</i> clínica 5	31,25 µg/mL	31,25 µg/mL	0,5 µg/mL
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	-	-	0,5 µg/mL

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

De acordo com Siddiqui et al. (2013) a proporção encontrada entre CFM e CIM é utilizada para definir o fármaco como fungistático (CFM / CIM: > 4) ou fungicida (CFM / CIM: ≤ 4). Ambos os fármacos, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina, demonstraram ação fungicida (CFM / CIM = 1) sobre as cepas testadas. Os valores de CFM estão dispostos na Quadro 3.

Quadro 3 - Valores de Concentração Fungicida Mínima ($\mu\text{g/mL}$) dos fármacos cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina e anfotericina B sobre *Cryptococcus gattii*

Microrganismo	Cloridrato de fluoxetina	Cloridrato de paroxetina	Anfotericina B
<i>Cryptococcus gattii</i> ATCC 56990	31,25 $\mu\text{g/mL}$	31,25 $\mu\text{g/mL}$	0,5 $\mu\text{g/mL}$
<i>Cryptococcus gattii</i> clínica 5	31,25 $\mu\text{g/mL}$	31,25 $\mu\text{g/mL}$	0,5 $\mu\text{g/mL}$

Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 Determinação do efeito combinatório dos compostos com anfotericina B

A avaliação do efeito sinérgico dos fármacos cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina com a anfotericina B, apresentaram valores sinérgicos para cepas de *C. gattii* ATCC 56990, de acordo com o cálculo de FICI, como pode ser observado na tabela 4. As combinações de cloridrato de fluoxetina e AmB (CF+ AmB) e cloridrato de paroxetina e AmB (CP+ AmB), resultaram em duas e uma concentrações sinérgicas, respectivamente. Três concentrações reduziram significativamente os valores de CIM dos fármacos ISRS entre 4 e 8x e para o antifúngico AmB a redução no valor de CIM foi de 4x.

Já para as cepas *Cryptococcus gattii* clínica 5 foi observado resultado indiferente ao sinergismo.

Quadro 4 - Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fármacos sozinhos e combinados com anfotericina B contra *C. gattii*, e a verificação da atividade dos fármacos quando combinados

Combinação A x B	CIM A	CIM B	FIC A	FIC B	Redução CIM A	Redução CIM B
CF + AmB	31.25 µg/mL	0.5 µg/mL	3.9	0.125	8x	4x
CF + AmB	31.25 µg/mL	0.5 µg/mL	7.8	0.125	4x	4x
CP + AmB	31.25 µg/mL	0.5 µg/mL	7.8	0.125	4x	4x

Legenda: O ensaio do tabuleiro de xadrez foi realizado com o *C. gattii* ATCC 56990; A: fármaco ISRS; B: fármaco antifúngico; CF: Cloridrato de fluoxetina; CP: cloridrato de paroxetina; AmB: anfotericina B; CIM, concentração inibitória mínima; FICI, concentração inibitória fracionada.
Fonte: Elaborado pela autora.

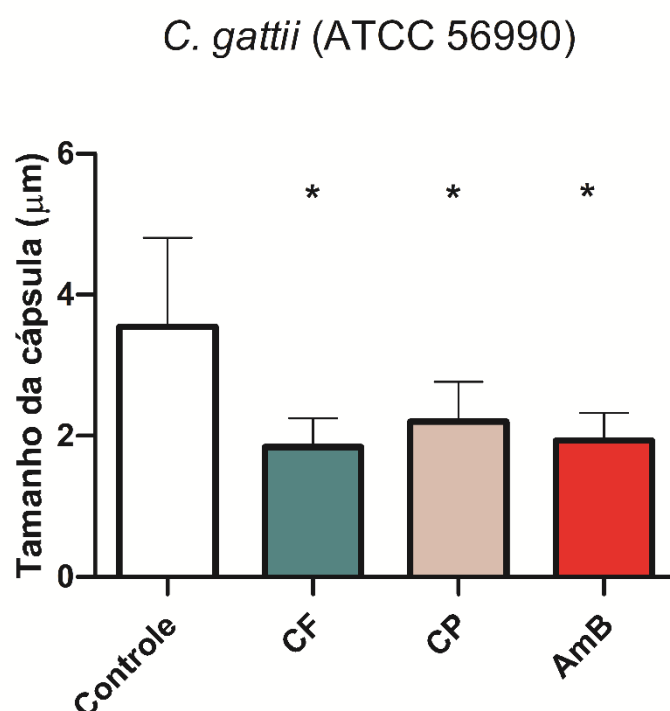
5.4 Avaliação dos fármacos ISRS sobre a cápsula de *Cryptococcus gattii*

Após as células de *C. gattii* ATCC 56990 e *C. gattii* clínica 5 serem cultivadas em meio de indução de cápsula, as mesmas receberam os tratamentos com cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina e anfotericina B em concentrações sub-inibitórias pelo período de 24 h.

Os fármacos cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina, em concentrações sub-inibitórias (15,62 µg/mL) reduziram 48,16% ($p < 0.0001$) e 38%

($p < 0.0001$) respectivamente, do tamanho da cápsula de *C. gattii* ATCC 56990 em relação ao controle sem tratamento, enquanto o antifúngico anfotericina B (0,25 $\mu\text{g/mL}$) reduziu 45,52% ($p < 0.0001$) no tamanho capsular das leveduras. Todos os fármacos apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (figura 9).

Figura 9 - Efeitos dos tratamentos com fármacos em concentrações sub-inibitórias em cápsula de *C. gattii* ATCC 56990



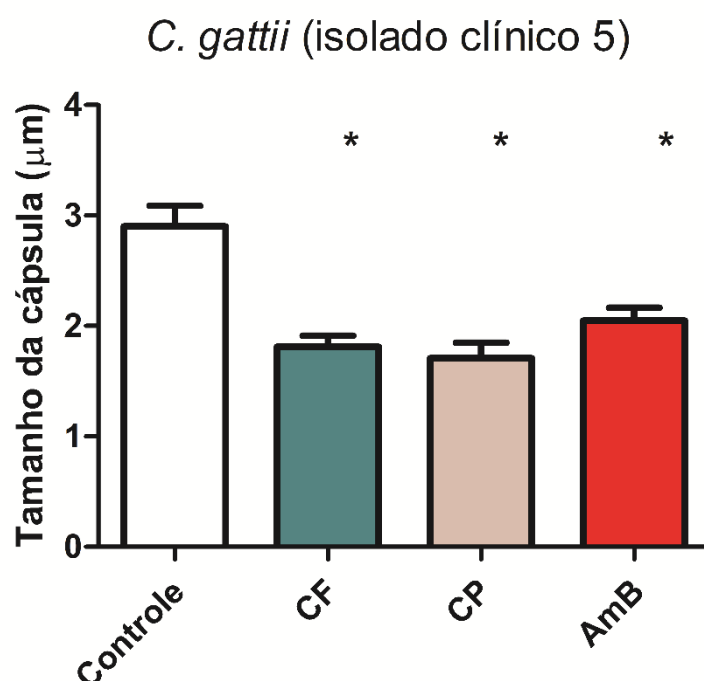
Legenda: CF: cloridrato de fluoxetina; CP: cloridrato de paroxetina; AmB: anfotericina B. O asterisco (*) representa significância estatística em relação ao controle sem tratamento. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando Kruskal-Wallis test com Dunn.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os fármacos cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina, em concentrações sub-inibitórias (15,62 $\mu\text{g/mL}$) reduziram em 37,53% ($p < 0.0001$) e 41,05% ($p < 0.0001$) respectivamente, do tamanho da cápsula de *C. gattii* clínica 5 em relação ao controle sem tratamento, enquanto o antifúngico anfotericina B (0,25 $\mu\text{g/mL}$) reduziu 29,40% ($p = 0,0003$) no tamanho capsular das leveduras. Todos os

fármacos apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (figura 10).

