



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

RAQUEL TELES DE MENEZES

**EFEITO DO CLORIDRATO DE DULOXETINA FRENTE A
Cryptococcus neoformans: abordagem *in vitro* e *in vivo***

2020

RAQUEL TELES DE MENEZES

**EFEITO DO CLORIDRATO DE DULOXETINA FRENTE A *Cryptococcus*
neoformans: abordagem *in vitro* e *in vivo***

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

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

Orientadora: Profa. Dra. Liliana Scorzoni

São José dos Campos

2020

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. 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).

Menezes, Raquel Teles

Efeito do cloridrato de duloxetine frente a *Cryptococcus neoformans*: abordagem in vitro e in vivo / Raquel Teles Menezes. - São José dos Campos : [s.n.], 2020.
56 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2020.
Orientador: Liliana Scorzoni.

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. Fluconazol. 3. *Galleria mellonella*. 4. *Caenorhabditis elegans*. I. Scorzoni, Liliana, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Liliana Scorzoni (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Rodnei Dennis Rossoni

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Suelen Andreia Rossi

Universidade de São Paulo (USP)

Instituto de Ciências Biomédicas II

Campus Butantã

São José dos Campos, 27 de abril de 2020.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Francisco Teles de Menezes** e **Edinelsa Araújo Menezes**, por sempre acreditarem em mim e por terem abdicado de suas vidas em prol das realizações e da felicidade de seus filhos. Nada disso teria sentido se vocês não existissem na minha vida.

Ao meu irmão **Lucas Teles de Menezes**, por sua preocupação, carinho e incentivo.

À minha família, que está comigo em todos os momentos, especialmente à minha avó materna, **Joana Teles Araújo**, pela paciência, carinho e sabedoria.

Aos meus amigos, por todo incentivo, apoio e compreensão. A crônica “Amigos”, de Vinícius de Moraes, descreve, de forma irrefutável, o quanto vocês são importantes para mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus que por sua infinita graça me concedeu a oportunidade de alcançar esse sonho, permitindo-me concluir o mestrado.

Aos meus pais, Francisco e Edinelsa, por sempre incentivar e apoiar todas as decisões importantes que eu fiz até hoje. Minhas conquistas só foram possíveis porque eu tenho vocês ao meu lado.

Ao meu irmão Lucas, por me acompanhar e participar sempre das minhas maiores realizações.

A toda minha família que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e finalização do mestrado. Especialmente a minha avó Joana, nos momentos em família, me trouxe mais alegria.

A minha orientadora Profa. Dra. Liliana Scorzoni, por me aceitar como sua orientanda, pela paciência e profissionalismo ao mesmo tempo e principalmente pela amizade. Obrigada por acreditar em mim e pelos tantos elogios e incentivos. Tenho certeza que não chegaria neste ponto sem o seu apoio.

À Professora Adjunta Juliana Campos Junqueira, pela oportunidade de conhecê-la e compartilhar sempre seu conhecimento com todos do laboratório de microbiologia, especialmente por fazer parte da minha banca de qualificação.

À Professora Adjunta Luciane Dias de Oliveira, Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, pela dedicação e por sempre estar tão disposta a colaborar com nossas pesquisas.

A minha amiga, Thaís Cristine Pereira, que foi essencial para realização desse projeto. Obrigada pela amizade e paciência, principalmente, pela preocupação e apoio constantes.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Maíra, Cheyenne, Lívia, Evelyn e Felipe, que sempre estiveram ao meu lado, compartilhando seus

conhecimentos e também proporcionando muitos momentos felizes.

A toda equipe do laboratório de Microbiologia e Imunologia Bucal, especialmente aos colegas de trabalho, Rodnei, Patrícia, Luciana, Fabíolla, Andressa, Eliana, Jéssica e Janaína. Os meus dias foram melhores com vocês.

Ao Técnico do Laboratório, Domingos, pelo auxílio nas atividades relacionadas ao desenvolvimento do meu trabalho.

À equipe do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, em especial aos amigos e colegas, Pâmela, Karine, Keila, Renata, Bruna, Nayara, Hanna, Anderson, Daphne, Sabrina, Damara, Lucas, Simone, Mariana e Jaqueline por toda colaboração direta ou indireta e estarem presentes em todos os momentos importantes.

Aos colaboradores Prof. Dr. Haroldo César de Oliveira e Profa. Dra. Junya de Lacorte Singulani que também foram responsáveis para realização de grande parte desse trabalho.

Aos membros da equipe da Seção Técnica de Pós-graduação Sandra, Carolina e Bruno por todo suporte e paciência durante toda a minha trajetória do mestrado.

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

“Os progressos obtidos por meio do ensino são lentos; já os obtidos por meio de exemplos são mais imediatos e eficazes. ”
Sêneca

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	16
2.1 Objetivo geral	16
2.1.1 Objetivos específicos.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Microrganismos e condições de cultivo.....	17
3.2 Fármaco não antifúngico e antifúngico tradicional	18
3.3 Avaliação da atividade antifúngica e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do cloridrato de duloxetina	18
3.4 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) do cloridrato de duloxetina.....	19
3.5 Avaliação da atividade sinérgica entre cloridrato de duloxetina e fluconazol	19
3.6 Avaliação do efeito de cloridrato de duloxetina em concentração sub-inibitória e em combinações sinérgicas com fluconazol sobre o tamanho da cápsula de <i>Cryptococcus neoformans</i>	20
3.7 Avaliação da viabilidade celular de <i>C. neoformans</i> com cápsula induzida após tratamento	21
3.8 Avaliação da liberação de glucuroxilomanana (GXM) após tratamento com cloridrato de duloxetina e combinações sinérgicas com fluconazol ..	22
3.9 Análise do cloridrato de duloxetina <i>in vivo</i>	22
3.9.1 Condições de manipulação e incubação de larvas de <i>Galleria mellonella</i>	23
3.9.2 Ensaio de sobrevivência.....	23
3.9.3 Avaliação da toxicidade de cloridrato de duloxetina em <i>Galleria mellonella</i>	24
3.9.4 Avaliação da toxicidade de cloridrato de duloxetina em <i>Caenorhabditis elegans</i>	24

3.9.5 Avaliação do efeito do cloridrato duloxetine na densidade de hemócitos	26
3.9.6 Determinação da concentração de fluconazol a ser utilizada como controle em <i>G. mellonella</i>	26
3.9.7 Avaliação da eficácia do tratamento com cloridrato duloxetine isolado e em combinação com fluconazol em larvas infectadas com <i>C. neoformans</i>	27
3.9.8 Análise estatística	27
4 RESULTADO	28
4.1 Avaliação da susceptibilidade de <i>C. neoformans</i> ao cloridrato de duloxetine e às combinações sinérgicas com fluconazol	28
4.2 Avaliação do efeito do tratamento do cloridrato de duloxetine na concentração sub-inibitória e em combinações sinérgicas no tamanho da cápsula de <i>C. neoformans</i>	30
4.3 Avaliação da viabilidade celular de <i>C. neoformans</i> com cápsula induzida após tratamento	32
4.4 Quantificação da liberação glucuronoxilomanana (GXM) de <i>C. neoformans</i> após tratamento com concentrações sinérgicas	33
4.5 Análise do cloridrato de duloxetine <i>in vivo</i>	34
4.5.1 Análise da toxicidade do cloridrato de duloxetine utilizando o modelo de infecção invertebrado <i>Galleria mellonella</i>	34
4.5.2 Análise da toxicidade do cloridrato de duloxetine utilizando o nematódeo <i>Caenorhabditis elegans</i>	35
4.5.3 Contagem de hemócitos	35
4.5.4 Determinação da concentração de fluconazol a ser utilizada como controle em <i>G. mellonella</i>	36
4.5.5 Efeito do tratamento de cloridrato de duloxetine isolado e em combinação com fluconazol em <i>G. mellonella</i> após infecção por <i>C. neoformans</i>	37
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46

Menezes RT. Efeito do cloridrato de duloxetina frente a *Cryptococcus neoformans*: abordagem *in vitro* e *in vivo* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2020.

RESUMO

A criptococose se destaca pela alta incidência principalmente em pacientes imunocomprometidos, sendo responsável por um terço de todas as mortes em pacientes HIV positivos. *Cryptococcus neoformans* é o agente etiológico dessas infecções e possui uma cápsula composta, principalmente, por glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM) e é o maior fator de virulência dessa levedura. Devido ao limitado número de antifúngicos disponíveis, a toxicidade e a resistência a esses fármacos, o reposicionamento de medicamentos, ou seja, o uso de fármacos convencionalmente utilizados para outras finalidades no tratamento de uma nova doença, bem como a combinação entre os mesmos, podem ser opções importantes para o tratamento da criptococose. Os animais invertebrados têm sido amplamente utilizados na avaliação de eficácia e toxicidade de compostos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica do composto cloridrato de duloxetina (CD) isolado e em combinação com o antifúngico fluconazol (FLZ) utilizando técnicas *in vitro* e *in vivo*. Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi realizada a técnica de microdiluição de acordo com a European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Em seguida, foi realizada a avaliação da atividade sinérgica de CD em combinação com FLZ. Além disso, foram avaliados os efeitos isolados de CD bem como as combinações sinérgicas com FLZ em cápsula induzida desta levedura e também na liberação de GXM. Em relação aos ensaios *in vivo*, o efeito tóxico de CD foi avaliado nos modelos de *Caenorhabditis elegans* e em *Galleria mellonella*. Além disso, a eficácia de CD por análise de curva de sobrevivência e o efeito na concentração de hemócitos também foram avaliados em *G. mellonella*. O fármaco CD apresentou o valor de CIM e CFM de 18,5 µg/mL e quando em combinação com FLZ resultaram em 12 concentrações sinérgicas reduzindo o valor de CIM em 4 a 16 vezes para CD e 4 vezes para FLZ. A análise do efeito de CD e combinações com FLZ mostrou diminuição de 12,5% a 67% no tamanho da cápsula quando avaliadas em concentração sub-inibitória, e em combinação com o FLZ. CD foi capaz de induzir a liberação de GXM em concentração dose-dependente. Em *C. elegans* e *G. mellonella*, CD não apresentou efeito tóxico. A dose 18,5 µg/larva de CD em *G. mellonella* diminuiu 35 vezes a concentração de hemócitos em relação ao grupo PBS. O tratamento isolado e em combinação com FLZ não aumentou o percentual de sobrevivência de *G. mellonella* em relação ao grupo controle, fato que pode estar relacionado à alta lipossolubilidade do composto mantendo ligado ao corpo de gordura e impedindo assim seu efeito. Portanto, esse estudo mostrou que CD é ativo frente a *C. neoformans in vitro*, quando isolado e em combinação com fluconazol, sendo ainda capaz de agir na cápsula desta levedura e liberação de GXM.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*. Fluconazol. *Galleria mellonella*. *Caenorhabditis elegans*

Menezes RT. Evaluation of the antifungal activity of duloxetine hydrochloride in Cryptococcus neoformans: in vitro and in vivo approach [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2020.

ABSTRACT

Cryptococcosis stands out for its high incidence, mainly in immunocompromised patients, being responsible for one third of all deaths in HIV positive patients. Cryptococcus neoformans is the etiological agent of these infections and has a capsule composed mainly of glucuronoxylomannan (GXM) and galactoxylomannan (GalXM), being considered the major virulence factor of this yeast. Due to the limited number of antifungals available, the toxicity and resistance to these drugs, the repositioning of drugs, that is, the use of drugs conventionally used for other purposes in the treatment of a new disease, as well as the combination between them, may be important options for the treatment of cryptococcosis. Invertebrate animals have been widely used to evaluate the efficacy and toxicity of compounds. Thus, the objective of this study was to evaluate the antifungal activity of the compound duloxetine hydrochloride (DH) isolated and in combination with the antifungal fluconazole (FLZ) using in vitro and in vivo techniques. To determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Fungicidal Concentration (MFC), the microdilution technique was performed according to the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Then, the evaluation of the synergistic activity of DH in combination with FLZ was performed. In addition, the effects of DH as well as synergistic combinations with FLZ in capsule induced from this yeast and also in the release of glucuronoxylomannan (GXM) were evaluated. In relation to in vivo tests, the toxic effect of DH was evaluated in the models of Caenorhabditis elegans and in Galleria mellonella. In addition, DH efficacy by survival curve analysis and also the effect on hemocyte concentration were also evaluated in G. mellonella. The drug DH showed a MIC and MFC value of 18.5 µg/mL and when in combination with FLZ resulted in 12 synergistic concentrations, reducing the MIC value by 4 to 16 times for DH and 4 times for FLZ. The analysis of the effect of DH and combinations with FLZ showed a decrease of 12.5% to 67% in the size of the capsule when evaluated in sub-inhibitory concentration, and in combination with FLZ. DH was able to induce the release of GXM in dose-dependent concentration. In C. elegans and G. mellonella, DH had no toxic effect. When the treatment effect was evaluated with 18.5 µg / larva in G. mellonella, DH showed a 35-fold reduction compared to the PBS group. However, treatment alone and in combination with FLZ did not increase the percentage of G. mellonella survival in relation to the control group, a fact that may be related to the high liposolubility of the compound keeping it bound to the body of fat and thus preventing its effect. Thus, this study showed that DH is active against C. neoformans in vitro, when isolated and in combination with fluconazole, being able to act in the capsule of this yeast and release GXM.

