



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

AMANDA RODRIGUES REHEM

**REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS PARA CRYPTOCOCOSE: avaliação
experimental do cloridrato de duloxetina em *CRYPTOCOCCUS*
NEOFORMANS e *CRYPTOCOCCUS GATTII***

2023

AMANDA RODRIGUES REHEM

**REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS PARA CRYPTOCOCCOSE: avaliação
experimental do cloridrato de duloxetine em *CRYPTOCOCCUS*
NEOFORMANS e *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).

Rehem, Amanda Rodrigues

Reposicionamento de fármacos para cryptococose: avaliação experimental do cloridrato de duloxetina em *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* / Amanda Rodrigues Rehem. – São José dos Campos : [s.n.], 2023.
92 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.

Orientador: Liliana Scorzoni.

1. *Cryptococcus* spp. 2. Biofilme. 3. Antifúngicos. 4. Ergosterol. 5. Antidepressivos. I. Scorzoni, Liliana, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' – Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Liliana Scorzoni (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Haroldo Cesar de Oliveira

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Instituto Carlos Chagas

Campus de Curitiba, Paraná

São José dos Campos, 07 de fevereiro de 2023.

DEDICATÓRIA

Dedico este projeto a Deus que sempre foi meu apoio em todos os momentos, planos e sonhos da minha vida, por ser a fortaleza e a luz que ilumina meus caminhos.

Ao meu esposo e filha, Felipe Brandão e Clara Rehem Brandão, por serem meu suporte, por estarem sempre presente e me apoiarem em todas as lutas que decido travar, por acreditarem em meus sonhos e entenderem que não há vitórias sem renúncias.

À minha família, que está comigo em todos os momentos e etapas da minha vida apesar da distância. Obrigada por apoiar minhas decisões, por sempre acreditar em mim e aplaudir todas as minhas conquistas: Carmem Rehem; Cácia Rehem; Castália Rehem; Pierre Cesar, Gabriel Cesar, Luca Cesar, Katia Sousa, Júlio Sousa, Rodrigo Bonfim, Marcos Rehem, Alexandre Rehem e Marcelo Rehem.

Por fim, aos amigos de toda vida, aos meus mestres de outrora, e meus colegas de graduação e profissão que participaram direta e indiretamente no meu crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Lilitana Scorzoni, pela orientação, sempre muito paciente, acolhedora, dedicada e atenciosa. Uma verdadeira inspiração.

À Professora Adjunta Juliana Campos Junqueira, pela oportunidade e compartilhamento do seu conhecimento no laboratório de microbiologia e nas aulas da graduação e da pós-graduação, e especialmente por fazer parte da minha banca.

À Professora Adjunta Luciane Dias de Oliveira, por ser sempre colaborativa e pela alegria contagiante que proporciona bons momentos de descontração e leveza.

Ao Prof. Dr. Haroldo César de Oliveira que trouxe importantes colaborações técnicas que foi essencial para realização desse projeto e especialmente por fazer parte da minha banca.

Aos meus amigos, Maíra Terra Garcia e Paulo Henrique Fonseca do Carmo que estiveram ao meu lado, compartilhando conhecimentos, experiências, preocupações e proporcionando inúmeros momentos felizes.

A toda equipe do laboratório de Microbiologia e Imunologia Bucal. Especialmente aos amigos que dividiram comigo a rotina extenuante do laboratório, tornando-a prazerosa e gratificante, Gabriela, Lívia, Evelyn, Juliana e Letícia. Vocês foram essenciais para realização desse projeto e os meus dias foram melhores com vocês.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal e a todos os membros da equipe da Seção Técnica de Pós-graduação por todo suporte.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP pela oportunidade e por me proporcionar a realização de um sonho e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

"A persistência é o menor caminho do êxito". (Charles Chaplin)

RESUMO

Rehem AR. Reposicionamento de fármacos para cryptococose: avaliação experimental do cloridrato de duloxetine em *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2023.