Figura 10 - Efeitos dos tratamentos com fármacos em concentrações sub- inibitórias em cápsula de *C. gattii* clínica 5



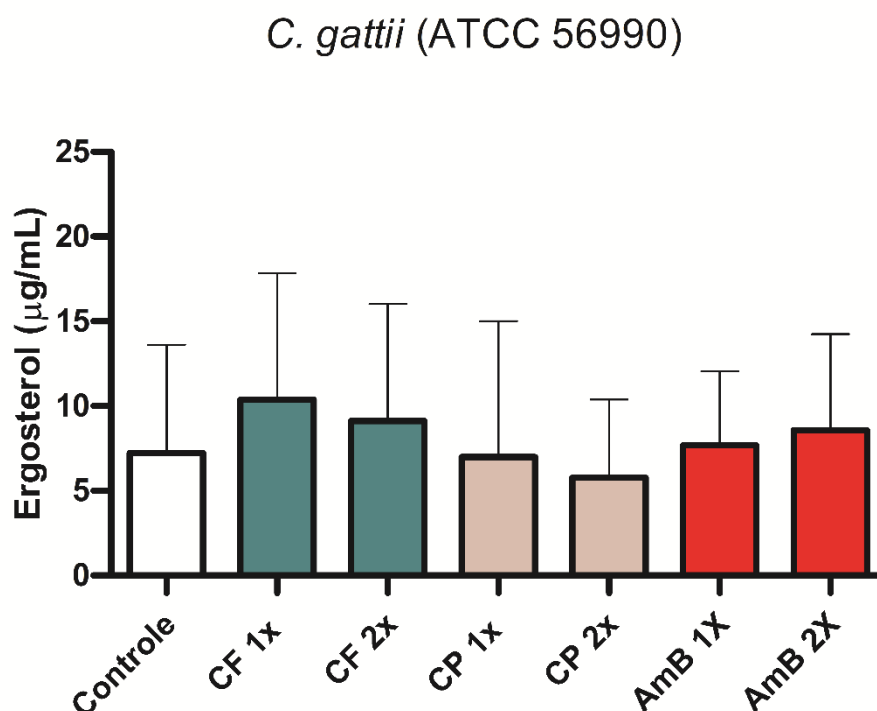
Legenda: CF: cloridrato de fluoxetina; CP: cloridrato de paroxetina; AmB: anfotericina B. O asterisco (*) representa significância estatística em relação ao controle sem tratamento. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando Kruskal-Wallis test com Dunn.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.5 Efeito dos fármacos ISRS no conteúdo do ergosterol

A análise do efeito dos fármacos cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina e anfotericina B no conteúdo do ergosterol de *C. gattii* aponta que não houveram diferenças estatísticas com os tratamentos realizados em relação ao grupo controle (Figura 11).

Figura 11 - Determinação da eficácia dos fármacos cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina e anfotericina B no conteúdo de ergosterol sobre *C. gattii*



Legenda: *C. gattii*: controle inóculo acrescido com meio RPMI; 1x: 1 vezes o valor de CIM; 2x: 2 vezes o valor de CIM; CF: cloridrato de fluoxetina; CP: cloridrato de paroxetina; AmB: anfotericina B; Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando Kruskal-Wallis test com Dunn.
Fonte: Elaborado pela autora.

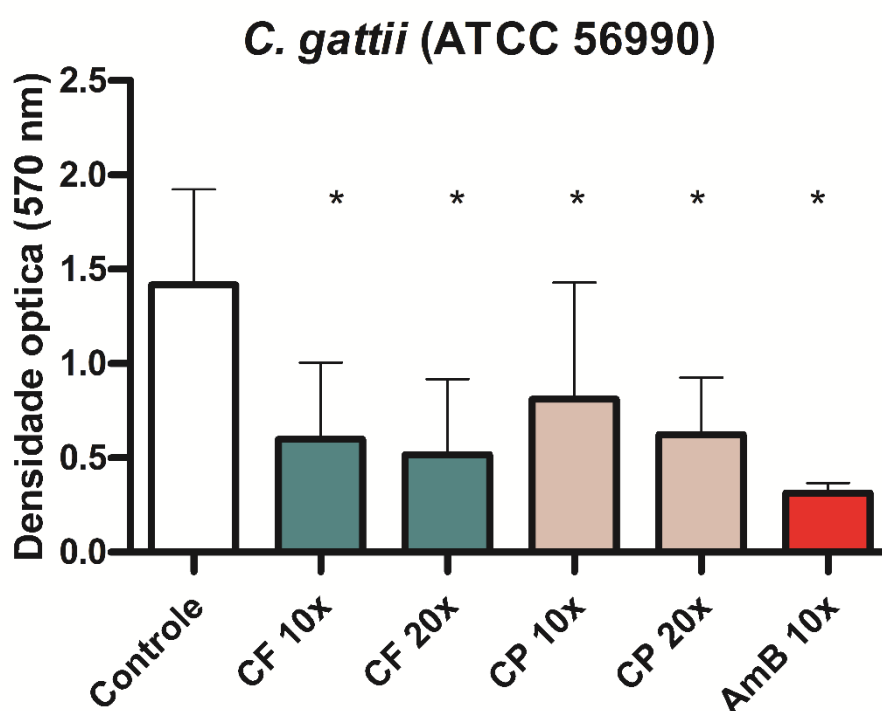
5.6 Atividade antibiofilme dos fármacos ISRS

5.6.1. Efeito dos fármacos ISRS na biomassa do biofilme de *C. gattii*

Para o tratamento do biofilme de *C. gattii* ATCC 56990 e *C. gattii* clínica 5 foram usadas as concentrações 10x CIM e 20x CIM dos fármacos cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina e 10x CIM de anfotericina B.

O tratamento do biofilme de *C. gattii* ATCC 56990 com cloridrato de fluoxetina pelo tempo de 24 horas promoveu ação antibiofilme nas concentrações de 10x valor de CIM (312,5 µg/mL) e 20x valor de CIM (625 µg/mL) com 57,72% ($p = 0,0002$) e 63,44% ($p < 0,0001$) de redução na biomassa respectivamente. Já o tratamento com cloridrato de paroxetina pelo tempo de 24 horas promoveu ação antibiofilme nas concentrações de 10x valor de CIM (312,5 µg/mL) e 20x valor de CIM (625 µg/mL) com redução na biomassa do biofilme em 42,69% ($p = 0,0091$) e 56,03% ($p = 0,0009$), respectivamente. A anfotericina B 10x valor de CIM (5 µg/mL) utilizada como controle reduziu a biomassa do biofilme em 77,98% ($p < 0,0001$). Todas as concentrações de ambos os fármacos ISRS apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (figura 12).