Keywords: Cryptococcus neoformans. Fluconazole. Galleria mellonella. Caenorhabditis elegans

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas têm aumentado nos últimos anos, sendo responsáveis por grande número de mortes em todo mundo (Brown et al., 2012; Smith et al., 2015; Aguiar et al., 2017; Lin et al., 2018; Noguera et al., 2019; Santolaya et al., 2019). Entre os agentes etiológicos mais comuns dessas infecções estão as leveduras do gênero *Cryptococcus*, cuja incidência atinge milhões de pacientes por ano. Os pacientes mais suscetíveis são aqueles com o sistema imunológico acometido como os HIV positivos, transplantados ou em uso de agentes quimioterápicos (Elsegeiny et al., 2018; Damasceno-Escoura et al., 2019; Brilhante et al., 2020).

A criptococose é caracterizada como uma infecção que ocorre por inalação de leveduras ou esporos causando infecção pulmonar e podendo atingir o sistema nervoso central (Squizani et al., 2018; Dubot-Pérès et al., 2019). Apesar da existência de aproximadamente 40 espécies de *Cryptococcus*, apenas duas espécies são responsáveis pela infecção em humanos: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus Gattii* (Nascimento et al., 2017).

Cryptococcus spp. são leveduras pertencentes ao filo Basidiomycota e à família Tremellaceae. Além da capacidade de sintetizar melanina e secreção de várias proteínas (urease, fosfolipase, lacase e metaloprotease), *Cryptococcus* spp. apresenta cápsula polissacarídica, sendo um fator de virulência muito característico desse gênero (Zaragoza, Casadevall, 2004; Alspaugh, 2015; Oliveira et al., 2020). A cápsula é formada principalmente por dois polissacarídeos, glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), que estão localizadas em torno do corpo celular da levedura (Zaragoza, 2019; Silva et al., 2020). Essa estrutura de *Cryptococcus* spp. fornece resistência contra as defesas imunológicas do hospedeiro e também pode estar relacionada à resistência aos antifúngicos, uma vez que pode prejudicar na atividade dos fármacos e dificultando o tratamento (Vitale et al., 2012). *Cryptococcus neoformans* prolifera dentro das células fagocíticas do hospedeiro, o que pode conferir vantagens em termos de disseminação e proteção imunológica (McFadden et al., 2006). Outra característica importante de *Cryptococcus* spp. é sua capacidade em produzir biofilmes (Martinez, Casadevall, 2015). Essas estruturas são responsáveis pela proteção das leveduras do sistema imune além de serem consideradas como

forma de resistência a antifúngicos (Benaducci et al., 2016; Alim et al., 2018; Brilhante et al., 2020).

A terapia disponível para o tratamento da criptococose tem sido alvo de estudos devido à existência de apenas três de antifúngicos para esse fim (Azevedo et al., 2016; Elsegeiny et al., 2018). Podemos citar anfotericina B, pertencente à classe dos polienos, cujo mecanismo de ação mais conhecido é a ligação ao ergosterol, presente na membrana celular dos fungos, que forma poros e consequentemente desequilíbrio osmótico (Pathak et al., 1998). Além disso, também tem sido descrito como mecanismo de ação da anfotericina B a formação de radicais livres (Sangalli-Leite et al., 2011; Mesa-Arango et al., 2012; Mesa-Arango et al., 2014). Outro antifúngico usado no tratamento de criptococose é o fluconazol, utilizado como terapia de manutenção ou em casos mais leves, pertencente à classe dos azóis, cuja ação está relacionada à inibição da biossíntese do ergosterol, o principal esterol da membrana plasmática da maioria dos fungos (Georapadokou, Walsh, 1994). A flucitosina, um fármaco derivado da pirimidina, também é muito utilizado, pois esse composto possui ação na inibição da síntese de ácidos nucleicos (Bongomin et al., 2018).

Além do limitado arsenal de antifúngicos outros fatores também dificultam o tratamento dessa infecção, como, por exemplo, o desenvolvimento de resistência aos agentes antifúngicos disponíveis, o alto custo desses medicamentos e a demora no desenvolvimento de novos fármacos (Mount et al., 2018; Revie et al., 2018; Butts et al., 2019). Outro obstáculo encontrado se refere à toxicidade desses compostos, a qual está relacionada à grande similaridade entre as células fúngicas com as células humanas, restringindo alvos de farmacológicos específicos. Entre os efeitos tóxicos podemos citar nefrotoxicidade e a hepatotoxicidade que requerem correção de doses e de intervalos da administração e eventualmente obrigam a uma suspensão da terapia (Tverdek et al., 2016).

Diante desses desafios, novas estratégias terapêuticas vêm sendo estudadas visando melhorar o tratamento das micoses (Spitzer et al., 2017). Compostos utilizados para finalidades não antifúngicas têm sido estudadas e mostraram-se ativos contra diferentes fungos. O reposicionamento de fármacos surgiu como uma abordagem viável, pois permite o reaproveitamento de moléculas para identificação econômica e rápida de novos efeitos farmacológicos. Essa estratégia também tem

sido empregada na terapia de doenças parasitárias e em vários tipos de câncer (Santos-Gandelman et al., 2018; Truong et al., 2018).

Além disso, estudos recentes abordam o reposicionamento de fármacos para a identificação de compostos que possam atuar sinergicamente com os antifúngicos tradicionais gerando, dessa forma, uma potente alternativa terapêutica contra diversos fungos (Yu et al., 2013; Oliveira et al., 2018).

Na literatura existem relatos em relação à atividade antifúngica sinérgica dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) com antifúngicos (Lass-Flörl et al., 2001; Lass-Flörl et al., 2003; Costa Silva et al., 2017). Em 2001, Lass-Flörl et al. relataram a eficácia da atividade antifúngica sinérgica dos ISRS (fluoxetina, seroxato, sertralina, paroxetina e reboxetina) em combinação com fluconazol contra *Aspergillus* spp. e *Candida parapsilosis*. Quanto a *Cryptococcus* spp. existem estudos que apontam a atividade antifúngica da sertralina *in vitro* e *in vivo* frente a esse composto, sozinho e em combinação com anfotericina B (Treviño-Rangel et al., 2016). Gowri et al. (2020) demonstraram que a sertralina é ativa contra *Candida auris* sendo capaz de impedir a formação de hifas de *C. auris* e formação de biofilme, com 68% de inibição após o tratamento.

O cloridrato de duloxetina é um antidepressivo da classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSN) que também é utilizado no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada, e alivia a dor da neuropatia periférica e fibromialgia (Lunn et al., 2014; Ferroni et al., 2019). Apesar da descrição da atividade antifúngica de outros membros dessa classe de fármacos, não existem estudos sobre o efeito do cloridrato de duloxetina, sendo, dessa forma futuros estudos são importantes para poder proporcionar novas descobertas contra esses patógenos.

O estudo *in vivo* envolvendo mamíferos apresenta vários desafios, entre eles o elevado número de animais necessários, a longa duração do ciclo reprodutivo dos mamíferos e questões éticas (Benaducci et al., 2016; Rojas et al., 2017). Sendo assim, os modelos de infecção alternativos, como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Galleria mellonella* e zebra fish (*Danio rerio*), estão sendo utilizados como alternativas na avaliação das interações patógeno-hospedeiro (Scorzoni et al., 2013; Ames et al., 2017; Pereira et al., 2018; Segal, Frenkel, 2018). O sistema imunológico dos insetos e a resposta imune inata dos mamíferos compartilham muitas

semelhanças e, como resultado, os insetos podem ser usados para avaliar a virulência de patógenos fúngicos e fornecer resultados semelhantes aos dos mamíferos.

Um modelo que é muito utilizado para o estudo alternativo de patógenos é *G. mellonella* que são larvas da traça da cera de abelha, cujo ciclo evolutivo é tornar-se mariposa (Pereira et al., 2018; Bismuth et al., 2019). As larvas apresentam vantagens técnicas, são fáceis de usar, baratas, não possuem restrições legais e éticas como as associadas ao uso de mamíferos e são relativamente grandes em relação aos outros modelos de infecção (últimas larvas antes do estágio final apresentam cerca de 2 cm de comprimento e 250 mg), permitindo assim a injeção de doses definidas de microrganismos, podem ser mantidas em várias temperaturas (20°C a 30°C) e estudos de infecção podem ser realizada entre 15°C e acima de 37°C (Scorzoni et al., 2013; Wagley et al., 2018; Cruz et al., 2018). São também utilizadas para avaliar a toxicidade e a eficácia *in vivo* de antifúngicos (Rossi et al., 2016; Kavanagh, Sheehan, 2018; Pereira et al., 2018).

Há também outro modelo alternativo, *Caenorhabditis elegans*, que é um nematoide, da família Rhabditidae, organismo multicelular transparente de vida curta livre e possui cerca de 1 mm de comprimento. Tem sido objeto de estudo há mais de quatro décadas devido à facilidade de manipulação e apresenta várias ferramentas de genética molecular no laboratório. É um dos principais modelos utilizados para estudar o envelhecimento, e recentemente tornou-se um organismo modelo para os rastreios de ação de fármacos devido ao seu pequeno tamanho e possibilidade de uso de grande número de animais (Ewbank, Zugasti, 2011; Davies et al., 2015; Lee, Kang, 2017). Além disso, *C. elegans* é sensível a infecções causadas por diferentes espécies de bactérias e fungos (Kurz, Ewbank, 2000; Mylonakis et al., 2002; Huang et al., 2014), permitindo, investigar a eficácia de compostos (Ewbank, Zugasti, 2011; Coleman et al., 2016;).

Assim, acredita-se que a utilização do cloridrato de duloxetina, sozinho e combinado com fluconazol, poderia ser uma opção a ser estudada no tratamento da criptococose.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica do composto cloridrato de duloxetina sozinho e combinação com fluconazol frente a *Cryptococcus neoformans* *in vitro* e *in vivo*.

2.1.1 Objetivos específicos

- a) avaliar a atividade do cloridrato de duloxetina frente a *C. neoformans* ATCC 90112 através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).
- b) avaliar a atividade sinérgica do cloridrato de duloxetina em combinação com o antifúngico tradicional (fluconazol) *in vitro*.
- c) analisar o efeito do cloridrato de duloxetina isolado em concentração sub-inibitória e em combinações sinérgicas com fluconazol sobre a cápsula de *Cryptococcus neoformans* H99 bem como na liberação de seu principal componente, a glucuroxilomanana (GXM).
- d) avaliar *in vivo* a toxicidade do cloridrato de duloxetina nos modelos de infecção alternativos *Galleria mellonella* e *Caenorhabditis elegans*.
- e) avaliar o efeito do cloridrato duloxetina na densidade de hemócitos de *G. mellonella*.
- f) avaliar a eficácia do cloridrato de duloxetina em concentrações isoladas e em combinação com fluconazol no modelo *Galleria mellonella*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos e condições de cultivo

As cepas *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, *Cryptococcus neoformans* H99 (ATCC 208821) foram utilizadas para os experimentos. Essas leveduras foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose (Figura 1) e incubadas a 30 °C. Para a realização dos ensaios, as leveduras foram cultivadas em caldo Sabouraud, 150 rpm por 48 horas. *Candida krusei* ATCC 6258 foi utilizada como controle no ensaio de microdiluição em caldo, também cultivada em caldo Sabouraud por 24 horas a 37 °C. Todas as cepas pertencem ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista (ICT/UNESP) de São José dos Campos – SP.

Figura 1 – Placa de ágar Sabouraud dextrose com colônias de *C. neoformans* isoladas por técnica de esgotamento



Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 Fármaco não antifúngico e antifúngico tradicional

Cloridrato de duloxetina (Galena, Campinas, Brasil), pertencente à classe de inibidor seletivo da recaptação de serotonina e noradrenalina e o antifúngico fluconazol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) foram utilizados para a avaliação da susceptibilidade e dos efeitos sinérgicos em *Cryptococcus neoformans*.

3.3 Avaliação da atividade antifúngica e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do cloridrato de duloxetina

Para a determinação da susceptibilidade do cloridrato de duloxetina foi realizada a técnica de microdiluição de acordo com European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2017). O meio de cultura utilizado para a realização do teste de sensibilidade e diluição dos compostos foi o RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) com L-glutamina, pH 7,0, sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose tamponado com MOPS 0,165 M. O fluconazol foi utilizado como controle do teste. Cloridrato de duloxetina foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente diluído em RPMI na concentração de 1.000 µM. Foram realizadas diluições seriadas de 100 µL do composto em placa de 96 poços (faixa de concentração: 148,5 µg/mL, 74,25 µg/mL, 37,12 µg/mL, 18,56 µg/mL, 9,28 µg/mL, 4,64 µg/mL, 2,32 µg/mL, 1,16 µg/mL, 0,58 µg/mL e 0,29 µg/mL). A concentração da suspensão fúngica foi de $2,5 \times 10^5$ células/mL. Os resultados foram analisados por leitura espectrométrica a 530 nm após 48 h de incubação. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada a menor concentração em que se não observou turvação do meio de cultura indicando inibição do crescimento, considerando 90% - 100% de inibição.