Infecções fúngicas como as causadas por *Cryptococcus* spp. são de alta mortalidade e morbidade. O reposicionamento de fármaco, ou seja, a utilização de compostos para finalidade diferente da qual esse foi desenvolvido, pode ser uma alternativa para identificar fármacos mais eficazes. Assim, este estudo tem como propósito avaliar a atividade antifúngica, *in vitro* e *in vivo*, do fármaco cloridrato de duloxetine (CD), antidepressivo pertencente a classe dos Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina e Norepinefrina frente a cepas padrões e clínicas de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. Foi utilizada a técnica de microdiluição de acordo com o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) para determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC), e a técnica do “tabuleiro de xadrez” para avaliar o efeito sinérgico de anfotericina B (AmB) em associação com CD. Além disso, foi avaliado o efeito de CD na quantidade do ergosterol. O efeito do CD também foi avaliado em biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii*, analisando a biomassa por cristal violeta, a viabilidade celular por XTT e morfologia através das imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). *In vivo*, a eficácia de CD foi avaliada por curvas de sobrevivência no modelo invertebrado *Galleria mellonella*. CD foi ativo frente a todas as cepas clínicas e padrões de *C. neoformans* e *C. gattii*, apresentando valores de CIM e CFM na faixa de 15,62 – 62,5 µg/mL. A combinação de CD com AmB apresentou uma combinação sinérgica, reduzindo o valor da CIM em 4 vezes tanto para CD quanto para AmB. CD não produziu redução na quantidade de ergosterol presente na membrana de *C. gattii* ATCC e *C. neoformans* ATCC. Em biofilmes, foi observada a redução da biomassa do biofilme em até 82,16% e redução de 99,6% na viabilidade celular de *C. gattii*. Em biofilmes de *C. neoformans* a redução foi de 81,13% e 99,5% respectivamente para a análise de biomassa e viabilidade. As imagens de MEV corroboraram com os achados dos ensaios realizados para análise do efeito de CD em biofilmes. Em *G. mellonella* aumentou a sobrevivência da larva quando utilizado na concentração de 3,125 mg/larva. Assim, os ensaios validaram a hipótese de que o cloridrato de duloxetine tem ação antifúngica e antibiofilme *in vitro* frente a cepas clínicas e cepas padrões de *C. neoformans* e *C. gattii*.

Palavras-chave: *Cryptococcus* spp.; biofilme; antifúngicos; ergosterol; antidepressivos; reposicionamento de fármacos; *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

Rehem AR. Repositioning of drugs for cryptococcosis: experimental evaluation of duloxetine hydrochloride in Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2023.

Fungal infections such as those caused by Cryptococcus spp. are of high mortality and morbidity. Drug repositioning, that is, the use of compounds for a purpose different from the one for which it was developed, can be an alternative to identify more effective drugs. Thus, this study aims to evaluate the antifungal activity, in vitro and in vivo, of the drug duloxetine hydrochloride (CD), an antidepressant belonging to the class of Selective Serotonin and Norepinephrine Reuptake Inhibitors against standard and clinical strains of Cryptococcus neoformans and C. gattii. The microdilution technique according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), and the “chessboard” technique was used to evaluate the synergistic effect of amphotericin B (AmB) on association with CD. In addition, the effect of CD on the amount of ergosterol was evaluated. The effect of CD was also evaluated in C. neoformans and C. gattii biofilms, analyzing the biomass by crystal violet, cell viability by XTT and morphology through Scanning Electron Microscopy (SEM) images. In vivo, the effectiveness of CD was evaluated by survival curves in the Galleria mellonella invertebrate model. CD was active against all clinical strains and patterns of C. neoformans and C. gattii, with MIC and CFM values in the range of 15.62 – 62.5 µg/mL. The combination of CD with AmB showed a synergistic combination, reducing the MIC value by 4 times for both CD and AmB. CD did not produce a reduction in the amount of ergosterol present in the membrane of C. gattii ATCC and C. neoformans ATCC. In biofilms, a reduction in biofilm biomass of up to 82.16% and a 99.6% reduction in cell viability of C. gattii were observed. In C. neoformans biofilms the reduction was 81.13% and 99.5% respectively for biomass and viability analysis. The SEM images corroborated the findings of the tests carried out to analyze the effect of CD on biofilms. In G. mellonella, larval survival increased when used at a concentration of 3.125 mg/larvae. Thus, the tests validated the hypothesis that duloxetine hydrochloride has antifungal and antibiofilm action in vitro against clinical strains and standard strains of C. neoformans and C. gattii.