Figura 12 - Atividade antibiofilme dos fármacos cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina e anfotericina B sobre *C. gattii* ATCC 56990 por 24 horas

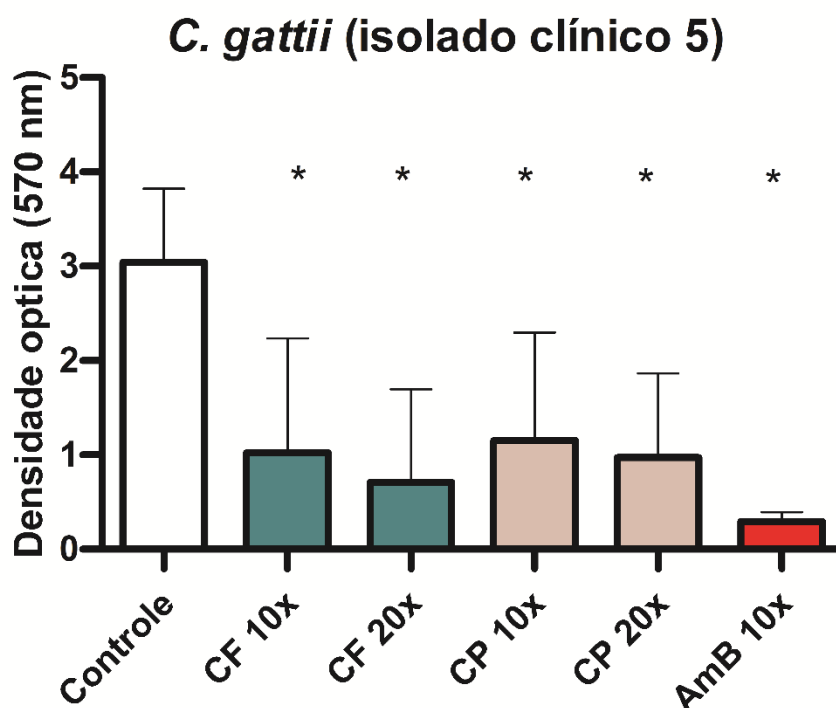


Legenda: 10x: 10 vezes o valor de CIM; 20x: 20 vezes o valor de CIM; CF: cloridrato de fluoxetina; P: puro; AmB: anfotericina B; Controle: inóculo acrescido com meio RPMI; O asterisco (*) representa significância estatística em relação ao controle sem tratamento. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando Kruskal-Wallis test com Dunn.

Fonte: Elaborado pela autora.

O tratamento do biofilme de *C. gattii* clínica 5 com cloridrato de fluoxetina pelo tempo de 24 horas promoveu ação antibiofilme nas concentrações de 10x valor de CIM (312,5 µg/mL) e 20x valor de CIM (625 µg/mL) com 66,34% ($p < 0,0001$) e 76,66% ($p < 0,0001$) de redução da biomassa do biofilme, respectivamente. Já o tratamento com cloridrato de paroxetina pelo tempo de 24 horas promoveu ação antibiofilme nas concentrações de 10x valor de CIM (312,5 µg/mL) e 20x valor de CIM (625 µg/mL) promoveram redução na biomassa do biofilme em 62,17% ($p = 0,0005$) e 68,03% ($p = 0,0003$), respectivamente. A anfotericina B utilizada 10x valor de CIM (5 µg/mL) como controle reduziu 90,40% ($p < 0,0001$) da biomassa do biofilme. Todas as concentrações de ambos os fármacos ISRS apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (figura 13).

Figura 13 - Atividade antibiofilme dos fármacos cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina e anfotericina B sobre *C. gattii* clínica 5 por 24 horas



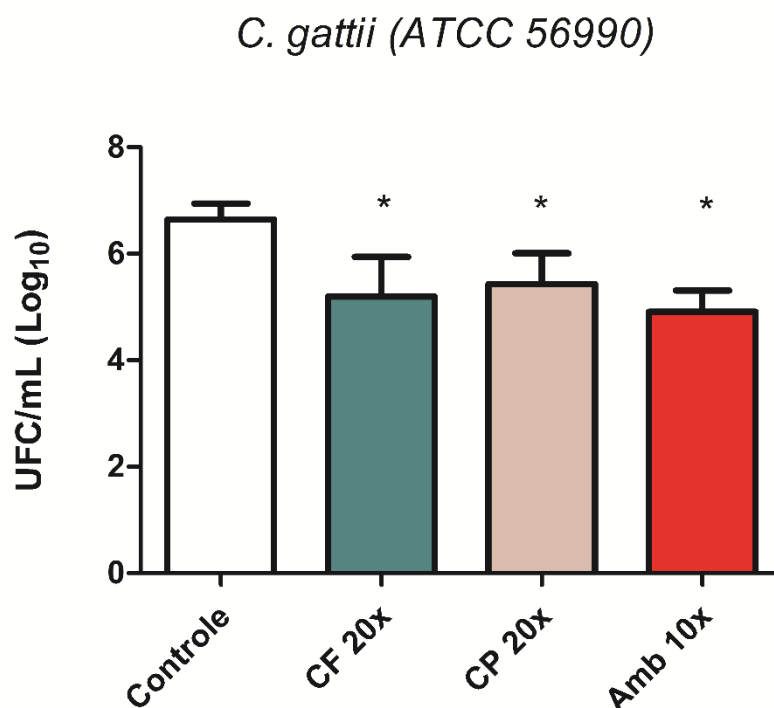
Legenda: 10x: 10 vezes o valor de CIM; 20x: 20 vezes o valor de CIM; CF: cloridrato de fluoxetina; P: puro; AmB: anfotericina B; Controle: inóculo acrescido com meio RPMI; O asterisco (*) representa significância estatística em relação ao controle sem tratamento. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando Kruskal-Wallis test com Dunn.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.6.2 Determinação do efeito dos fármacos ISRS na viabilidade do biofilme por determinação do número de Unidades Formadora de Colônia por mililitro (UFC/mL)

Em relação ao efeito dos fármacos na viabilidade do biofilme, o tratamento do de *C. gattii* ATCC 56990 com cloridrato de fluoxetina 20x valor de CIM (625 µg/mL) promoveu uma redução de 1,446 log, na viabilidade ($p < 0,0001$). Já o tratamento de cloridrato de paroxetina 20x valor de CIM (625 µg/mL) promoveu uma redução de 1,21 log, na viabilidade do biofilme ($p < 0,0001$). A anfotericina B utilizada 10x valor de CIM (5 µg/mL) como controle reduziu 1,73 log ($p < 0,0001$) da viabilidade do biofilme. Todas as concentrações de ambos os fármacos ISRS apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (figura 14).

Figura 14 - Ensaio de unidades formadoras de colônias (UFC) dos fármacos cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina e anfotericina B sobre *C. gattii*



Legenda: 10x: 10 vezes o valor de CIM; 20x: 20 vezes o valor de CIM; CF: cloridrato de fluoxetina; P: puro; AmB: anfotericina B; Controle: inóculo acrescido com meio RPMI; O asterisco (*) representa significância estatística em relação ao controle sem tratamento. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando Kruskal-Wallis test com Dunn.