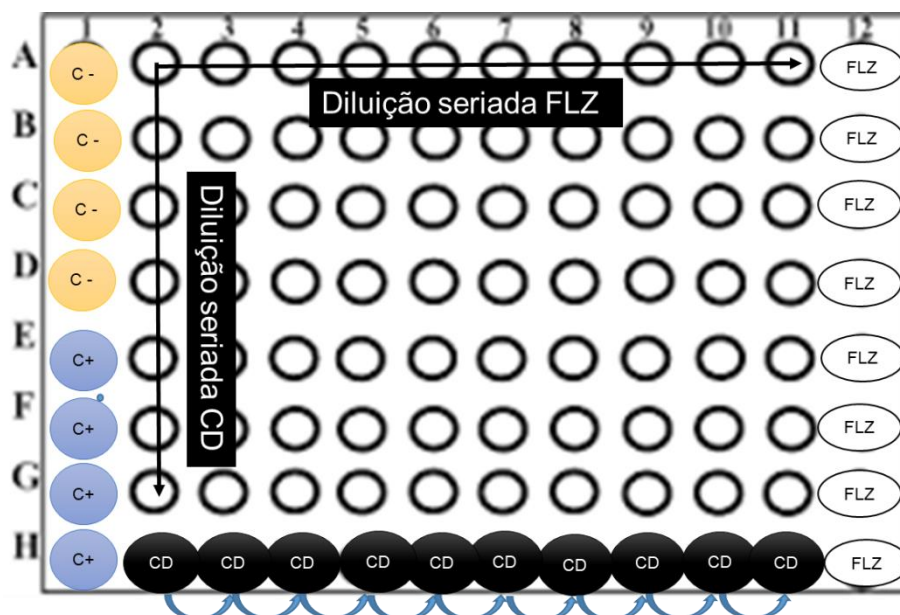
3.4 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) do cloridrato de duloxetina

Passado o tempo de incubação necessário para o teste de sensibilidade por microdiluição, uma alíquota de cada um dos 96 poços da placa de microdiluição foi retirada com auxílio de um palito de madeira estéril e colocada cuidadosamente em ágar Sabouraud. Após 48 horas de incubação a 37°C, foi verificado o crescimento ou não de colônias e as respectivas concentrações. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi determinada como a menor concentração onde não se observa o crescimento da levedura.

3.5 Avaliação da atividade sinérgica entre cloridrato de duloxetina e fluconazol

A atividade sinérgica do fluconazol foi avaliada pela técnica do “tabuleiro de xadrez” (Figura 2). Essa técnica é baseada no ensaio de microdiluição em caldo, preconizada pelo EUCAST (EUCAST, 2017). Os compostos foram adicionados às placas em concentração quatro vezes maior e foram realizadas diluições seriadas com os compostos a serem combinados. A concentração da suspensão fúngica foi de $2,5 \times 10^5$ células/mL. As placas foram incubadas a 37 °C e a leitura foi realizada após 48 horas a 530 nm através do espectrofotômetro. Para o cálculo da atividade sinérgica foi utilizado o Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) usando a equação: $\Sigma CIF = CIFA + CIFB$, onde o CIF é a razão da CIM do fármaco em combinação com a CIM sozinha (Odds, 2003; White, Burgess, Manduru, Bosso, 1996). Uma combinação foi considerada sinérgica a uma $ICIF \leq 0,5$, indiferente a $ICIF > 1$ e ≤ 4 e antagonista em $ICIF > 4,0$.

Figura 2 – Esquema de “tabuleiro de xadrez” em uma placa de 96 poços para a técnica de sinergismo



Legenda: C-: Controle negativo, apenas com meio RPMI; C+: Controle positivo, RPMI + *C. neoformans* $2,5 \times 10^5$ células/mL; CD: Cloridrato de duloxetine; FLZ: Fluconazol.

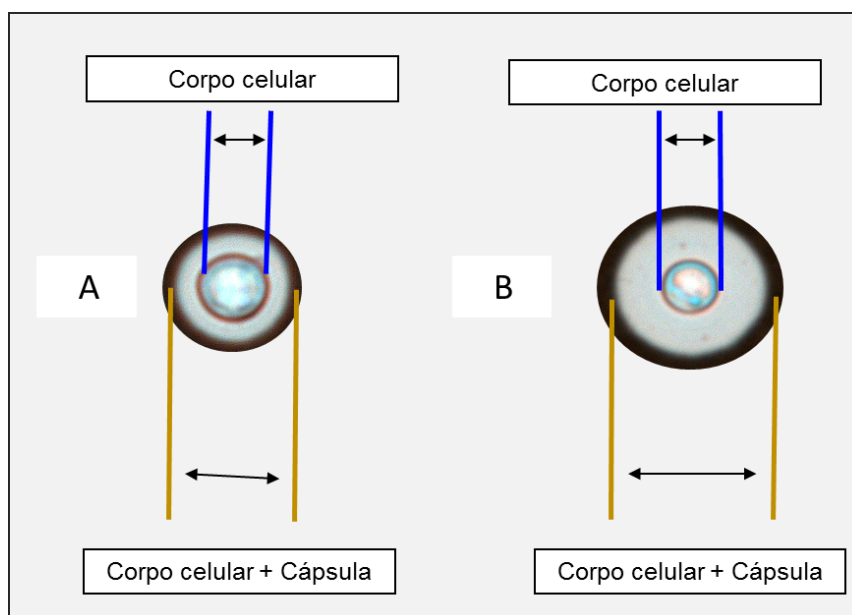
Fonte: Elaborada pela autora.

3.6 Avaliação do efeito de cloridrato de duloxetine em concentração sub-inibitória e em combinações sinérgicas com fluconazol sobre o tamanho da cápsula de *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans passou pelo processo de indução da cápsula de acordo com o protocolo descrito por (Zaragoza, Casadevall, 2004). Para isso, *C. neoformans* foi cultivado em 10 mL de caldo Sabouraud (150 rpm) por 48 horas a 30°C. Após a incubação, as células foram coletadas por centrifugação por 5 minutos a 5000 rpm, lavadas três vezes com PBS e padronizadas 5×10^6 células/mL. Após a padronização, as células foram incubadas em tubos de 1,5 mL contendo 1000 µL de meio de indução de cápsulas (Sabouraud diluído 1/10 em 50 mM MOPS, pH 7,3) por 24 horas a 37 °C. Posteriormente, as células com cápsulas induzidas, passaram por tratamento com concentração sub-inibitória (Sub-CIM) relacionada ao cloridrato de duloxetine (CD) isolado (9,28 µg/mL) e com concentrações sinérgicas (CD 4,64 µg/mL

e FLZ 1 $\mu\text{g/mL}$; CD 2,32 $\mu\text{g/mL}$ e FLZ 1 $\mu\text{g/mL}$; CD 1,16 $\mu\text{g/mL}$ e FLZ 1 $\mu\text{g/mL}$) selecionadas. Como controle, foi utilizado células com cápsulas induzidas não tratadas e células sem indução de cápsula. O tratamento foi realizado por 24 horas a 37 °C. Para a análise, as células foram coradas com tinta da China e analisadas com o auxílio do microscópio óptico (Zeiss, Alemanha) com um aumento de 400 vezes. O tamanho da cápsula foi calculado usando o Software *ImageJ*. Para o cálculo o valor do corpo celular foi subtraído do valor do corpo da célula mais cápsula, resultando assim, no valor do tamanho da cápsula (Figura 3).

Figura 3 – Comparação da cápsula de *Cryptococcus neoformans* H99 induzida e não induzida



Legenda: A) Célula de *C. neoformans* sem indução de cápsula; B) Célula de *C. neoformans* com indução de cápsula.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.7 Avaliação da viabilidade celular de *C. neoformans* com cápsula induzida após tratamento

Após tratamento em células de *C. neoformans* com cápsula induzida, foram realizadas diluições seriadas das suspensões utilizando PBS e as amostras diluídas foram plaqueadas em Sabouraud Dextrose Agar (HiMedia, Mumbai, Índia). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e as colônias foram contadas como unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC / mL).

3.8 Avaliação da liberação de glucuroxilomanana (GXM) após tratamento com cloridrato de duloxetina e combinações sinérgicas com fluconazol

A quantificação de GXM foi realizada utilizando o anticorpo anti-GXM 18B7 e quantificado pela técnica de ELISA (Casadevall et al., 1992). Após indução da cápsula de *C. neoformans* e tratamento conforme descrito no item 3.6, os sobrenadantes de *C. neoformans* foram coletados e, depois de diluídos 1:50 em PBS, 50 µL foram utilizados para sensibilizar placas de poliestireno de 96 poços a 37 °C por 1 hora. A seguir as placas foram lavadas 3 vezes com PBS e bloqueadas com 200 µL de soro albumina bovina 1% em PBS (PBS-BSA) por 1 hora a 37 °C. Após o bloqueio, a placa foi incubada com 50 µL do anticorpo anti-GXM 18B7 a uma concentração de 1 µg/ml em PBS-BSA, seguido de incubação por 1 hora a 37 °C. As placas foram então lavadas 3 vezes com PBS e então 50 µL do anticorpo secundário anti IgG-mouse conjugado a fosfatase alcalina no título de 1:1500 em 1% BSA em PBS e incubada por 1 h a 37 °C. Os poços foram novamente lavados 3 vezes com PBS e então, para a revelação da reação, a cada poço foram adicionados 50 µL do substrato paranitrofenilfosfato para fosfatase alcalina (pNPP) na concentração de 1mg/mL em tampão para fosfatase alcalina pH 9,5. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 405 nm. Como controle, uma curva padrão utilizando GXM purificada foi feita com faixa de concentrações de 5 a 0.006 µg/mL.

3.9 Análise do cloridrato de duloxetina *in vivo*

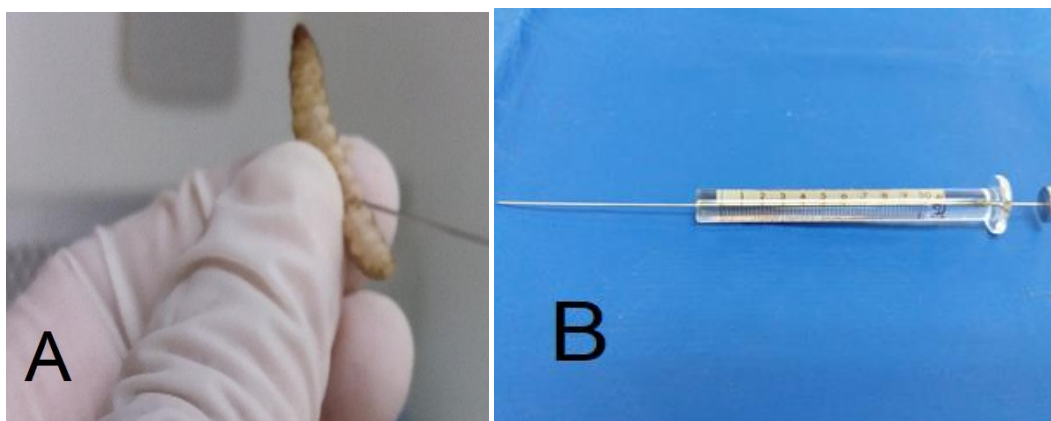
3.9.1 Condições de manipulação e incubação de larvas de *Galleria mellonella*

As larvas de *Galleria mellonella* utilizadas nesse estudo foram mantidas e incubadas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia - UNESP São José dos Campos-SP, assim como descrito por Jorjão et al. (2017). As larvas de *G. mellonella* em seus últimos estágios larvais foram selecionadas com peso entre 250 a 300 mg, agrupadas em placas de Petri (grupos de 10 larvas) e incubadas a 37 °C, sem alimento, antes da realização dos experimentos. Larvas com alterações de cor foram excluídas. Antes da infecção, foi realizada a assepsia das *prolegs* com etanol a 70%. A suspensão da levedura e os antifúngicos foram injetados nas larvas com auxílio de seringas Hamilton (Hamilton, EUA) de 10 µL. Para cada condição, um total de 10 larvas foi utilizado em cada experimento e foi repetido pelo menos duas vezes.

3.9.2 Ensaio de sobrevivência

Para as curvas de sobrevivência foram utilizados inóculos de 10^6 células/larva de *C. neoformans* de acordo com Sangalli et al. (2016) (Figura 5). As suspensões fúngicas foram preparadas em PBS e infectadas através da *proleg* esquerda, incubadas a 37 °C e monitoradas durante sete dias. A morte das larvas foi avaliada por falta de movimento após tocá-las com uma pinça. Como controle, as larvas receberam apenas PBS.

Figura 5 – Inoculação na *proleg* da larva utilizando a seringa Hamilton Inc., EUA



Legenda: a) Inoculação na última *proleg* esquerda da larva de *G. mellonella*; b) Seringa Hamilton Inc., EUA.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.9.3 Avaliação da toxicidade de cloridrato de duloxetina em *Galleria mellonella*

Antes de iniciar os experimentos de eficácia dos tratamentos, foi realizado o ensaio de toxicidade. As larvas foram tratadas com as concentrações 18,5 µg/larva, 37 µg/larva e 74,2 µg/larva de cloridrato de duloxetina (1 vez o valor de CIM, 2 vezes o valor de CIM e 3 vezes o valor de CIM, convertidos em dose considerando o peso da larva), incubadas a 37 °C e monitoradas durante sete dias. Como controle, foi utilizado um grupo de larvas injetadas com PBS.