Keywords: Cryptococcus spp.; biofilm; antifungals; ergosterol; antidepressants; drug repositioning; Galleria mellonella.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Infecções fúngicas e <i>Cryptococcus</i> spp.....	15
2.2 Terapia convencional para criptococose e mecanismos de resistência de <i>Cryptococcus</i> spp. aos fármacos antifúngicos.....	22
2.3 Reposicionamento de fármaco como uma nova abordagem terapêutica....	29
3 PROPOSIÇÃO.....	35
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Microrganismos e condições de cultivo.....	37
4.2 Compostos e antifúngicos.....	37
4.3 Avaliação da sensibilidade e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	38
4.4 Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	40
4.5 Ensaio de quantificação de ergosterol.....	40
4.6 Avaliação da atividade sinérgica do cloridrato de duloxetina com a anfotericina B	41
4.7 Atividade antifúngica do cloridrato de duloxetina em biofilme de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	44
4.8 Avaliação do efeito do tratamento na biomassa do biofilme por cristal violeta	45
4.9 Avaliação da viabilidade celular por XTT	45

4.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	46
4.11 Atividade antifúngica <i>in vivo</i> em modelo experimental <i>Galleria mellonella</i>	46
4.12 Ensaio de sobrevivência	47
4.13 Efeito antifúngico do cloridrato de duloxetina em <i>Galleria mellonella</i>	47
4.14 Análise estatística	48
5 RESULTADOS	49
5.1 Avaliação do fármaco cloridrato de duloxetina <i>in vitro</i>	49
5.1.1 Determinação da CIM e CFM do cloridrato de duloxetina.....	49
5.1.2 Ensaio de quantificação de ergosterol.....	50
5.1.3 Avaliação do efeito sinérgico do cloridrato de duloxetina em associação ao antifúngico anfotericina B <i>in vitro</i> pela técnica do tabuleiro de xadrez.	52
5.1.4 Avaliação da ação isolada do cloridrato de duloxetina em biofilme de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	53
5.1.5 Quantificação do efeito do cloridrato de duloxetina na atividade metabólica do biofilme de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	52
5.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	58
5.2 Avaliação do cloridrato de duloxetina <i>in vivo</i>	59
5.2.1 Avaliação da ação antifúngica do cloridrato de duloxetina em modelo experimental <i>Galleria mellonella</i>	59
6 DISCUSSÃO.....	61
7 CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas acometem aproximadamente 300 milhões de pessoas pelo mundo, podendo levar ao óbito mais de 1,5 milhão de pacientes anualmente, configurando um grave problema de saúde pública (Bongomin et al., 2017; Deaguero et al., 2020).

As infecções fúngicas debilitam principalmente pacientes que possuem déficit na resposta imunológica, como aqueles que vivem com a síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) até pacientes submetidos a tratamentos oncológicos ou internados por períodos prolongados em Unidades de Terapia Intensiva (Roemer, Krysan, 2014; Baker et al., 2022).

O gênero *Cryptococcus* spp. está entre os patógenos fúngicos mais relevantes da prática clínica. A meningite criptocócica apresenta uma taxa de mortalidade que pode chegar a mais de 90% e o sucesso da terapêutica implementada depende de fatores como celeridade do diagnóstico, doenças subjacentes, resposta imunológica do hospedeiro e o regime farmacológico empregado (Lin et al., 2022; Rathore et al., 2022).

A grande maioria dos casos de infecções fúngicas causadas pelo gênero *Cryptococcus* spp., cerca de 95%, está correlacionado a infecções por *Cryptococcus neoformans*, que possui distribuição global, sendo mais frequentes em pacientes com comprometimento das defesas do organismo (Holcomb et al., 2022; Lizarazo, Castañeda, 2022).

Porém, em algumas regiões, como áreas tropicais e subtropicais, é mais comum casos de infecções por *C. gattii*, responsável por cerca de 5% dos casos de infecções por *Cryptococcus* spp., e está associado a pacientes imunocompetentes, ou seja, pacientes com uma resposta imunológica adequada (Holcomb et al., 2022; Lizarazo, Castañeda, 2022).