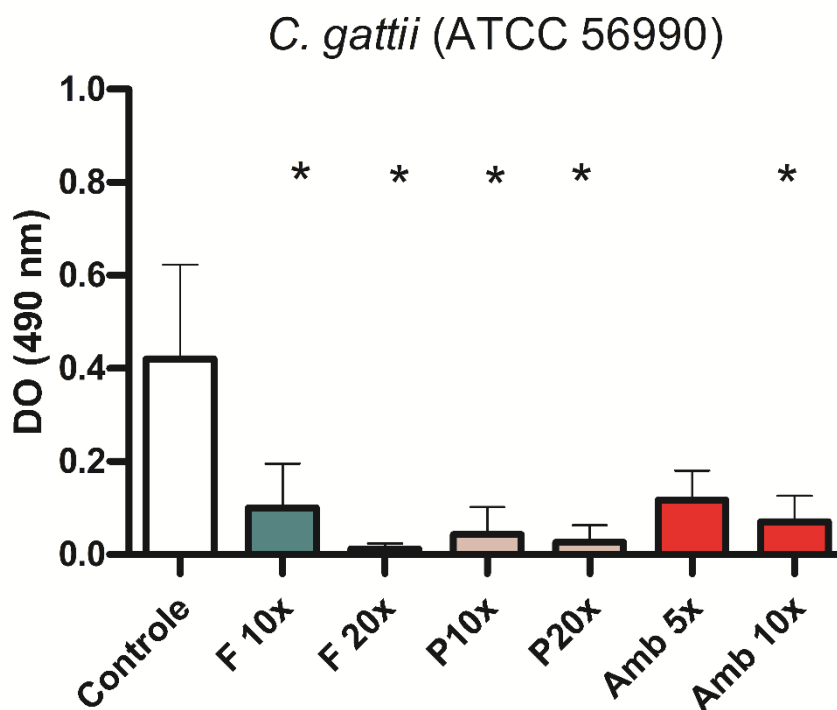
Fonte: Elaborado pela autora.

5.6.3 Avaliação da viabilidade do biofilme pelo ensaio de XTT

Para o tratamento do biofilme de *C. gattii* ATCC 56990 e *C. gattii* clínica 5 foram usadas as concentrações 10x CIM e 20x CIM dos fármacos cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina e 5x e 10x CIM para anfotericina B.

O tratamento do biofilme de *C. gattii* ATCC 56990 com cloridrato de fluoxetina pelo tempo de 24 horas promoveu diminuição da viabilidade do biofilme nas concentrações de 10x valor de CIM (312,5 µg/mL) e 20x valor de CIM (625 µg/mL) com 39,05% ($p=0.0109$) e 78,94% ($p=0.0082$) de redução na viabilidade respectivamente. Já o tratamento com cloridrato de paroxetina pelo tempo de 24 horas nas concentrações de 10x valor de CIM (312,5 µg/mL) e 20x valor de CIM (625 µg/mL) promoveram diminuição da viabilidade do biofilme em 56,99% ($p<0.0001$) e 67,64% ($p<0.0001$), respectivamente. A anfotericina B 5x valor de CIM (2,5 µg/mL) e 10x valor de CIM (5 µg/mL) utilizada como controle reduziu a atividade metabólica em 27,70% ($p=0.2913$) e 42,24% ($p=0.0037$), respectivamente. Todas as concentrações de ambos os fármacos ISRS apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (figura 15).

Figura 15 - Avaliação da atividade metabólica sobre *C. gattii* ATCC 56990 frente aos fármacos cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina e anfotericina B

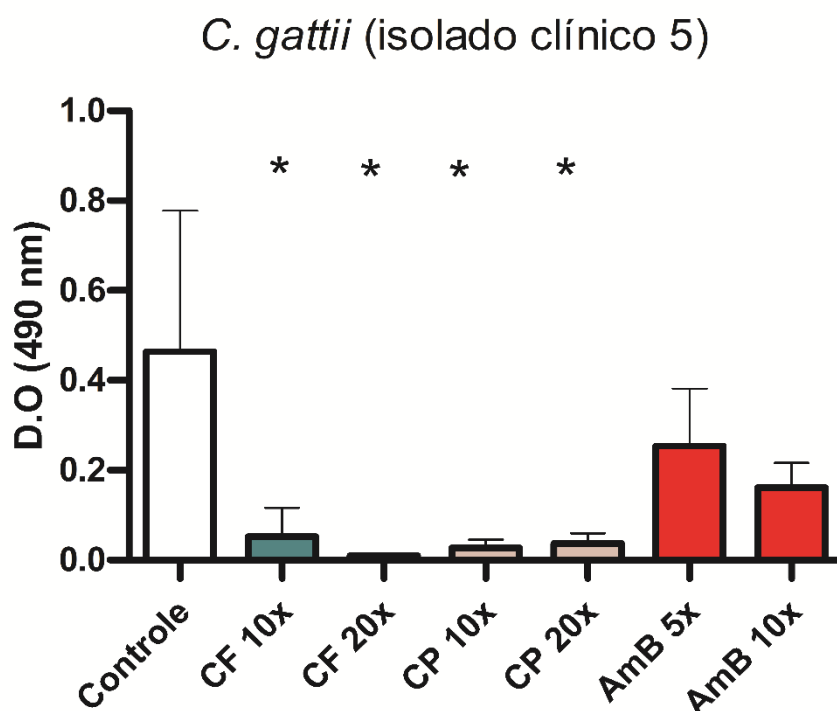


Legenda: C+: controle inóculo acrescido com meio RPMI; 5x: 5 vezes o valor de CIM; 10x: 10 vezes o valor de CIM; 20x: 20 vezes o valor de CIM; F: cloridrato de fluoxetina; P: paroxetina; AmB: anfotericina B; O asterisco (*) representa significância estatística em relação ao controle sem tratamento. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando Kruskal-Wallis test com Dunn.
Fonte: Elaborado pela autora.

O tratamento do biofilme de *C. gattii* clínica 5 com cloridrato de fluoxetina pelo tempo de 24 horas promoveu ação na diminuição da viabilidade do biofilme nas concentrações de 10x valor de CIM (312,5 µg/mL) e 20x valor de CIM (625 µg/mL) com 57,13% ($p < 0.0001$) e 84,62% ($p < 0.0001$) de redução na viabilidade respectivamente. Já o tratamento com cloridrato de paroxetina pelo tempo de 24 horas nas concentrações de 10x valor de CIM (312,5 µg/mL) e 20x valor de CIM (625 µg/mL) promoveram redução da viabilidade do biofilme em 65% ($p < 0.0001$) e 58,64% ($p < 0.0001$), respectivamente. A anfotericina B 5x valor de CIM (2,5 µg/mL) e 10x valor de CIM (5 µg/mL) utilizada como controle reduziu a atividade metabólica em 11,12% ($p > 0.9999$) e 20,83% ($p > 0.9999$), respectivamente. Todas as concentrações de

ambos os fármacos ISRS apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (figura 16).

Figura 16 - Avaliação da atividade metabólica sobre *C. gattii* clínica 5 frente aos fármacos cloridrato de fluoxetina, cloridrato de paroxetina e anfotericina B



Legenda: C+: controle inóculo acrescido com meio RPMI; 5x: 5 vezes o valor de CIM; 10x: 10 vezes o valor de CIM; 20x: 20 vezes o valor de CIM; F: cloridrato de fluoxetina; P: cloridrato de paroxetina; AmB: anfotericina B; O asterisco (*) representa significância estatística em relação ao controle sem tratamento. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando Kruskal-Wallis test com Dunn. Fonte: Elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

De maneira significativa, os casos de infecções fúngicas expandiram nos últimos anos, entre estas, a criptococose pela alta incidência tanto em indivíduos imunocomprometidos como imunocompetentes (Perfect et al., 2010; Spitzer et al., 2017). A resistência de *Cryptococcus* spp. ao tratamento convencional já é descrita além da quantidade limitada de compostos antifúngico e o alto custo, somado a alta toxicidade ao hospedeiro, tornam indispensável a procura por novas possibilidades de tratamento (Rodero et al., 2003; Scorzoni et al., 2017).