3.9.4 Avaliação da toxicidade de cloridrato de duloxetina em *Caenorhabditis elegans*

Também foi feito ensaio de toxicidade em *C. elegans* e para isso foi utilizada a cepa N2 (cepa padrão) (Figura 4). As larvas foram mantidas em meio NGM (Nematode Growth Media) contendo cultura de *E. coli* OP50, a qual é utilizada como alimento para *C. elegans* (Stiernagle, 2019). Para a realização dos experimentos foi

necessária a sincronização das larvas, para isso, as larvas contendo ovos em seu interior foram submetidas a um tratamento com água sanitária (4 mL de 1M NaOH; 2,6 mL de hipoclorito de sódio 10-13%; 8 mL de água). Nessa etapa, o objetivo foi matar todas as larvas para que apenas fiquem vivos os ovos, obtendo, dessa forma, após 2-3 dias de incubação a 25°C as larvas no estágio L4-adulto, prontas para serem utilizadas nos ensaios.

Figura 4 – *C. elegans* observado em microscópio óptico



Fonte: Elaborada pela autora.

Para o ensaio de toxicidade foi feito primeiramente uma lavagem das larvas de *C. elegans* com NaCl 50 mM. Depois foi preparada a placa de 24 poços com concentrações diversas de cloridrato de duloxetine (18,56 µg/mL, 37,12 µg/mL e 74,25 µg/mL), as quais foram diluídas em BHI com 2% de glicose + NaCl 50mM, acrescido de 10 µg/mL de colesterol, 200 µg/mL ampicilina e 200 µg/mL streptomycin. Como controle, foram utilizados nematóides sem tratamento (Tampakakis et al., 2008). Quinze a vinte nematóides foram separados por poço para avaliação, a placa foi

incubada a 25°C e a morte das larvas foi avaliada após 2 h e 24 h com auxílio de lupa.

3.9.5 Avaliação do efeito do cloridrato de duloxetina na densidade de hemócitos

As larvas foram tratadas com cloridrato de duloxetina em diferentes concentrações (1 vez o valor de CIM (18,52 µg/mL), 2 vezes o valor de CIM (37,12 µg/mL) e 3 vezes o valor de CIM (74,25 µg/mL) após a incubação de 3 horas à 37 °C, a hemolinfa foi coletada. Para isso, as larvas foram cortadas com bisturi na parte ventral no sentido céfalo-caudal e pressionadas para a retirada da hemolinfa que foi coletada em microtubos de 1,5 mL. A seguir, 10 µL de cada hemolinfa coletada foram diluídos em 990 µL de IPS (tampão anticoagulante estéril – 150 nM de cloreto de sódio, 5 nM de cloreto de potássio, 10 nM de tris-HCL PH 6,9, 10 nM de EDTA e 30 nM de citrato de sódio) em microtubos. Como controle foram usadas larvas tratadas com PBS.

Para a contagem dos hemócitos foi utilizado hemocitômetro. Neste ensaio analisamos se houve alterações nas quantidades de hemócitos em *G. mellonella* ocasionados pelos tratamentos com fármacos.

3.9.6 Determinação da concentração de fluconazol a ser utilizada como controle em *G. mellonella*

Antes do início dos ensaios de eficácia, foi realizado o tratamento com diferentes concentrações de fluconazol para determinar a concentração eficaz desse fármaco a ser utilizada como controle. As larvas foram infectadas com 10⁶ células/larva de *C. neoformans* através da *proleg* direita e tratados com fluconazol (10 mg/Kg, 20 mg/Kg e 30 mg/Kg). Posteriormente, as larvas foram incubadas a 37°C e a sobrevivência monitorada diariamente durante 7 dias consecutivos.

3.9.7 Avaliação da eficácia do tratamento com cloridrato duloxetina isolado e em combinação com fluconazol em larvas infectadas com *C. neoformans*

Para a avaliação da eficácia do cloridrato de duloxetina isolado, as larvas de *G. mellonella* foram infectadas com 10^6 células/larva de *C. neoformans* através da *proleg* direita. Após uma hora de infecção as larvas foram tratadas com várias concentrações do cloridrato de duloxetina (1 vez o valor de CIM (18,56 µg/mL), 2 vezes o valor de CIM (37,12 µg/mL) e 3 vezes o valor de CIM (74,25 µg/mL)). Também foi realizado o mesmo ensaio com a combinação sinérgica entre o cloridrato de duloxetina (4,64 µg/mL) e fluconazol (1 µg/mL). Como controle, foi selecionado um grupo com larvas que receberam somente PBS, um grupo que recebeu a suspensão fúngica sem tratamento e por fim outro grupo tratado apenas com fluconazol na concentração já determinada. Após isso, as larvas foram incubadas a 37°C e a sobrevivência foi monitorada durante 7 dias consecutivos. Para cada experimento, foram utilizados grupos contendo 10 larvas. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

3.9.8 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Os resultados obtidos pelo efeito do fármaco isolado e das combinações sinérgicas no tamanho da cápsula e de liberação de GXM, assim como a análise da contagem de hemócitos, foram analisados pelo One-way ANOVA (Tukey) e teste t (teste de Mann-Whitney) com nível de significância de $p \leq 0,05$. Para comparar as curvas de sobrevivência em *Galleria mellonella* e *Caenorhabditis elegans* foram utilizados o teste de Log-rank (Mantel-Cox).

4 RESULTADO

4.1 Avaliação da susceptibilidade de *C. neoformans* ao cloridrato de duloxetina e às combinações sinérgicas com fluconazol

O cloridrato de duloxetina foi avaliado frente a *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 e este composto foi ativo com Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima de 18,5 µg/mL. *Candida krusei* ATCC 6258, que foi usada como controle no ensaio de microdiluição, apresentou CIM e CFM de 37,12 µg/mL para cloridrato de duloxetina. A concentração inibitória mínima de *C. krusei* ATCC 6258 para fluconazol é 32 mg/L, de acordo com EUCAST (2017).

Além disso, foram encontradas 12 combinações sinérgicas as quais foram capazes de diminuir o valor da CIM e de CFM de 4 a 16 vezes para CD e de 4 a 32 vezes para FLZ. Os valores do ICFI foram considerados promissores, mostrando um efeito sinérgico. A atividade antifúngica pode ser observada no Quadro 1.

Quadro 1 - Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do cloridrato de duloxetina e Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) do cloridrato de duloxetina e fluconazol em combinação contra *C. neoformans* ATCC 90112

Valores de CIM (μg / mL)		Concentrações sinérgicas encontradas (μg / mL)		Valores de ICIF	Redução da concentração em comparação com a CIM	
CD	FLZ	CD	FLZ		CD	FLZ
18,5	4	4,6	1	0,49	4x	4x
18,5	4	2,3	1	0,37	8x	4x
18,5	4	1,1	1	0,31	16x	4x
18,5	4	4,6	0,5	0,37	4x	8x
18,5	4	2,3	0,5	0,24	8x	8x
18,5	4	1,1	0,5	0,18	16x	8x
18,5	4	4,6	0,25	0,31	4x	16x
18,5	4	2,3	0,25	0,18	8x	16x
18,5	4	1,1	0,25	0,12	16x	16x
18,5	4	4,6	0,125	0,28	4x	32x
18,5	4	2,3	0,125	0,15	8x	32x
18,5	4	1,1	0,125	0,09	16x	32x

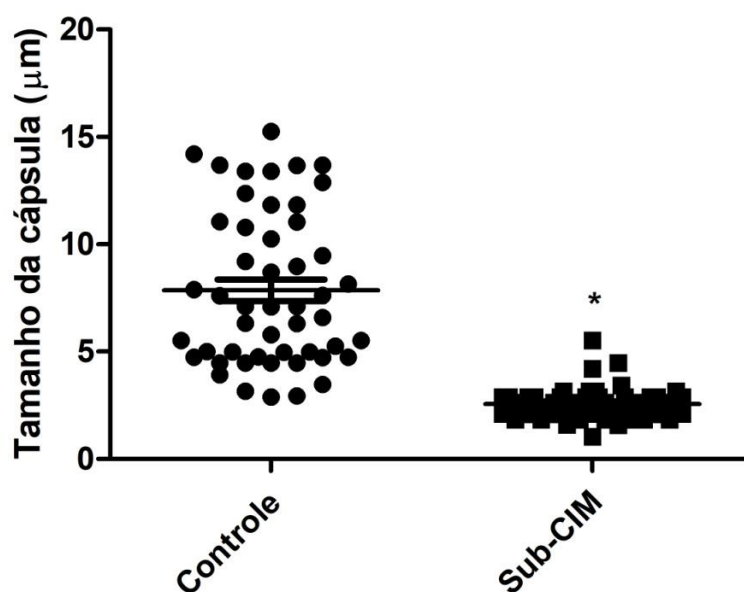
Legenda: CD: cloridrato de duloxetina; FLZ: fluconazol; CIM: Concentração Inibitória Mínima; ICIF: índice de concentração fracionária inibitória.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Avaliação do efeito do tratamento do cloridrato de duloxetine na concentração sub-inibitória e em combinações sinérgicas no tamanho da cápsula de *C. neoformans*

Depois que as células foram cultivadas em meio de indução de cápsula, elas receberam os tratamentos com cloridrato de duloxetine (CD) isolado equivalente a concentração sub-inibitória (9.28 µg/mL) e em combinações sinérgicas com o fluconazol (FLZ) (CD 4,64 µg/mL e FLZ 1 µg/mL; CD 2,32 µg/mL e FLZ 1 µg/mL; CD 1,16 µg/mL e FLZ 1 µg/mL) por 24 h. Os efeitos das concentrações isoladas de CD (4,64 µg/mL, 2,32 µg/mL e 1,16 µg/mL) e de fluconazol (1 µg/mL), também foram avaliados. O fármaco CD na concentração sub-inibitória (9.28 µg/mL) reduziu 67% do tamanho da cápsula de *C. neoformans* ($p < 0,0001$) em comparação com o controle não tratado (Figura 6).

Figura 6- Avaliação do tamanho da cápsula de *C. neoformans* após tratamento com cloridrato de duloxetine em concentração sub-inibitória mínima (Sub-CIM)



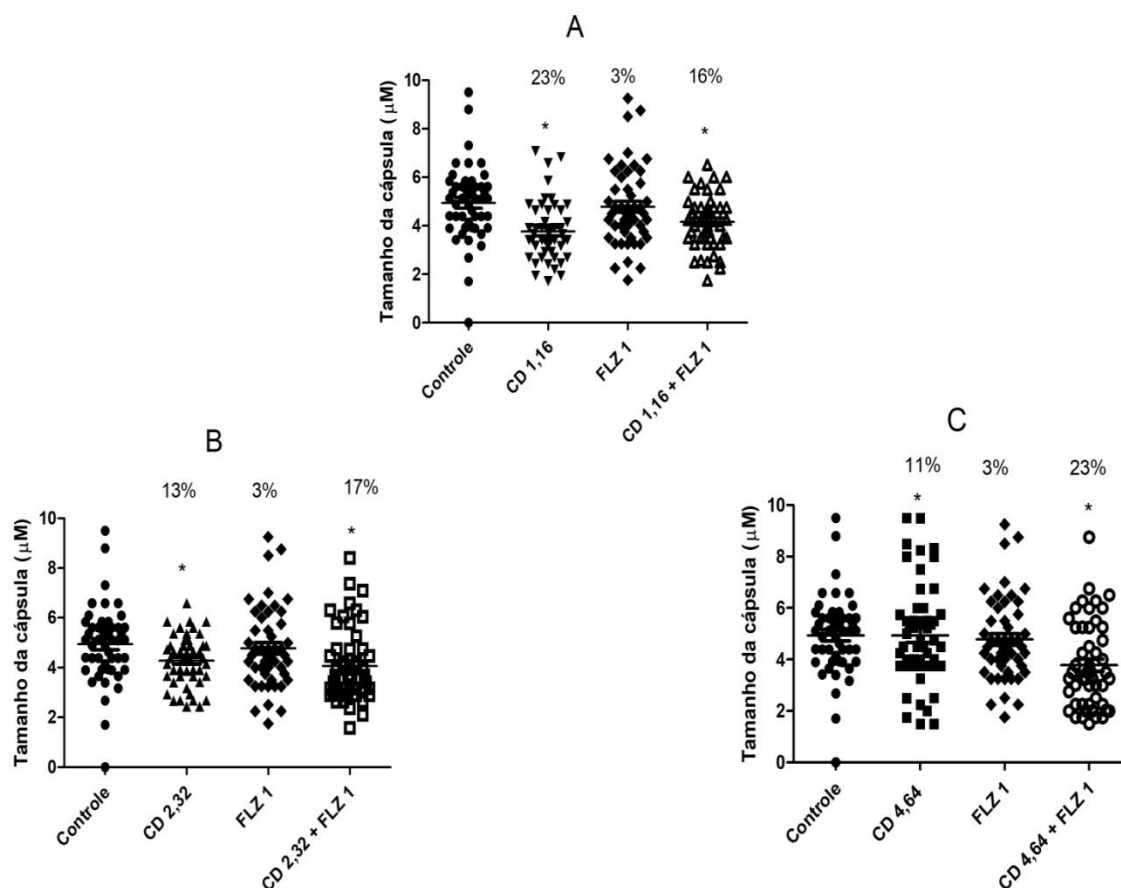
Legenda: Sub-CIM: concentração sub-inibitória mínima; CD: cloridrato de duloxetine; Controle: *C. neoformans* H99 5×10^6 células/mL; *: apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle.
Fonte: Elaborado pela autora.