Tanto as infecções por *C. gattii* quanto *C. neoformans* podem infectar qualquer tecido ou órgão, no entanto, de forma geral, o patógeno infecta primariamente o sistema pulmonar, podendo levar, com o desenvolvimento da doença, ao comprometimento do sistema nervoso central (Chastain et al., 2022; Wang D et al., 2022).

O paciente pode apresentar febre, cefaléia, sonolência, fadiga, vômitos, confusão, convulsão, distúrbios visuais, dispnéia (dificuldade respiratória), pneumonia, insuficiência respiratória, dentre outras manifestações clínicas (Chastain et al., 2022; Wang D et al., 2022).

As características das infecções fúngicas por *Cryptococcus* spp. trazem enormes desafios para o sucesso da terapia, uma vez que, o microrganismo possui fatores de virulência que o permite infectar e sobreviver no organismo hospedeiro, e, além disso, ao longo dos anos desenvolveram resistência frente aos fármacos utilizados (Gerstein et al., 2019; Firacative et al., 2021).

Existem poucas opções de fármacos antifúngicos disponíveis atualmente para o tratamento de infecções fúngicas: polienos, flucitosina, azólicos. E essas drogas enfrentam ainda problemas relacionados ao elevado custo, baixa biodisponibilidade em alguns tecidos e relatos de toxicidade (Kane, Carter, 2022).

Dessa forma, se torna evidente a necessidade de desenvolvimento de antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos ou outras alternativas terapêuticas efetivas contra as infecções por *Cryptococcus* spp. Nesse contexto, a realização de pesquisas envolvendo o reposicionamento de fármacos têm sido estratégia considerada para o enfrentamento dessa situação (Butts, Krysan, 2012; Spadari et al., 2020).

O reaproveitamento de fármacos consiste na investigação de atividade antifúngica em medicamentos já utilizados, com eficácia comprovada e uso aprovado para determinadas doenças específicas. Assim sendo, é feito o rastreamento de uma provável ação de seu princípio ativo contra patógenos

fúngicos, já tendo sido descritos resultados promissores com alguns antidepressivos, anti-inflamatórios, anti-helmínticos, antibacterianos, dentre outras classes de fármacos (Butts, Krysan, 2012; Zhang et al., 2021).

Fármacos antipsicóticos da classe dos inibidores seletivos de recaptação da serotonina, tais como a sertralina, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina têm apresentado resultados convincentes de seu potencial antifúngico (Barbarossa et al., 2022).

Dessa forma, esse estudo objetivou avaliar a atividade antifúngica do fármaco cloridrato de duloxetina, antidepressivo pertencente a classe dos Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina e Norepinefrina, que possui mecanismo de ação semelhante aos inibidores seletivos de recaptação da serotonina, bem como sua ação associada ao antifúngico anfotericina B. Os experimentos foram realizados *in vitro* e *in vivo* utilizando o modelo alternativo de infecção experimental *Galleria mellonella*.

As formas graves das infecções fúngicas por *Cryptococcus* spp. são resultantes da capacidade desse fungo se disseminar hematogenicamente causando uma infecção sistêmica com envolvimento do sistema nervoso central. Por conseguinte, o cloridrato de duloxetina apresenta facilidade em atravessar a barreira hematoencefálica e, portanto, pode ser uma alternativa eficaz na tentativa de eliminar a infecção cerebral (Botts, Hull, 2010; Zhai et al., 2012; Peyclit et al., 2021; Ngan et al., 2022; Salem et al., 2022).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções fúngicas e *Cryptococcus* spp

As infecções fúngicas vêm se tornando um grande problema de saúde pública, estimativas sugerem que bilhões de pessoas são acometidas anualmente e que os principais patógenos envolvidos são *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* e *Pneumocystis jirovecii* (Revie et al., 2018; Heung, 2020).