O reposicionamento de fármacos é bem descrito como alternativa promissoras ao tratamento (Katrakkou et al., 2016; Pushpakom et al., 2019) e no presente estudo nos utilizamos de antidepressivos da classe dos Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina para serem utilizados contra infecções fúngica para avaliar suas ações antifúngicas em *Cryptococcus gattii*, já que estes fármacos tem apresentado ação contra espécies fúngicas, relatada em estudos envolvendo *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e *Cryptococcus neoformans* (Lass-Flörl, 2001; Oliveira et al., 2014; Pereira et al., 2021), porém não há relatos de suas atividades em *Cryptococcus gattii*.

Em nosso estudo ambos os fármacos, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina apresentaram CIM de 31,25 µg/mL frente a *Cryptococcus gattii*. (Costa Silva et al., 2017; Oliveira et al., 2018) demonstraram em estudos com *Candida* spp. que os fármacos ISRS possuem um efeito inibitório comprovado, visto que reduzem a formação de biofilme e rompem o plasma e a membrana mitocondrial ocasionando a morte celular por apoptose. Neste mesmo estudo também foi verificado que o cloridrato de fluoxetina inibiu o crescimento fúngico nas concentrações de 127 a 508 µg/mL e o cloridrato de paroxetina inibiu o crescimento fúngico nas concentrações de 80 a 320 µg/mL. (Pereira et al., 2021) demonstrou inibição no crescimento fúngico de *Cryptococcus neoformans* com concentrações de cloridrato de fluoxetina de 9,6 µg/mL e de cloridrato de paroxetina de 41 µg/mL.

Quando avaliamos os efeitos combinados dos fármacos com anfotericina B foram encontradas 3 combinações sinérgicas para cepas ATCC que reduziam de 4 a 8 vezes os valores de CIM para CF e CP, enquanto para as cepas clínica 5 foi

observado resultado indiferente ao sinergismo. Em estudos semelhante (Oliveira et al., 2014) utilizou cepas de *Candida* para avaliar os efeitos do cloridrato de fluoxetina e fluconazol usados em combinação, encontrando um efeito sinérgico para 6 das 12 cepas testadas, entre essas 4 cepas eram resistentes ao fluconazol. Nesse estudo foi observado que a combinação cloridrato de fluoxetina e fluconazol reduziu em até 64 vezes o valor de CIM do antifúngico fluconazol.

O ergosterol é principal esterol fúngico, constituinte natural da membrana plasmática dos fungos (Maertens, 2004), podendo ser empregado como um indicador de crescimento fúngico utilizando a quantificação do ergosterol como medida de biomassa fúngica (Ruzicka et al., 2000; Seitz et al., 1977). Fármacos antifúngicos como a anfotericina B agem ao se ligar ao ergosterol (Mesa-Arango et al., 2012), enquanto fármacos antifúngicos da classe dos azoles: fluconazol, itraconazol e voriconazol possuem um mecanismo de ação comum que impede a síntese do ergosterol através da inibição do citocromo fúngico P450-dependente da enzima lanosterol 14- α -demetilase (Brajtburg et al., 1990; Maertens, 2004). Episódios de resistência a esses fármacos também pode estar relacionada com ocorrência de alterações mutagênicas nos genes *erg11* e/ou superprodução de ergosterol (Rogers, 2006).

Quando avaliamos o efeito dos fármacos IRSR, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina no conteúdo do ergosterol de *C. gattii* não encontramos diferenças estatísticas com os tratamentos realizados em relação ao grupo controle. (Santos et al., 2012) mostraram que o tratamento com fluconazol causou uma redução de 36% do conteúdo de ergosterol de *Cryptococcus gattii* em comparação ao grupo controle, enquanto o tratamento com anfotericina B não alterou a quantidade de ergosterol em comparação com o grupo de controle. Ainda quando testado a combinação de fluconazol com anfotericina B, a redução no conteúdo de ergosterol foi semelhante (35%) ao tratamento apenas com fluconazol na mesma concentração.

Cápsulas são estruturas encontradas ao redor do corpo celular de microrganismos que conferem características aos organismos encapsulados. No caso do fungo *Cryptococcus* spp., a cápsula é um importante fator de virulência e tem a capacidade de variação no tamanho das cápsulas, dependendo das condições ambientais em que se encontra (Zaragoza, Casadevall, 2004).

Em nosso estudo observamos que em concentrações sub-inibitória de

cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina (15,62 µg/mL) houveram redução no tamanho da capsula em 48,16% e 38%, respectivamente de *C. gattii* ATCC 56990 em relação ao controle sem tratamento. Já para *C. gattii* clínica 5, as concentrações sub-inibitória de cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina reduziram o tamanho da capsula em 37,53% e 41,05% respectivamente. (Pereira et al., 2021) também utilizou concentrações sub-inibitórias para cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina e estes reduziram significativamente o tamanho das cápsulas de *C. neoformans* em 65% e 63% ($P < 0.0001$), respectivamente. Ao cultivar células fúngicas na presença do anti-helmíntico mebendazol (Joffe et al., 2017) identificou alterações morfológicas expressivas que incluíam perda da forma esférica, sulcos intracelulares e dimensões capsulares reduzidas ($p < 0.05$).

Feldmesser et al. (2001) observou que durante a infecção pulmonar em murinos ocorreram mudanças morfológicas evidenciando o aumento do tamanho da cápsula e da espessura da parede celular das células de *Cryptococcus neoformans*. Posteriormente, (Zaragoza et al., 2003) sugere uma nova estratégia de evasão imunológica pela qual leveduras com cápsula de tamanho aumentado interferem diminuindo o processo de fagocitose. A cápsula também bloqueia a migração e a diferenciação linfocítica, na qual no hospedeiro induz a apoptose e viabiliza resistência às condições de estresse fúngico que leva à persistência da infecção (Vecchiarelli et al., 2013; Zaragoza et al., 2008).

Biofilmes podem ser formados por diversas espécies bacterianas e fúngicas após aderência a superfícies bióticas ou abióticas (Donlan, 2002; Ramage, Williams, 2013) e se caracterizam como populações microbianas organizadas em uma matriz extracelular autoproduzida e podem ser encontrados em ambientes naturais, industriais e hospitalares (Liu et al., 2014; Tits et al., 2020).

Para biofilme identificamos uma redução significativa da biomassa nas cepas de *C. gattii* ATCC de até 63,44% para cloridrato de fluoxetina e até 56,03% para cloridrato de paroxetina, ao passo que para cepas de clínica 5 a redução da biomassa foi de até 76,66% para cloridrato de fluoxetina e até 68,03% para o cloridrato de paroxetina demonstrando que todas as concentrações alteraram a viabilidade das células do biofilme de *C. gattii*. A ação antifúngica do fármaco cloridrato de fluoxetina e cloridrato de sertralina em biomassa também foi demonstrada por (Oliveira et al., 2018, 2014) com redução de até 82% da biomassa para *Candida* spp. Em

Cryptococcus neoformans, o cloridrato de fluoxetina promoveu uma redução de até 28% da biomassa do biofilme, enquanto o cloridrato de paroxetina apresentou redução de até 36% (Pereira et al., 2021). Estudos com fármacos de outras classes, como os anti-helmínticos benzimidazóis, revelaram múltiplos efeitos antifúngicos e redução na viabilidade dos biofilmes contra os *Cryptococcus neoformans*, se mostrando também ativo para *C. gattii* (Joffe et al., 2017).