Em relação aos tratamentos sinérgicos realizados, a concentração sinérgica de CD 1,16 µg/mL e FLZ 1 µg/mL foi responsável por reduzir a cápsula de *C. neoformans* em 16% ($p=0,0019$) em relação ao controle. Além disso, o tratamento isolado com CD 1,16 µg/mL reduziu 23% ($p<0,0001$) em relação ao controle e FLZ 1 µg/mL foi responsável por reduzir 3% do tamanho da cápsula ($p=0,2931$). Ao comparar o tratamento isolado de CD 1,16 µg/mL com a combinação de CD 1,16 µg/mL e FLZ 1 µg/mL, apresentou diferença significativa ($p=0,0312$). Entretanto, o FLZ 1 µg/mL isolado não apresentou diferença estatística em relação à combinação de CD 1,16 µg/mL e FLZ 1 µg/mL (Figura 7A).

A concentração sinérgica de CD 2,32 µg/mL e FLZ 1 µg/mL foi responsável por reduzir a cápsula em 17% ($p=0,0006$) em relação ao controle. Os compostos isolados apresentaram 13% ($p=0,0051$) de redução quando tratado com CD 2,32 µg/mL e 3% quando tratado apenas com FLZ 1 µg/mL ($p=0,2931$) em relação ao controle. Considerando a comparação de CD 2,32 µg/mL e a combinação sinérgica CD 2,32 µg/mL e FLZ 1 µg/mL, não foi observada diferença estatística ($p=0,1067$), porém o FLZ isolado apresentou diferença estatística em relação à combinação ($p=0,0037$) (Figura 7B).

A combinação CD 4,64 µg/mL e FLZ 1 µg/mL reduziu o tamanho da cápsula em 23% ($p=0,0016$) em relação ao controle. Os tratamentos com concentrações isoladas apresentaram 11% ($p=0,5836$) de redução quando tratado com CD 4,64 µg/mL e 3% quando tratado apenas com FLZ 1 µg/mL ($p=0,2931$) quando comparados ao controle. Além disso, a comparação do tratamento de CD 4,64 µg/mL e a combinação sinérgica CD + FLZ apresentou diferença estatística ($p=0,0022$). FLZ 1 µg/mL isolado também apresentou diferença significativa em relação à combinação sinérgica ($p=0,0016$) (Figura 7C).

Figura 7- Avaliação do tamanho da cápsula de *C. neoformans* após tratamento com cloridrato de duloxetine em concentrações equivalentes ao valor sinérgico

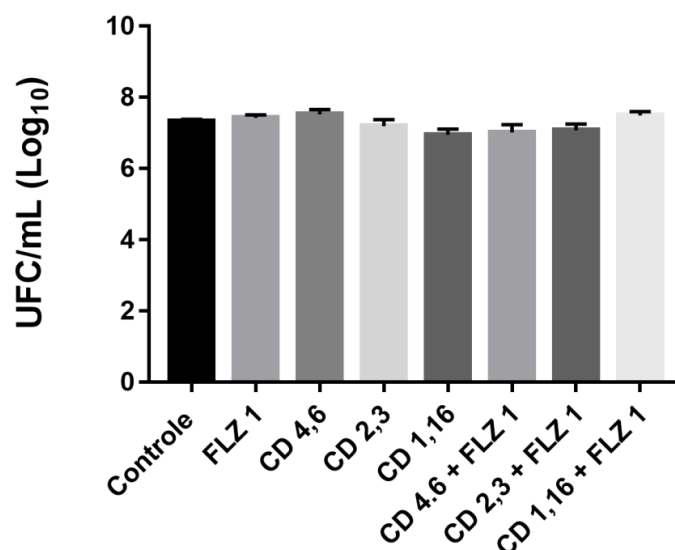


Legenda: CD: cloridrato de duloxetine; FLZ: fluconazol; Controle: *C. neoformans* H99 5×10^6 células/mL; *: apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 Avaliação da viabilidade celular de *C. neoformans* com cápsula induzida após tratamento

A análise da contagem de UFC/mL de *C. neoformans* com cápsula induzida tratados com concentrações sub-inibitórias de CD, bem como combinações com FLZ mostrou que as concentrações avaliadas não foram capazes de causar a morte de *C. neoformans* após os tratamentos (Figura 8).

Figura 8- Avaliação do efeito tratamento com cloridrato de duloxetina em concentrações equivalentes ao valor sinérgico sozinha e combinada com FLZ em *C. neoformans* com cápsula induzida

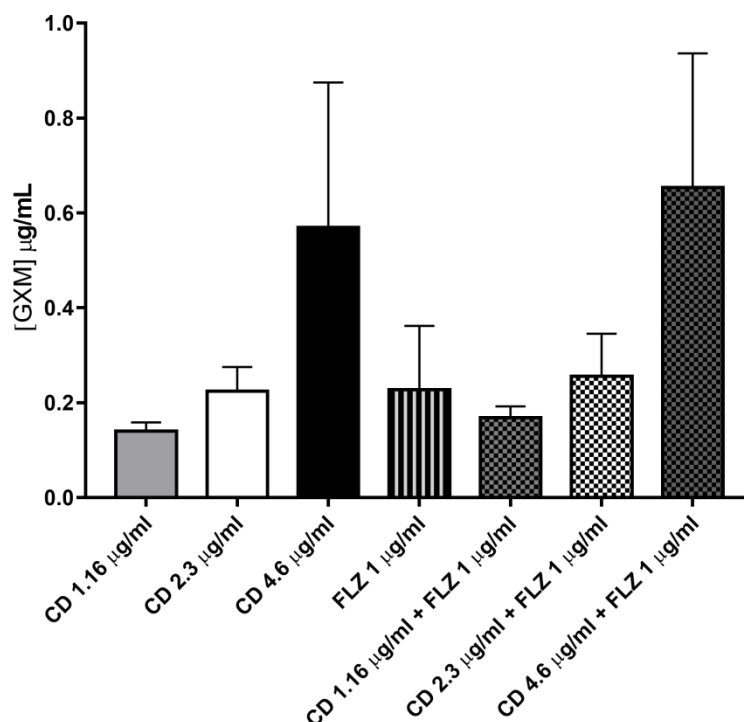


Legenda: CD: cloridrato de duloxetina; FLZ: fluconazol; Controle: *C. neoformans* H99 5x10⁶ células/mL;
 Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 Quantificação da liberação glucuronoxilomanana (GXM) de *C. neoformans* após tratamento com concentrações sinérgicas

O ensaio de liberação de GXM de *C. neoformans* mostrou que, existe uma relação de liberação de GXM dose-dependente em relação ao tratamento utilizado, ou seja, quanto maior a concentração de cloridrato de duloxetina usado, maior é a liberação de GXM (Figura 9). Apesar de não existir diferenças estatísticas entre os grupos o ensaio de ELISA é bastante específico, além disso, a utilização do anticorpo monoclonal nesse teste o torna ainda mais confiável.

Figura 9- Liberação de glucuronoxilomanana (GXM) após tratamento com concentrações sinérgicas



Legenda: CD: cloridrato de duloxetina; FLZ: fluconazol; GXM: glucuronoxilomanana.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 Análise do cloridrato de duloxetina *in vivo*

4.5.1 Análise da toxicidade do cloridrato de duloxetina utilizando o modelo de infecção invertebrado *Galleria mellonella*

Antes de iniciar os tratamentos das larvas de *G. mellonella*, foi realizado o ensaio de toxicidade do cloridrato de duloxetina. Após 7 dias de acompanhamento, todos os grupos de larvas tratadas (18,5 µg/larva, 37,12 µg/larva e 74,25 µg/larva), obtiveram 100% de sobrevivência.

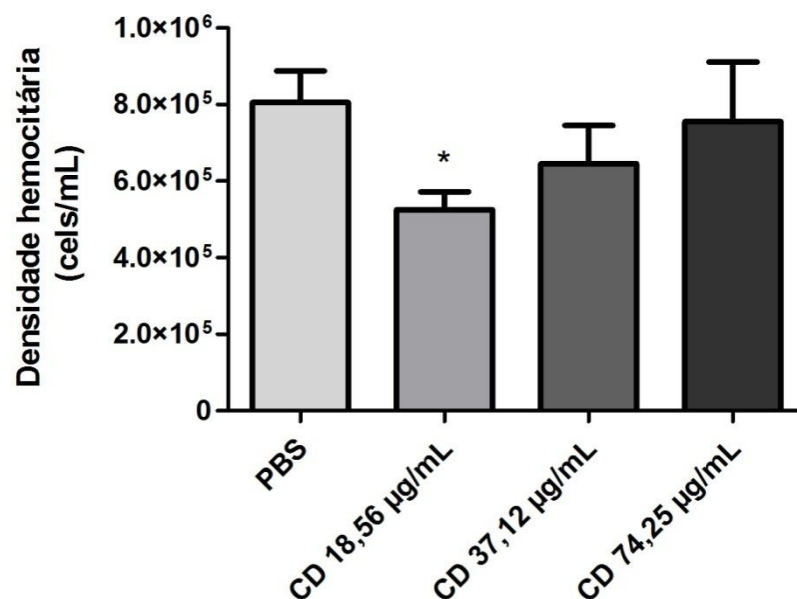
4.5.2 Análise da toxicidade do cloridrato de duloxetina utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans*

Também foi realizado o ensaio de toxicidade do cloridrato de duloxetina em *C. elegans*. Os nematódes foram acompanhados após 2 horas e após 24 horas. Todos os grupos de larvas tratadas (148,5 µg/mL, 74,25 µg/mL, 37,12 µg/mL, 18,56 µg/mL e 9,28 µg/mL), obtiveram 100% de sobrevivência.

4.5.3 Contagem de hemócitos

Para analisar o comportamento do sistema imune celular de *G. mellonella* após o tratamento com cloridrato de duloxetina foi determinada a concentração de hemócitos das larvas decorridas 3 horas de tratamento. O grupo que recebeu o tratamento de 1 vez o valor de CIM de CD apresentou redução significativa na concentração dos hemócitos em relação ao grupo controle (PBS) ($p = 0,0101$). Já os grupos que receberam o tratamento com 2 vezes e 3 vezes o valor da CIM de CD não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao grupo controle apresentando $p = 0,0883$ e $p = 0,7309$, respectivamente (Figura 10).

Figura 10 - Análise da densidade hemocitária de *G. mellonella*



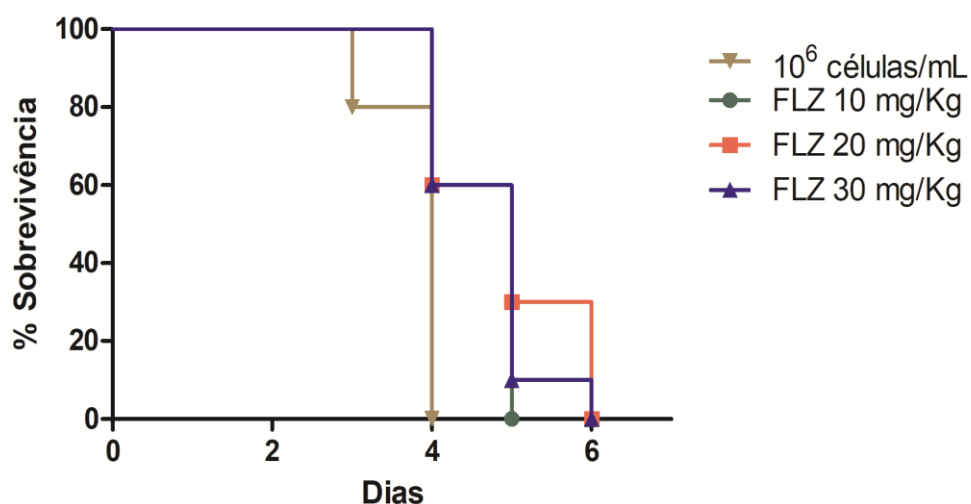
Legenda: PBS: *phosphate buffered saline*; CD: cloridrato de duloxetina; *: apresentou diferença estatística em relação ao controle.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.4 Determinação da concentração de fluconazol a ser utilizada como controle em *G. mellonella*

As larvas foram infectadas com 10⁶ células/larva de *C. neoformans* através da *proleg* direita e tratados com fluconazol (10 mg/Kg, 20 mg/Kg e 30 mg/Kg). Todas as concentrações avaliadas foram eficazes aumentando a sobrevivência das larvas, não havendo diferenças significativas entre elas. Para os ensaios posteriores, a concentração de 30 mg/Kg de FLZ foi selecionada (Figura 11).