Em relação ao efeito dos fármacos na viabilidade do biofilme através da determinação do número de unidades formadora de colônia, observou-se que o tratamento com cloridrato de fluoxetina promoveu redução de 1,446 log e o cloridrato de paroxetina uma redução de 1,21 log na viabilidade do biofilme.

Ainda foi avaliado a viabilidade celular do biofilme, ambos os fármacos apresentaram reduções bastante expressiva, para o cloridrato de fluoxetina valores de até 78,94% enquanto o cloridrato de paroxetina até 67,64% para a cepa ATCC 56990. Enquanto para cepa clínica 5 a redução foi de até 84,62% e 65% para cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina, respectivamente. O cloridrato de fluoxetina também demonstrou ser eficaz diminuindo *in vitro* a viabilidade do biofilme de espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol: *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*, na qual a concentração máxima testada foi de 3,9 mg/mL, obtendo redução de 60% a 96% quando comparada com o controle (Oliveira et al., 2018).

O tratamento terapêutico das micoses sistêmicas é bastante dificultado pelo número extremamente limitado de antifúngicos. A dificuldade do tratamento das infecções é ainda agravada pela fraca penetração dos antifúngicos no sistema nervoso central (SNC) devido à barreira hematoencefálica, são apenas algumas drogas fungistática azoicas, como o fluconazol, que demonstram uma penetração razoável no SNC. Em estudos (Zhai et al., 2012) demonstraram que a sertralina, o antidepressivo mais frequentemente prescrito, exibe potente atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans*, o principal agente causador da meningite criptocócica e que em estudos *in vivo* com modelos murinos, a atividade antifúngica foi comprovada visto que a droga diminuiu a carga fúngica no cérebro e no baço (Treviño-Rangel et al., 2016).

Enquanto isso (Lass-Flörl, 2001) estudou 5 compostos ISRS: cloridrato de sertralina, cloridrato de citalopram, cloridrato de reboxetina, cloridrato de fluoxetina e

cloridrato de paroxetina para isolados clínicos de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* e *Candida parapsilosis* e estes mostraram efeitos dependentes do tempo e da dose, mas foram fungicidas em relação aos fungos testados, sendo o cloridrato de sertralina e o cloridrato de fluoxetina as drogas mais ativas. Ainda neste mesmo estudo, quando analisadas as concentrações de sertralina no líquido cefalorraquidiano e no cérebro estas se apresentaram cerca de 20 a 40 vezes mais elevadas em comparação com os níveis de plasma, sendo possível que estes níveis sejam suficientes para modificar a virulência dos fungos. (Lass-Flörl, 2001; Marchetti et al., 2004).

Os resultados deste estudo demonstram a promissora atividade dos Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina frente a *C. gattii*, promovendo resultados tanto em células planctônicas como em biofilme. Este estudo descreve a cápsula de *C. gattii* e a forma de biofilme como alvo dos ISRS, entretanto, investigações futuras para descrever melhor estas ações são necessárias.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, os fármacos inibidores seletivos da recaptação de serotonina cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina, demonstraram ação fungicida frente *C. gattii* com a concentração inibitória mínima (CIM) na concentração de 31,25 µg/mL. Foram encontradas três combinações sinérgicas dos fármacos ISRS com AmB frente a *C. gattii* ATCC 56990. A combinação de CF com AmB reduziu 8 e 4x valor de CIM de CF, enquanto a combinação de CP com AmB reduziu 4x valor de CIM de CP. O valor de CIM para AmB foi reduzido em 4x em todas as combinações sinérgicas. Além disso, foi observada redução no tamanho da cápsula das células de *Cryptococcus gattii* cepa ATCC 56990 e cepa clínica 5 após tratamento os fármacos ISRS. Em relação ao ergosterol não houveram diferenças entre os grupos tratados com CF, CP a AmB em relação aos grupos controles. Além disso, esse estudo também demonstrou importante ação antifúngica frente ao biofilme de acordo com os resultados com redução da biomassa e diminuição da viabilidade celular.

REFERÊNCIAS

- Alanio A, Vernel-Pauillac F, Sturny-Leclère A, Dromer F. *Cryptococcus neoformans* host adaptation: toward biological evidence of dormancy. *MBio*. 2015;6(2):1 ® 13. doi: 10.1128/mBio.02580-14.
- Allen D, Wilson D, Drew R, Perfect J. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13(6):787–98. doi: 10.1586/14787210.2015.1032939.
- Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, Guinea J, Cuenca-Estrella M, Lagrou K, et al. EUCAST technical note on isavuconazole breakpoints for *Aspergillus*, itraconazole breakpoints for *Candida* and updates for the antifungal susceptibility testing method documents. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(6):571.e1-571.e4. doi: 10.1016/j.cmi.2016.01.017.
- Bellmann R, Smuszkiewicz P. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients. *Infection*. 2017;45(6):737–79. doi: 10.1007/s15010-017-1042-z.
- Benaducci T, Sardi J de CO, Lourencetti NMS, 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. PMID: 27014214. PM CID: PM C4783715.
- Blau L, Menegon RF, Chung MC. Pró-fármaco ativado por enzima, uma estratégia promissora na quimioterapia. *Quím Nova*. 2006;29(6):1307–17. doi: 10.1590/S0100-40422006000600028.
- Botelho A. Os fungos como agentes patogénicos dos animais. *Vida Rural*. 2021;44–51.
- Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. Amphotericin B: Current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990 Feb; 34(2):183–8. doi: 10.1128/AAC.34.2.183. PMID: 2183713; PM CID: PMC171553.
- Carmin AA, Santiago PAL, Santiago SRS da S, Gomes AM dos S, Pereira KD do ES. Avaliação do potencial antimicrobiano de fungos isolados do solo do Município de Iranduba. *Res Soc Dev*. 2021;10(4):e34010414224. doi: 10.33448/rsd-v10i4.14224.
- Carmo FN do. Caracterização genotípica de amostras clínicas de *Cryptococcus* Spp. e avaliação do perfil de virulência in vitro e em modelo de *Galleria Mellonella*. [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciências e Tecnologia; 2021.
- do Carmo FN, de Camargo Fenley J, Garcia MT, Rossoni RD, Junqueira JC, de Barros PP, et al. *Cryptococcus* spp. and Cryptococcosis: focusing on the infection in Brazil. *Brazil J of Microbiol*. 2022;53(3):1321–37. doi: 10.1007/s42770-022-00744-y.

- Cavalcante FS, Campos MCC, De Lima JPS. A percepção ambiental sobre fungos: uma revisão integrativa. *Novos Cadernos NAEA*. 2021;24(3):81–98. doi: 10.18542/ncn.v24i3.8820.
- Cha Y, Erez T, Reynolds IJ, Kumar D, Ross J, Koytiger G, et al. Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies. *Br J Pharmacol*. 2018; 175(2):168–80. doi: 10.1111/bph.13798.
- Chayakulkeeree M, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2006; 20(3):507–44. doi: 10.1016/j.idc.2006.07.001.
- Cheng PY, Sham A, Kronstad JW. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2009;77(10):4284–94. doi: 10.1128/IAI.00628-09.
- Colombo AC, Rella A, Normile T, Joffe LS, Tavares PM, de S. Araújo GR, et al. *Cryptococcus neoformans* Glucuronoxylomannan and Sterylglucoside are required for host protection in an animal vaccination model. *MBio*. 2019;10(2):1@22. doi: 10.1128/mBio.02909-18.
- 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;107:341–8. doi: 10.1016/j.micpath.2017.04.008.
- Cruz AFP da, Melho VM, Souza BFX De, Silva GR, Silva PEEM, Carvalho SJ. Fármacos antidepressivos: prevalência, perfil e conhecimento da população usuária. *Braz J Health Pharm*. 2020;2(2):27–34. doi: 10.29327/226760.2.2-3.
- Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(4):847–67. doi: 10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000.
- Delattin N, Cammue BP, Thevissen K. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. *Future Med Chem*. 2014;6(1):77–90. doi: 10.4155/fmc.13.189.
- Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002 Sep; 8(9):881–90. doi: 10.3201/eid0809.020063. PMID: 12194761; PM CID: PM C2732559.
- Edlind TD, Katiyar SK. Mutational analysis of flucytosine resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(11):4733–8. doi: 10.1128/AAC.00605-10.
- Fajardo AD, Silva RR DA, Costa APM, Rossetto AL, Cruz RCB. Epidemiological study of surface fungal infections in Itajaí, Santa Catarina. *Rev Bras Anal Clin*. 2017;49(4):396@400. doi: 10.21877/2448-3877.201700584.
- Fanning S, Mitchell AP. Fungal biofilms. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002585. doi: 10.1371/journal.ppat.1002585.

- Feldmesser M, Kress Y, Casadevall A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology*. 2001;147(8):2355–65. doi: 10.1099/00221287-147-8-2355.
- Fisher MC, Hawkins NJ, Sanglard D, Gurr SJ. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*. 2018;360(6390):739–42. doi: 10.1126/science.aap7999.
- Gibson JF, Johnston SA. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal Genet Biol*. 2015;78:76–86. doi: 10.1016/j.fgb.2014.11.006. Epub 2014 Dec 12. PMID: 25498576; PM CID: PM C4503824.
- Gullo FP, Rossi SA, Sardi J de CO, Teodoro VLI, Mendes-Giannini MJS, Fusco-Almeida AM. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(11):1377–91. doi: 10.1007/s10096-013-1915-8.
- Guo X. Annual Report 2021. *AIMS Microbiol*. 2022;8(1):103–7. doi: 10.3934/microbiol.2022009.
- Harding MW, Marques LLR, Howard RJ, Olson ME. Can filamentous fungi form biofilms? *Trends Microbiol*. 2009;17(11):475–80. doi: 10.1016/j.tim.2009.08.007.
- Hargrove TY, Wawrzak Z, Lamb DC, Guengerich FP, Lepesheva GI. Structure-functional characterization of cytochrome P450 sterol 14 α -Demethylase (CYP51B) from *Aspergillus fumigatus* and molecular basis for the development of antifungal drugs. *J Biol Chem*. 2015 Sep 25; 290(39): 23916–34. doi: 10.1074/jbc.M115.677310. Epub 2015 Ago 12. PMID:26269599. PM CID: PM C4583043.
- Harris JR, Lockhart SR, Debess E, Marsden-Haug N, Goldoft M, Wohrle R, et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. *Clin Infect Dis*. 2011 Dec; 53(12):1188–95. doi: 10.1093/cid/cir723. Epub 2011 Oct 19. PMID: 22016503.
- Joffe LS, Schneider R, Lopes W, Azevedo R, Staats CC, Kmetzsch L, 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. PMID: 28400768. PM CID: PM C5368277.
- Júnior JL, Santos IB dos, Pinto Júnior VL, Nicola AM. Distribuição de tipos moleculares de *Cryptococcus gattii* no Brasil: uma revisão bibliográfica. *Comum Ciênc Saúde*. 2017;27(02):159–66. doi: 10.51723/ccs.v27i02.97.
- Katragkou A, Roilides E, Walsh TJ. Can repurposing of existing drugs provide more effective therapies for invasive fungal infections? *Expert Opin Pharmacother*. 2016;17(9):1179–82. doi: 10.1080/14656566.2016.1186647.
- Kidd SE, Hagen F, Tscharke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver

Island (British Columbia, Canada). *Proc Nat Acad Sci*. 2004;101(49):17258–63. doi: 10.1073/pnas.0402981101.

Lass-Flörl C. Antifungal properties of selective serotonin reuptake inhibitors against *Aspergillus* species in vitro. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48(6):775–9. doi: 10.1093/jac/48.6.775.

Liu M, Chen M, Yang Z. Design of amphotericin B oral formulation for antifungal therapy. *Drug Deliv*. 2017;24(1):1–9. doi: 10.1080/10717544.2016.1225852.

Liu X, Tang B, Gu Q, Yu X. Elimination of the formation of biofilm in industrial pipes using enzyme cleaning technique. *MethodsX*. 2014;1:e130–6. doi: 10.1016/j.mex.2014.08.008.

Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004;10(4):1–10. doi: 10.1111/j.1470-9465.2004.00841.x.

Marchetti O, Bille J, Flückiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, et al. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991–2000. *Clin Infect Dis*. 2004 Feb 1; 38(3):311–20. doi: 10.1086/380637. Epub 2004 Jan 14. PMID: 14727199.

Martinez LR, Casadevall A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006 Mar; 50(3):1021–33. doi: 10.1128/AAC.50.3.1021-1033.2006. PMID: 16495365; PM CID: PM C1426450.

Martinez LR, Fries BC. Fungal biofilms: Relevance in the setting of human disease. *Curr Fungal Infect Rep*. 2010;4(4):266–75. doi: 10.1007/s12281-010-0035-5.

Maziarz EK; Perfect J. *Cryptococcosis*. *Infectious Disease Clinics of North America*, vol. 30. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 1277–83. ISBN: 9783540753872. doi: 10.1007/978-3-540-75387-2_123.

Mesa-Arango AC, Scorzoni L, Zaragoza O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front Microbiol*. 2012 Aug 8; 3:286. doi: 10.3389/fmicb.2012.00286. PMID: 23024638. PM CID: PM C3441194.

Messori A, Fadda V, Maratea D, Trippoli S, Marinai C. Nephrotoxicity of different formulations of amphotericin b: summarizing evidence by network meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2013 Dec; 57(12):1783–4. doi: 10.1093/cid/cit588. Epub 2013 Oct 17. PMID: 24140792.

Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:165–99. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.165. PMID: 11544353.

Monk BC, Sagatova AA, Hosseini P, Ruma YN, Wilson RK, Keniya M V. Fungal Lanosterol 14 α -demethylase: A target for next-generation antifungal design. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2020;1868(3):140206. doi: 10.1016/j.bbapap.2019.02.008. Epub 2019 Mar 6; PMID: 30851431.

Mourad A, Perfect J. Present and future therapy of *Cryptococcus* infections. *J Fungi* (Bassel). 2018 Jul 13; 4(3):79. doi: 10.3390/jof4030079. PMID: 29970809. PM CID: PM C6162641.

Murphy SE, Capitão LP, Giles SLC, Cowen PJ, Stringaris A, Harmer CJ. The knowns and unknowns of SSRI treatment in young people with depression and anxiety: efficacy, predictors, and mechanisms of action. *Lancet Psychiatry*. 2021;8(9):824–35. doi: 10.1016/S2215-0366(21)00154-1.

Ngamskulrungsroj P, Chang Y, Sionov E, Kwon-Chunga KJ. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. *MBio*. 2012;3(3):1–9. doi: 10.1128/mBio.00103-12.

Nosengo N. New tricks for old drugs. *Nat Rev Microbiol*. 2016;13(2):68–68. doi: 10.1038/nrmicro3421.

Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(1):1–1. doi: 10.1093/jac/dkg301.

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. PMID: 24798281. PM CID: PM C4068595.

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 Immun*. 2018;207(3–4):195–200. doi: 10.1007/s00430-018-0539-0.

Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*. 2008;72(2):157–65. doi: 10.1016/j.mimet.2007.11.010.

Pereira TC, de Menezes RT, de Oliveira HC, de Oliveira LD, Scorzoni L. In vitro synergistic effects of fluoxetine and paroxetine in combination with amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Pathog Dis*. 2021;79(2):1–9. doi: 10.1093/femspd/ftab001.

Perfect JR, Casadevall A. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2002;16(4):837–74. doi: 10.1016/S0891-5520(02)00036-3.

Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis*. 2010; 50(3):291–322. doi: 10.1086/649858.

Pessoa CCB, Silva SHM da, Gomes FS. Produção de fatores de virulência in vitro por isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de origem clínica em Belém, Estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2012;3(2):59–65. doi: 10.5123/S2176-62232012000200008.

Prado M, Silva MB da, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(3):513–21. doi: 10.1590/S0074-02762009000300019.

Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(1):41–58. doi: 10.1038/nrd.2018.168.

Queiroz LP de, Rapini A, Giulietti AM, Inácio L. Rumo ao amplo conhecimento da biodiversidade do semi-árido brasileiro. Bras MCT; 2006. 144 p.

Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Rev Microbiol*. 2009;35(4):340–55. doi: 10.3109/10408410903241436. PMID: 19863383.

Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol*. 2012;2012. doi: 10.1155/2012/528521.

Ramage G, Williams C. The clinical importance of fungal biofilms. vol. 84. 1st ed. Elsevier Inc.; 2013. ISBN: 9780124076730. doi: 10.1016/B978-0-12-407673-0.00002-3.

Rangel R, Capote AM, Ferrara G, Panizo MM, García N, Alarcón V, et al. Micosis superficiales: casuística del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene. *Invest Clin*. 2016;57(1):47–58.

Rodero L, Mellado E, Rodriguez AC, Salve A, Guelfand L, Cahn P, et al. G484S amino acid substitution in lanosterol 14- α demethylase (ERG11) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Nov; 47(11):3653–6. doi: 10.1128/AAC.47.11.3653-3656.2003. PMID: 14576140. PM CID: PM C253790.

Rodrigues ML, Nosanchuk JD. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(2):e0007964. doi: 10.1371/journal.pntd.0007964.

Rogers T. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Jun; 27 suppl 1:7–11. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2006.03.012. Epub 2006 May 15. PMID: 16701982.

Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*. 2017;18(1):1–26. doi: 10.1186/s12859-017-1934-z.

Ruzicka S, Edgerton D, Norman M, Hill T. The utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperate soils. *Soil Biol Biochem*. 2000;32(7):989–1005. doi: 10.1016/S0038-0717(00)00009-2.

Santos EF dos, Figueiredo EFG. Criptococose: consequência da infecção por *Cryptococcus neoformans* em pacientes com AIDS no Brasil. *Res Soc Dev*. 2021;10(15):e150101522591. doi: 10.33448/rsd-v10i15.22591.

Santos JRA, Gouveia LF, Taylor ELS, Resende-Stoianoff MA, Pianetti GA, César IC, et al. Dynamic interaction between fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(5):2553–8. doi: 10.1128/AAC.06098-11.

Scorzoni L, de Paula e Silva ACA, Marcos CM, Assato PA, de Melo WCMA, 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. PMID:28167935. PM CID: PM C5253656.

Scorzoni L, Sangalli-Leite F, de Lacorte Singulani J, de Paula e Silva ACA, 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;123:68–78. doi: 10.1016/j.mimet.2016.02.005.

Seitz LM, Mohr HE, Burroughs R, Sauer DB. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chemical Journal*. 1977;54:1207–17.

Severo CB, Gazzoni AF, Severo LC. Capítulo 3: criptococose pulmonar. *J Bras Pneumol*. 2009;35(11):1136–44. doi: 10.1590/S1806-37132009001100012.

Siddiqui ZN, Farooq F, Musthafa TNM, Ahmad A, Khan AU. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2013;17(2):237–43. doi: 10.1016/j.jscs.2011.03.016.

Sorrell TC, Juillard P-G, Djordjevic JT, Kaufman-Francis K, Dietmann A, Milonig A, et al. Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. *Microbes Infect*. 2016;18(1):57–67. doi: 10.1016/j.micinf.2015.08.017.

Spadari C de C, Wirth F, Lopes LB, Ishida K. New Approaches for Cryptococcosis Treatment. *Microorganisms*. 2020;8(4):613. doi: 10.3390/microorganisms8040613.

Spitzer M, Robbins N, Wright GD. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. *Virulence*. 2017;8(2):169–85. doi: 10.1080/21505594.2016.1196300.

Steidinger BS, Crowther TW, Liang J, Van Nuland ME, Werner GDA, Reich PB, et al. Climatic controls of decomposition drive the global biogeography of forest-tree symbioses. *Nature*. 2019;569(7756):404–8. doi: 10.1038/s41586-019-1128-0.

Svedese VM, Santos Macedo E, Ferreira Leão I, Correia Diniz M. Covid-19 e doenças fúngicas invasivas: levantamento bibliográfico e patentário. *Saúde e meio ambiente: rev interdisciplinária*. 2022;11:25–42. doi: <https://doi.org/10.24302/sma.v11.3865>.

Tits J, Cammue BPA, Thevissen K. Combination therapy to treat fungal biofilm-based infections. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):1–19. doi: 10.3390/ijms21228873.

Treviño-Rangel R de J, Villanueva-Lozano H, Hernández-Rodríguez P, Martínez-Reséndez MF, García-Juárez J, Rodríguez-Rocha H, et al. Activity of sertraline against *Cryptococcus neoformans* : in vitro and in vivo assays. *Med Mycol.* 2016;54(3):280–6. doi: 10.1093/mmy/myv109.

Van Zuuren EJ, Fedorowicz Z, Schoones J. Interventions for female pattern hair loss. *Cochrane Database of Syst Rev.* 2016;(5):CD007628. doi: 10.1002/14651858.CD007628.pub4. PMID: 27225981. PM CID: PM C6457957.

Vecchiarelli A, Pericolini E, Gabrielli E, Kenno S, Perito S, Cenci E, et al. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Future Microbiol.* 2013;8(9):1107–16. doi: 10.2217/fmb.13.84.

Vermes A. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46(2):171–9. doi: 10.1093/jac/46.2.171.

Wilcock BC, Endo MM, Uno BE, Burke MD. C2'-OH of Amphotericin B Plays an Important Role in Binding the Primary Sterol of Human Cells but Not Yeast Cells. *J Am Chem Soc.* 2013;135(23):8488–91. doi: 10.1021/ja403255s.

Zaragoza O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. *Virulence.* 2019;10(1):490–501. doi: 10.1080/21505594.2019.1614383.

Zaragoza O, Casadevall A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol Proced Online.* 2004;6(1):10–4. doi: 10.1251/bpo68.

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;10(10):2043–57. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01186.x.

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 Immun.* 2003;33(7):1957–67. doi: 10.1002/eji.200323848.

Zavala S, Baddley JW. Cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2020;41(01):069–79. doi: 10.1055/s-0039-3400280.

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. PM ID:22508310; PM CID: PM C3393448.