Figura 11– Determinação da concentração de FLZ a ser utilizada como controle em *G. mellonella*

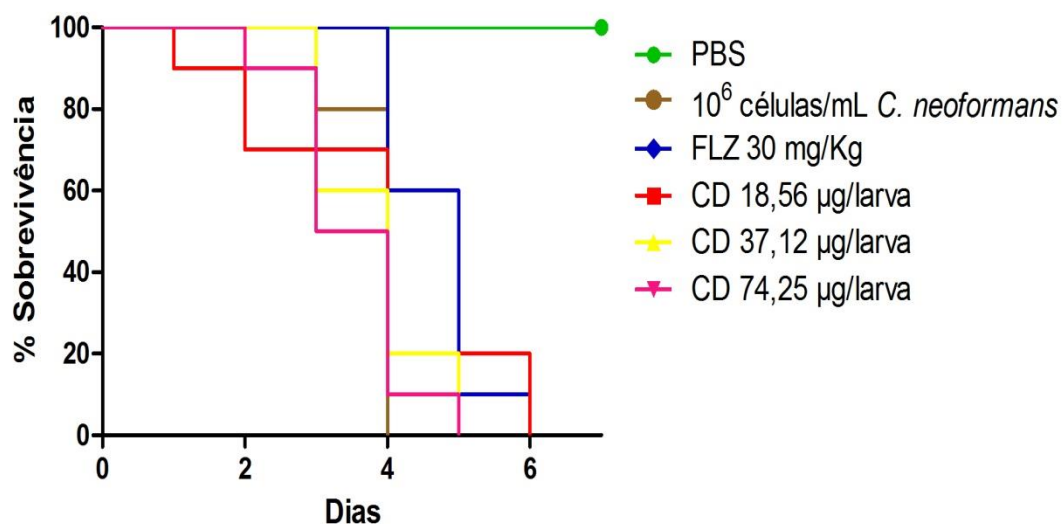


Legenda: FLZ: fluconazol.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.5 Efeito do tratamento de cloridrato de duloxetine isolado e em combinação com fluconazol em *G. mellonella* após infecção por *C. neoformans*

O tratamento realizado com CD com o valor correspondente a 1 vez a CIM (18,56 µg/larva), 2 vezes a CIM (37,12 µg/larva) e 3 vezes a CIM (74,25 µg/larva) não aumentaram o percentual de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* em relação ao grupo controle, não sendo eficaz como tratamento (Figura 12).

Figura 12- Avaliação da eficácia do cloridrato de duloxetina

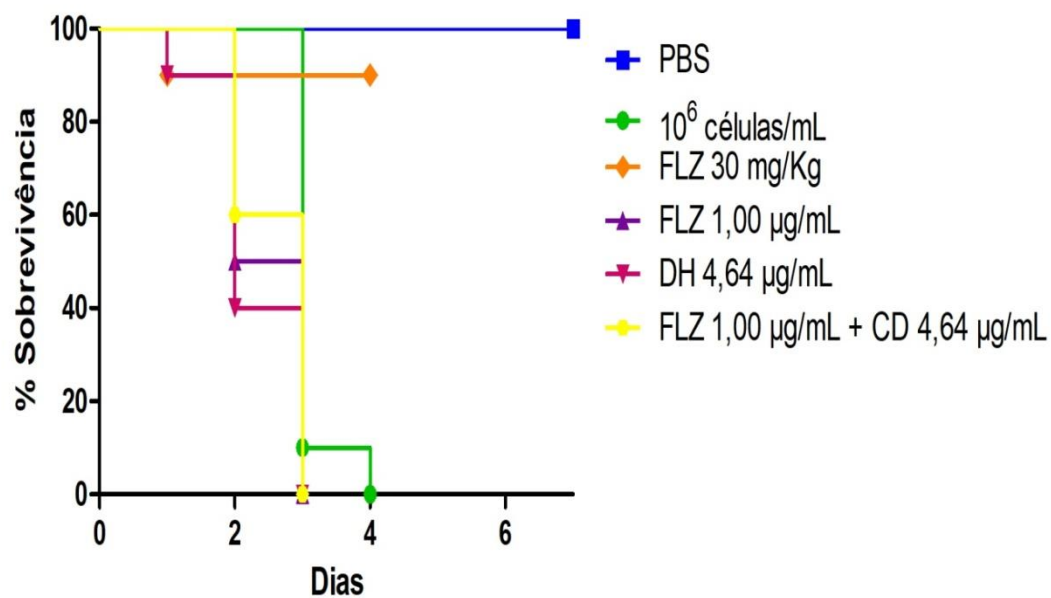


Legenda: CD: cloridrato de duloxetina; FLZ: fluconazol; PBS: *Phosphate-buffered saline* (Solução Tampão).

Fonte: Elaborado pela autora.

No tratamento realizado com a combinação de cloridrato de duloxetina (4,64 μ g/mL) e fluconazol (1 μ g/mL), também não foi observada aumento da sobrevivência das larvas (Figura 13).

Figura 13- Avaliação da combinação entre cloridrato de duloxetina e fluconazol em *Galleria mellonella*



Legenda: FLZ: fluconazol; PBS: *Phosphate-buffered saline* (Solução Tampão); CD: cloridrato de duloxetina.

Fonte: Elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

As infecções fúngicas são patologias muito relevantes nos dias atuais (Ostrosky-Zeichner, Sobel, 2016). O aumento da população de pacientes imunossuprimidos, e a maior longevidade resultante de inovações na tecnologia médica contribuíram com a sobrevivência da população, entretanto os tornaram mais susceptíveis a essas infecções (Lockhart, Guarner, 2019; Salehi et al., 2019). Pacientes com infecção por HIV e contagem de células CD4 com menores que 100 células/ μ L possuem maior risco de criptococose (Jarvis, Harrison, 2007).

Na terapia anticriptocócica, é utilizada a anfotericina B, pertencente à classe dos polienos, fluconazol pertencente à classe dos azóis e o derivado pirimidínico flucitosina (Zhao et al., 2018). Ainda que a anfotericina B seja o tratamento mais eficaz para criptococose, o fluconazol é mais amplamente utilizado devido ao baixo custo e menor toxicidade, porém há resistência clínica dos azóis associada à mutação no alvo do fármaco, alterações das vias de sinalização do estresse e superexpressão de genes da bomba de efluxo (Silva et al., 2020).

As dificuldades na terapia para criptococose estão associadas aos antifúngicos que possuem algumas limitações, sendo elas: a resistência fúngica, a alta toxicidade e também o elevado custo (Rohilla et al., 2019). Portanto, seria benéfico se encontrassem tratamentos alternativos para determinada infecção e assim reduzir o uso de outros medicamentos, como a anfotericina B, por exemplo, devido ao seu alto custo e alta toxicidade (Grossman, Casadevall, 2017).

O reposicionamento de fármacos, ou seja, reutilização de compostos já utilizados para novos fins terapêuticos, possui base histórica para cuidados à saúde e representam uma estratégia eficaz, muitas vezes, de baixo custo e sem riscos, principalmente para os países em desenvolvimento (Ashburn, Thor, 2004; Zhai et al., 2012; Gu et al., 2016; Xue et al., 2018). A sertralina, inibidor seletivo da recaptação de serotonina, mostrou *in vitro* atividade fungicida contra *C. Neoformans* (Treviño-Rangel et al., 2016). O efeito da sertralina em combinação com fluconazol foi sinérgico contra *Cryptococcus* de acordo com Spitzer et al. (2011). Além disso, foi demonstrado em alguns estudos que a concentração é de

20 a 40 vezes maior na região cerebrospinal validando o potencial uso terapêutico da sertralina na meningite criptocócica (Tremaine et al., 1989).

No presente estudo, foi verificada a atividade antifúngica do inibidor seletivo de serotonina e noradrenalina, cloridrato de duloxetina, com valores de CIM 18,5 µg/mL e CFM de igual valor. Após verificar a atividade antifúngica do fármaco isolado, foi verificado se esse composto possuía atividade sinérgica com o antifúngico fluconazol. Observou-se diminuição no valor da CIM de 4 a 16 vezes para CD e de 4 a 32 vezes para FLZ quando usados em combinação.

Resultados semelhantes foram observados no estudo de Gu et al. (2016), onde foram avaliados os efeitos sinérgicos do inibidor seletivo da recaptação de serotonina, fluoxetina, combinada com azóis contra *Candida albicans*. Combinações resultaram em atividade sinérgica para *C. albicans*, porém efeito indiferente foi observado para *Candida* não-*albicans*. Fluoxetina combinada com azóis (fluconazol, itraconazol e voriconazol) foi responsável por diminuir em até 8 vezes a CIM da fluoxetina e em até 128 vezes a CIM de fluconazol, itraconazol, e voriconazol quando testados em *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*. Já Zhai et al. (2012) demonstraram que em isolados de *Cryptococcus* spp., os valores de CIM da sertralina variaram de 2 a 6 µg/mL e foram reduzidos de 1-3 vezes quando combinados com fluconazol.

Guess et al. (2018), em seus estudos, revelaram que o tamanho da cápsula de *C. neoformans* pode variar quando em condições estressantes ou com pouco nutrientes. Além disso, a cápsula de *Cryptococcus* spp. é responsável por mascarar *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) como manana e 1-3 β glucana, evitando assim a fagocitose e o reconhecimento pelo sistema imune (Cross, Bancroft 1995). Dessa forma, a utilização de compostos com ação na cápsula poderia auxiliar o reconhecimento dessa levedura pelo sistema imune, e como consequência melhorar sua eliminação. Nesse estudo, a cápsula de *C. neoformans* foi induzida para ajudar a entender os efeitos de diferentes tratamentos nas leveduras. Os fármacos em questão quando avaliados em cápsulas induzidas, em concentrações sub-inibitórias e sinérgicas (isoladas e combinadas), diminuíram o tamanho capsular das leveduras entre 11 % a 67 %.

Um dos principais componentes da cápsula de *Cryptococcus* spp. é a glucuronoxilomana (GXM), e sua liberação para a formação da cápsula depende de suas vesículas extracelulares que são compostas por ergosterol (Casadevall, 1992; Silva, 2020). Dados mostram que o tratamento com claritromicina (CAM) e azitromicina, ambos antibióticos, reduziram significativamente a espessura da cápsula em 20 vezes em relação ao controle, assim como a quantidade de polissacarídeo capsular, das leveduras *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* (Nakamura et al., 2019). Joffe et al. (2017), demonstrou influência do mebendazol, um anti-helmintico, na liberação de GXM e também no tamanho da cápsula. Concentrações de mebendazol inferiores a 0,3125 μ M não apresentaram efeitos em *C. neoformans*, porém a 0,3125 μ M ou superior, foi observada atividade antifúngica significativa após 6 a 12 h de exposição de *C. neoformans* à droga. Após 48 h, o mebendazol matou 100% das células fúngicas, na presença de concentração sub-inibitória (0,22 μ M) do medicamento e também afetou o tamanho da cápsula e a morfologia fúngica, incluindo perda de forma esférica, alterações dos sulcos intracelulares e dimensões capsulares reduzidas ($p < 0,05$). Sobrenadantes de células fúngicas cultivadas na presença de mebendazol foram utilizados para quantificação de GXM por ELISA e, foi observado aumento da concentração de GXM, principalmente na faixa da CIM. A hipótese para esse resultado é que o aumento da GXM seria resultado do vazamento induzido por danos na membrana. Em nosso estudo verificamos que o cloridrato de duloxetina influenciou na liberação de GXM, além disso, quanto maior a concentração do fármaco (CD 1,16 μ g/mL), maior é a liberação de GXM (GXM 0,9 μ g/mL), conseqüentemente podendo influenciar na formação de cápsula.

Os estudos *in vitro* são necessários, porém é importante avaliar os mesmos em organismos complexos, realizando os ensaios *in vivo* (Segal, Frenkel, 2018). *Caenorhabditis elegans* é um modelo alternativo adequado para determinar a toxicidade de compostos farmacêuticos antes de realizar testes em mamíferos, porém ainda estão sendo descritos na literatura (Muhammed et al., 2012). Por esse motivo, investigamos a toxicidade do cloridrato de duloxetina em *C. elegans* mostrando que cloridrato de duloxetina não foi tóxico nas concentrações avaliadas.

As larvas de *Galleria mellonella* podem ser usadas para avaliar a toxicidade *in vivo* de antifúngicos e estudo de virulência de micro-organismos, entre esses *C. neoformans* (Jemel, 2020). Em *G. mellonella* a levedura pode se proliferar na larva mesmo que ocorra a fagocitose (de Castro Spadari et al., 2019). Em nosso estudo, foi observada a redução de hemócitos após o tratamento com o cloridrato de duloxetine na concentração mais baixa do fármaco utilizada ($1 \times \text{CIM} = 18,56 \mu\text{g/mL}$), entretanto, em concentrações superiores esse efeito não foi observado. A diminuição do número de hemócitos está relacionada a efeitos tóxicos e imunodepressão, por outro lado o aumento no número de hemócitos está relacionada à estimulação do sistema imune (Ribeiro et al., 2017; Rossoni et al., 2018).

O tratamento com cloridrato de duloxetine isolado e em combinações sinérgicas, não aumentou a sobrevivência das larvas infectadas com *C. neoformans*. Dados similares em relação à eficácia dos ISRS foram descritos por Pereira et al. (2019) onde foram avaliados os fármacos cloridrato de fluoxetine e cloridrato de paroxetine, que apesar de apresentarem atividade *in vitro* frente a *C. neoformans*, não foi possível detectar a eficácia desses compostos em *G. mellonella*. Pode-se explicar isso pela alta lipossolubilidade do cloridrato de duloxetine, assim como outros fármacos da classe dos inibidores seletivos de serotonina (cloridrato de fluoxetine e cloridrato de paroxetine) onde o tecido adiposo armazena esses compostos e elimina os mesmos lentamente (Sun et al., 2015). Palanco et al. (2017), demonstrou que o composto 3'-hidroxiquina apresentou atividade fungicida contra *Cryptococcus gattii* nas formas planctônicas e de biofilme, porém em *G. mellonella*, o composto não apresentou atividade antifúngica e sim toxicidade para as larvas. Sendo assim, pressupomos, portanto, que a baixa solubilidade do composto dificulta a sua distribuição no corpo do invertebrado, e o tecido adiposo das larvas pode armazenar os fármacos e eliminá-los lentamente na hemolinfa o qual não foi suficiente para matar as leveduras antes que as mesmas ocasionassem a morte das larvas.

Assim, esse estudo demonstra o cloridrato de duloxetine apresenta atividade antifúngica frente a *C. neoformans* e também atividade antifúngica sinérgica com fluconazol. Além disso, foi verificado que o cloridrato de duloxetine e as

combinações desse fármaco com fluconazol possuem potente efeito na redução da cápsula de *C. neoformans*, bem como na liberação de GXM.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos nesse estudo é possível concluir:

- a) o composto cloridrato de duloxetina foi ativo frente a *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 apresentando valor da CIM e CFM de 18,5 µg/mL;
- b) cloridrato de duloxetina apresentou atividade antifúngica sinérgica com fluconazol, resultando em 12 concentrações sinérgicas reduzindo o valor de CIM em 4 a 16 vezes para CD e 4 vezes para FLZ;
- c) cloridrato de duloxetina também foi capaz de causar diminuição na cápsula de *Cryptococcus neoformans* H99, de 12,5% a 67%, tanto no tratamento com concentração sub-inibitória, como nos tratamentos em combinação com o FLZ. Além disso, quanto maior a concentração de cloridrato de duloxetina utilizado no tratamento combinado, maior é a liberação de GXM;
- d) Em relação aos modelos *in vivo*, *Galleria mellonella* e *Caenorhabditis elegans*, o fármaco não apresentou toxicidade nas concentrações testadas, demonstrando sobrevivência de 100%
- e) o tratamento de *G. mellonella* na concentração mais baixa (CD 18,56 µg/mL) avaliada causou diminuição na concentração de hemócitos quando comparada ao grupo controle, entretanto, em concentrações superiores não foram observados efeitos.
- f) o tratamento com CD não aumentou a sobrevivência das larvas de *G. mellonella*, o que pode estar relacionado com a lipossolubilidade dos compostos.

REFERÊNCIAS*

Aguiar PA, Pedroso RD, Borges AS, Moreira TD, Araújo LB, Röder DV. The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 2017 Apr 13; 59:e13. doi: 10.1590/s1678-9946201759013. PubMed PMID: 28423088.

Alim D, Sircaik S, Panwar SL. The Significance of Lipids to Biofilm Formation in *Candida albicans*: An Emerging Perspective. J Fungi. 2018 Dec;4(4):140. doi: 10.3390/jof4040140. PubMed PMID: 30567300.

Alspaugh JA. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. Fungal Genet Biol. 2015 May;78:55-8. doi: 10.1016/j.fgb.2014.09.004. PubMed PMID: 25256589.

Ames L, Duxbury S, Pawlowska B, Ho HL, Haynes K, Bates S. *Galleria mellonella* as a host model to study *Candida glabrata* virulence and antifungal efficacy. Virulence. 2017 Nov 17;8(8):1909-1917. doi: 10.1080/21505594.2017.1347744. PubMed PMID: 28658597.

Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea J. Comparison of EUCAST and CLSI Reference Microdilution MICs of Eight Antifungal Compounds for *Candida auris* and Associated Tentative Epidemiological Cutoff Values. Antimicrob Agents Chemother. 2017 May 24;61(6):e00485-17. doi: 10.1128/AAC.00485-17. Print 2017 Jun. PMID: 28416539.

Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. Nat Rev Drug Discov. 2004 Aug;3(8):673-83. doi: 10.1038/nrd1468. PubMed PMID: 15286734.

Azevedo RVDM, Rizzo J, Rodrigues ML. Virulence Factors as Targets for Anticryptococcal Therapy. J Fungi (Basel). 2016 Nov 30;2(4):29. doi: 10.3390/jof2040029. PubMed PMID: 29376946.

Benaducci T, Sardi JdeC, Lourencetti NM, Scorzoni L, Gullo FP, Rossi SA, et al. Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms in vitro and in vivo using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. Front Microbiol. 2016 Mar 9;7:290. doi: 10.3389/fmicb.2016.00290. eCollection 2016. PubMed PMID: 27014214.

Bismuth H, Aussel L, Ezraty B. The greater wax moth, *Galleria mellonella* to study host-pathogen interactions. Med Sci (Paris). 2019 Apr;35(4):346-351. doi: 10.1051/medsci/2019071. Epub 2019 Apr 30. PubMed PMID: 31038112.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bongomin F, Oladele RO, Gago S, Moore CB, Richardson MD. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. *Mycoses*. 2018 May;61(5):290-297. doi: 10.1111/myc.12747. Epub 2018 Feb 14. PubMed PMID: 29377368.

Brilhante RSN, Gotay WJP, Pereira VS, de Oliveira JS, Pereira-Neto WA, Castelo-Branco DSCM, et al. Antifungal activity of promethazine and chlorpromazine against planktonic cells and biofilms of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* complex species. *Med Mycol*. 2020 Feb 3:myz140. doi: 10.1093/mmy/myz140. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 32016364.

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

Butts A, Reitler P, Nishimoto AT, DeJarnette C, Estredge LR, Peters TL, et al. A Systematic Screen Reveals a Diverse Collection of Medications That Induce Antifungal Resistance in *Candida* Species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Apr 25;63(5):e00054-19. doi: 10.1128/AAC.00054-19. Print 2019 May. PubMed PMID: 30858206.

Casadevall A, Mukherjee J, Scharff MD. Monoclonal antibody based ELISAs for cryptococcal polysaccharide. *J Immunol Methods*. 1992 Sep 18;154(1):27-35. doi: 10.1016/0022-1759(92)90209-c. PubMed PMID: 1401941.

Coleman JJ, Komura T, Munro J, Wu MP, Busanelli RR, Koehler AN, et al. Activity of caffeic acid phenethyl ester in *Caenorhabditis elegans*. *Future Med Chem*. 2016 Nov;8(17):2033-2046. doi: 10.4155/fmc-2016-0085. Epub 2016 Oct 14. PubMed PMID: 27739327.

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

Damasceno-Escoura AH, de Souza ML, de Oliveira Nunes F, Pardi TC, Gazotto FC, Florentino DH, et al. Epidemiological, Clinical and Outcome Aspects of Patients with Cryptococcosis Caused by *Cryptococcus gattii* from a Non-endemic Area of Brazil. *Mycopathologia*. 2019 Feb;184(1):65-71. doi: 10.1007/s11046-018-0304-3. Epub 2018 Nov 10. PubMed PMID: 30415450.

Davies AG, Blackwell GG, Raabe RC, Bettinger JC. An Assay for Measuring the Effects of Ethanol on the Locomotion Speed of *Caenorhabditis elegans*. *J Vis Exp*. 2015 Apr 9;(98):52681. doi: 10.3791/52681. PubMed PMID: 25938273.

De Castro Spadari C, da Silva de Bastiani FWM, Pisani PBB, de Azevedo Melo AS, Ishida K. Efficacy of voriconazole in vitro and in invertebrate model of cryptococcosis. *Arch Microbiol*. 2020 May;202(4):773-784. doi: 10.1007/s00203-019-01789-8. Epub 2019 Dec 12. PubMed PMID: 31832690.

Dubot-Pérès A, Mayxay M, Phetsouvanh R, Lee SJ, Rattanaovong S, Vongsouvath M, et al. Management of Central Nervous System Infections, Vientiane, Laos, 2003-2011. *Emerg Infect Dis*. 2019 May;25(5):898-910. doi: 10.3201/eid2505.180914. PubMed PMID: 31002063.

Elsegeiny W, Marr KA, Williamson PR. Immunology of Cryptococcal Infections: Developing a Rational Approach to Patient Therapy. *Front Immunol*. 2018 Apr 4;9:651. doi: 10.3389/fimmu.2018.00651. eCollection 2018. PubMed PMID: 29670625.

Ewbank JJ, Zugasti O. *C. elegans*: model host and tool for antimicrobial drug discovery. *Dis Model Mech*. 2011 May;4(3):300-4. doi: 10.1242/dmm.006684. Epub 2011 Apr 18. PubMed PMID: 21504910.

Ferroni L, Gardin C, Bellin G, Vindigni V, Pavan C, Zavan B. Effects of novel antidepressant drugs on mesenchymal stem cell physiology. *Biomed Pharmacother*. 2019 Jun;114:108853. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108853. Epub 2019 Apr 12. PubMed PMID: 30986624.

Gowri M, Jayashree B, Jeyakanthan J, Girija EK. Sertraline as a promising antifungal agent: inhibition of growth and biofilm of *Candida auris* with special focus on the mechanism of action in vitro. *J Appl Microbiol*. 2020 Feb;128(2):426-437. doi: 10.1111/jam.14490. Epub 2019 Nov 13. PubMed PMID: 31621139.

Grossman NT, Casadevall A. Physiological Differences in *Cryptococcus neoformans* Strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Feb 23;61(3):e02108-16. doi: 10.1128/AAC.02108-16. Print 2017 Mar. PubMed PMID: 28031206.

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

Guess T, Lai H, Smith SE, Sircy L, Cunningham K, Nelson DE, et al. Size Matters: Measurement of Capsule Diameter in *Cryptococcus neoformans*. *J Vis Exp*. 2018 Feb 27;(132):57171. doi: 10.3791/57171. PubMed PMID: 29553511.

Huang X, Li D, Xi L, Mylonakis E. *Caenorhabditis elegans*: a simple nematode infection model for *Penicillium marneffe*. *PLoS One*. 2014 Sep 30;9(9):e108764. doi: 10.1371/journal.pone.0108764. eCollection 2014. PubMed PMID: 25268236.

Jarvis JN, Harrison TS. HIV-associated cryptococcal meningitis. *AIDS*. 2007 Oct 18;21(16):2119-29. doi: 10.1097/QAD.0b013e3282a4a64d. PubMed PMID: 18090038.

Jemel S, Guillot J, Kallel K, Botterel F, Dannaoui E. *Galleria mellonella* for the Evaluation of Antifungal Efficacy against Medically Important Fungi, a Narrative Review. *Microorganisms*. 2020 Mar 11;8(3):390. doi: 10.3390/microorganisms8030390. PubMed PMID: 32168839.

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. eCollection 2017. PubMed PMID: 28400768.

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

Kathiresu R, Zinat SN, Fernando M. Immune reconstitution inflammatory syndrome following. *IDCases*. 2020 Jan 9;19:e00699. doi: 10.1016/j.idcr.2020.e00699. eCollection 2020. PubMed PMID: 32055440.

Kavanagh K, Sheehan G. The Use of *Galleria mellonella* Larvae to Identify Novel Antimicrobial Agents against Fungal Species of Medical Interest. *J Fungi (Basel)*. 2018 Sep 19;4(3):113. doi: 10.3390/jof4030113. PubMed PMID: 30235800.

Kurz CL, Ewbank JJ. *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol*. 2000 Mar;8(3):142-4. doi: 10.1016/s0966-842x(99)01691-1. PubMed PMID: 10707068.

Lass-Flörl C, Dierich MP, Fuchs D, Semenitz E, Jenewein I, Ledochowski M. Antifungal properties of selective serotonin reuptake inhibitors against *Aspergillus* species in vitro. *J Antimicrob Chemother*. 2001 Dec;48(6):775-9. doi: 10.1093/jac/48.6.775. PubMed PMID: 11733460.

Lass-Flörl C, Ledochowski M, Fuchs D, Speth C, Kacani L, Dierich MP, et al. Interaction of sertraline with *Candida* species selectively attenuates fungal virulence in vitro. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003 Jan 21;35(1):11-5. doi: 10.1111/j.1574-695X.2003.tb00643.x. PubMed PMID: 12589952.

Lee SY, Kang K. Measuring the Effect of Chemicals on the Growth and Reproduction of *Caenorhabditis elegans*. *J Vis Exp*. 2017 Oct 5;(128):56437. doi: 10.3791/56437. PubMed PMID: 29053679.

Lin S, Chen R, Zhu S, Wang H, Wang L, Zou J, et al. Candidemia in Adults at a Tertiary Hospital in China: Clinical Characteristics, Species Distribution, Resistance,

and Outcomes. *Mycopathologia*. 2018 Aug;183(4):679-689. doi: 10.1007/s11046-018-0258-5. Epub 2018 Mar 23. PubMed PMID: 29572768.

Lockhart SR, Guarner J. Emerging and reemerging fungal infections. *Semin Diagn Pathol*. 2019 May;36(3):177-181. doi: 10.1053/j.semdp.2019.04.010. Epub 2019 Apr 17. PubMed PMID: 31010605.

Lunn MP, Hughes RA, Wiffen PJ. Duloxetine for treating painful neuropathy, chronic pain or fibromyalgia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Jan 3;(1):CD007115. doi: 10.1002/14651858.CD007115.pub3. PubMed PMID: 24385423.

Martinez LR, Casadevall A. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol Spectr*. 2015 Jun;3(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0006-2014. PubMed PMID: 26185073.

McFadden DC, De Jesus M, Casadevall A. The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. *J Biol Chem*. 2006 Jan 27;281(4):1868-75. doi: 10.1074/jbc.M509465200. Epub 2005 Nov 8. PubMed PMID: 16278213.

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. eCollection 2012. PubMed PMID: 23024638.

Mesa-Arango AC, Trevijano-Contador N, Román E, Sánchez-Fresneda R, Casas C, Herrero E, et al. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Nov;58(11):6627-38. doi: 10.1128/AAC.03570-14. Epub 2014 Aug 25. PubMed PMID: 25155595.

Mount HO, Revie NM, Todd RT, Anstett K, Collins C, Costanzo M, et al. Global analysis of genetic circuitry and adaptive mechanisms enabling resistance to the azole antifungal drugs. *PLoS Genet*. 2018 Apr 27;14(4):e1007319. doi: 10.1371/journal.pgen.1007319. eCollection 2018 Apr. PubMed PMID: 29702647.

Muhammed M, Coleman JJ, Mylonakis E. *Caenorhabditis elegans*: a nematode infection model for pathogenic fungi. *Methods Mol Biol*. 2012;845:447-54. doi: 10.1007/978-1-61779-539-8_31. PubMed PMID: 22328394.

Mylonakis E, Ausubel FM, Perfect JR, Heitman J, Calderwood SB. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15675-80. doi: 10.1073/pnas.232568599. Epub 2002 Nov 15. PubMed PMID: 12438649.

Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans*

pathogenesis. *Infect Immun*. 2005 Jul;73(7):3842-50. doi: 10.1128/IAI.73.7.3842-3850.2005. PubMed PMID: 15972469.

Nakamura S, Ikeda-Dantsuji Y, Jin L, Higashi Y, Abe M, Inukai T, et al. Macrolides inhibit capsule formation of highly virulent *Cryptococcus gattii* and promote innate immune susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 May 24;63(6):e02364-18. doi: 10.1128/AAC.02364-18. Print 2019 Jun. PubMed PMID: 30936099.

Nascimento E, Vitali LH, Kress MRVZ, Martinez R. *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* isolates from both HIV-infected and uninfected patients: antifungal susceptibility and outcome of cryptococcal disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2017;59:e49. doi: 10.1590/S1678-9946201759049. Epub 2017 Aug 3. PubMed PMID: 28793019.

Noguera MC, Escandón P, Arévalo M, García Y, Suárez LE, Castañeda E. Prevalence of cryptococcosis in Atlántico, department of Colombia assessed with an active epidemiological search. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019 Apr 25;52:e20180194. doi: 10.1590/0037-8682-0194-2018. PubMed PMID: 31038620.

Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Jul;52(1):1. doi: 10.1093/jac/dkg301. Epub 2003 Jun 12. PubMed PMID: 12805255.

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

Oliveira HC, Kuczera D, Souza TN, Marcos CM, Scorzoni L, Nimrichter L, et al. Fungal Infections of the Central Nervous System. Reference Module in Life Sciences. Elsevier; 2020. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.21019-4.

Ostrosky-Zeichner L, Sobel JD. Fungal Infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2016 Mar;30(1):xiii-xiv. doi: 10.1016/j.idc.2015.12.001. PubMed PMID: 26897069.

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

Pathak A, Pien FD, Carvalho L. Amphotericin B use in a community hospital, with special emphasis on side effects. *Clin Infect Dis*. 1998 Feb;26(2):334-8. doi: 10.1086/516321. PubMed PMID: 9502451.

Pereira TC, de Barros PP, Fugisaki LRO, Rossoni RD, Ribeiro FC, de Menezes RT, et al. Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. J Fungi (Basel). 2018 Nov 27;4(4):128. doi: 10.3390/jof4040128. PubMed PMID: 30486393.

Pereira TC. Efeito do cloridrato de verapamil, cloridrato de fluoxetina e paroxetina isolados e combinados com anfotericina B contra *Cryptococcus neoformans*: estudo *in vitro* e *in vivo*. São José dos Campos. Dissertação [Mestrado em Biopatologia Bucal] - Instituto de Ciência e Tecnologia - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita filho"; 2019.

Reuwsaat JCV, Motta H, Garcia AWA, Vasconcelos CB, Marques BM, Oliveira NK, et al. A Predicted Mannoprotein Participates in *Cryptococcus gattii* Capsular Structure. mSphere. 2018 Apr 25;3(2):e00023-18. doi: 10.1128/mSphere.00023-18. Print 2018 Apr 25. PubMed PMID: 29897877.

Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. Curr Opin Microbiol. 2018 Oct;45:70-76. doi: 10.1016/j.mib.2018.02.005. Epub 2018 Mar 13. PubMed PMID: 29547801.

Ribeiro FC, de Barros PP, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AO. *Lactobacillus rhamnosus* inhibits *Candida albicans* virulence factors in vitro and modulates immune system in *Galleria mellonella*. J Appl Microbiol. 2017 Jan;122(1):201-211. doi: 10.1111/jam.13324. Epub 2016 Nov 15. PubMed PMID: 27727499.

Rohilla R, Meena S, Kaistha N, Krishna Raj A, Gupta P. Disseminated cryptococcosis and hepatitis C virus infection: A fatal co-infection. Curr Med Mycol. 2019;5(4):50-53. doi: 10.18502/cmm.5.4.2163. PubMed PMID: 32104744.

Rojas FD, Córdoba SB, de Los Ángeles Sosa M, Zalazar LC, Fernández MS, Cattana ME, et al. Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* yeast: comparison of two different methodologies. Mycoses. 2017 Feb;60(2):104-111. doi: 10.1111/myc.12556. Epub 2016 Sep 14. PubMed PMID: 27625339.

Rossoni RD, Dos Santos Velloso M, Figueiredo LMA, Martins CP, Jorge AOC, Junqueira JC. Clinical strains of *Lactobacillus* reduce the filamentation of *Candida albicans* and protect *Galleria mellonella* against experimental candidiasis. Folia Microbiol (Praha). 2018 May;63(3):307-314. doi: 10.1007/s12223-017-0569-9. Epub 2017 Nov 23. PubMed PMID: 29170992.

Salehi M, Ghomi Z, Mirshahi R, Dehghan Manshadi SA, Rezahosseini O. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in a Referral Center in Tehran. Caspian J Intern Med. 2019 Winter;10(1):73-79. doi: 10.22088/cjim.10.1.73. PubMed PMID: 30858944.

Sangalli-Leite F, Scorzoni L, Mesa-Arango AC, Casas C, Herrero E, Gianinni MJ, et al. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. *Microbes Infect.* 2011 May;13(5):457-67. doi: 10.1016/j.micinf.2011.01.015. Epub 2011 Feb 21. PubMed PMID: 21310262.

Santolaya ME, Thompson L, Benadof D, Tapia C, Legarraga P, Cortés C, et al. A prospective, multi-center study of *Candida* bloodstream infections in Chile. Chilean Invasive Mycosis Network. *PLoS One.* 2019 Mar 8;14(3):e0212924. doi: 10.1371/journal.pone.0212924. eCollection 2019. PubMed PMID: 30849092.

Santos-Gandelman J, Rodrigues ML, Machado Silva A. Future perspectives for cryptococcosis treatment. *Expert Opin Ther Pat.* 2018 Aug;28(8):625-634. doi: 10.1080/13543776.2018.1503252. Epub 2018 Aug 7. PubMed PMID: 30084284.

Scorzoni L, de Lucas MP, Mesa-Arango AC, Fusco-Almeida AM, Lozano E, Cuenca-Estrella M, et al. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. *PLoS One.* 2013;8(3):e60047. doi: 10.1371/journal.pone.0060047. Epub 2013 Mar 28. PubMed PMID: 23555877.

Segal E, Frenkel M. Experimental in vivo Models of Candidiasis. *J Fungi (Basel).* 2018 Feb 6;4(1):21. doi: 10.3390/jof4010021. PubMed PMID: 29415485.

Silva VKA, May RC, Rodrigues ML. Pyrifenox, an ergosterol inhibitor, differentially affects *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol.* 2020 Jan 8;myz132. doi: 10.1093/mmy/myz132. Online ahead of print. PubMed PMID: 31915833.

Singkum P, Suwanmanee S, Pumeesat P, Luplertlop N. A powerful in vivo alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2019 Mar 1;66(1):31-55. doi: 10.1556/030.66.2019.001. Epub 2019 Feb 28. PubMed PMID: 30816806.

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

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

Squizani ED, Oliveira NK, Reuwsaat JCV, Marques BM, Lopes W, Gerber AL, et al. Cryptococcal dissemination to the central nervous system requires the vacuolar

calcium transporter Pmc1. *Cell Microbiol.* 2018 Feb;20(2). doi: 10.1111/cmi.12803. Epub 2017 Nov 23. PubMed PMID: 29113016.

Srikanta D, Santiago-Tirado FH, Doering TL. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. *Yeast.* 2014 Feb;31(2):47-60. doi: 10.1002/yea.2997. Epub 2014 Jan 19. PubMed PMID: 24375706.

Stan CD, Tuchiluş C, Stan CI. Echinocandins -- new antifungal agents. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2014 Apr-Jun;118(2):528-36. PubMed PMID: 25076727.

Stiernagle T. Maintenance of *Caenorhabditis elegans*. *African Scientist*, 16(2), 55-68.

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

Rossi SA, Trevijano-Contador N, Scorzoni L, Mesa-Arango AC, de Oliveira HC, Werther K, et al. Impact of resistance to fluconazole on virulence and morphological aspects of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates. *Front Microbiol.* 2016 Feb 16;7:153. doi: 10.3389/fmicb.2016.00153. eCollection 2016. PubMed PMID: 26909069.

Tampakakis E, Okoli I, Mylonakis, E. A *C. elegans*-based, whole animal, in vivo screen for the identification of antifungal compounds. *Nat Protoc.* 2008;3(12):1925-31. doi: 10.1038/nprot.2008.193. PubMed PMID: 19180076.

Tremaine LM, Welch WM, Ronfeld RA. Metabolism and disposition of the 5-hydroxytryptamine uptake blocker sertraline in the rat and dog. *Drug Metab Dispos.* 1989 Sep-Oct;17(5):542-50. PubMed PMID: 2573498.

Treviño-Rangel Rde 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 Mar;54(3):280-6. doi: 10.1093/mmy/myv109. Epub 2015 Dec 24. PubMed PMID: 26705833.

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

Tverdek FP, Kofteridis D, Kontoyiannis DP. Antifungal agents and liver toxicity: a complex interaction. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2016 Aug;14(8):765-76. doi: 10.1080/14787210.2016.1199272. Epub 2016 Jun 23. PubMed PMID: 27275514.

Vij R, Cordero RJB, Casadevall A. The Buoyancy of *Cryptococcus neoformans* Is Affected by Capsule Size. *mSphere*. 2018 Nov 7;3(6):e00534-18. doi: 10.1128/mSphere.00534-18. PubMed PMID: 30404928.

Vitale RG, Pascucci V, Afeltra J. Influence of capsule size on the in vitro activity of antifungal agents against clinical *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strains. *J Med Microbiol*. 2012 Mar;61(Pt 3):384-388. doi: 10.1099/jmm.0.036152-0. Epub 2011 Nov 10. PubMed PMID: 22074850.

Wagley S, Borne R, Harrison J, Baker-Austin C, Ottaviani D, Leoni F, et al. *Galleria mellonella* as an infection model to investigate virulence of *Vibrio parahaemolyticus*. *Virulence*. 2018 Jan 1;9(1):197-207. doi: 10.1080/21505594.2017.1384895. Epub 2017 Nov 27. PubMed PMID: 28960137.

White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Aug;40(8):1914-8. doi: 10.1128/AAC.40.8.1914. PubMed PMID: 8843303.

Xue H, Li J, Xie H, Wang Y. Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. *Int J Biol Sci*. 2018 Jul 13;14(10):1232-1244. doi: 10.7150/ijbs.24612. eCollection 2018. PubMed PMID: 30123072.

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

Zaragoza O, Casadevall A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol Proced Online*. 2004;6:10-15. doi: 10.1251/bpo68. Epub 2004 Mar 3. PubMed PMID: 15103395.

Zaragoza O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. *Virulence*. 2019 Dec;10(1):490-501. doi: 10.1080/21505594.2019.1614383. PubMed PMID: 31119976.

Zavala S, Baddley JW. Cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2020 Feb;41(1):69-79. doi: 10.1055/s-0039-3400280. Epub 2020 Jan 30. PubMed PMID: 32000285.

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

Zhao HZ, Wang RY, Wang X, Jiang YK, Zhou LH, Cheng JH, et al. High dose fluconazole in salvage therapy for HIV-uninfected cryptococcal meningitis. *BMC*

infect Dis. 2018 Dec 12;18(1):643. doi: 10.1186/s12879-018-3460-7. PubMed
PMID: 30541454.