São responsáveis por manifestações superficiais em unhas, pele, cabelos, mucosas, e podem levar a quadros graves de infecções invasivas sistêmicas, resultando em altas taxas de mortalidade, com mais de 1,7 milhão de mortes relacionadas a estes tipos de infecções (Bongomin, 2017; Burgess et al., 2022).

As infecções fúngicas, portanto, tem se caracterizado como um importante causa de morbidade e mortalidade, afetando todos os continentes, extrato social e faixa etária (Pfaller, 1998; Pfaller et al., 2006).

Os fungos estão presentes no meio ambiente, convivem conosco diariamente e são encontrados de maneira dispersa no solo, animais, água, ar, plantas, vegetais e no homem. Os fungos desempenham grandes papéis, são decompositores e podem estar envolvidos na produção de alimentos e de medicamentos, todavia, algumas espécies podem desencadear doenças nos seres humanos (Venturella, Rambelli, 1995; Riquelme et al., 2018).

São organismos eucarióticos, ou seja, possuem um núcleo que contém material genético envolto por uma membrana nuclear, e podem ser denominados: leveduras, organismos majoritariamente unicelulares; e bolores, fungos filamentosos

multicelulares. Ambos podem apresentar reprodução sexuada e assexuada (Venturella, Rambelli, 1995; Zaitz et al., 2010).

Os fungos apresentam duas características morfológicas de suma importância médica, sua parede celular contém quitina que lhe confere rigidez, contribuindo para a resistência e integridade da estrutura da parede celular do fungo e consequentemente para sua sobrevivência, e sua membrana celular contém esteróis na forma de ergosterol (Spitzer et al., 2017; Hasim, Coleman, 2019).

O ergosterol é uma molécula ausente em células humanas, constituindo-se como importante alvo da terapêutica antifúngica, no entanto, semelhanças estruturais entre o ergosterol e colesterol (presente na membrana plasmática dos humanos) podem causar sérios problemas de toxicidade decorrentes das terapias implementadas (Onyewu et al., 2003; Spitzer et al., 2017; Hasim, Coleman, 2019; Cui et al., 2022).

As infecções mais graves geralmente se desenvolvem em pessoas com vários graus de imunocomprometimento e/ou que apresentam doenças subjacentes importantes, como pacientes diagnosticados com câncer, diabetes, desnutrição, HIV positivo, lúpus sistêmicos, pacientes submetidos a quimioterapia, em uso prolongado e altas concentrações de corticóides, uso de antibiótico de amplo espectro, dentre outros (Pfaller, Diekema, 2004; Binder, Lass-flörl, 2011; Badiee, Hashemizadeh, 2014; Heung, 2020; Burgess et al., 2022).

Dentre os quadros clínicos de micoses sistêmicas graves causadas por agentes fúngicos, as infecções por *Cryptococcus* spp. têm mostrado elevada incidência e impacto global (Idnurm, Lin, 2015). O patógeno tem distribuição mundial, estima-se a ocorrência dessa infecção em mais de um milhão de pessoas anualmente e uma taxa de mortalidade que pode chegar a 70% (Lu Y et al., 2022).

Esse agente está presente nos mais diversos nichos ecológicos e são inúmeras suas fontes ambientais, que vão desde solos contaminados com dejetos de aves,

madeiras de árvores em decomposição, até frutos e vegetais (Buchanan, Murphy, 1998; Bose et al., 2003; Zaitz et al., 2010).

Associado a esse quadro descrito, fatores de virulência e mecanismos de resistência colocam esse patógeno no rol dos microrganismos mais importantes da micologia médica (Lu CW et al., 2022).

O Gênero *Cryptococcus* spp. apresenta várias espécies descritas, porém as espécies mais comumente relacionadas a infecções em humanos são o *Cryptococcus gattii* e o *Cryptococcus neoformans* (Iyer et al., 2021). Essas espécies e suas variações apresentam diferenças quanto às suas características biológicas, epidemiológicas, bioquímicas, genéticas, imunogênicas e ecológicas (Boekhout et al., 1997; Campbell et al., 2005; Kwon-Chung, Varma, 2006; Chen SC et al., 2014; Chen YC et al., 2022).

Cryptococcus spp. é um fungo da classe Blastomycetes e família Cryptococcaceae. A espécie *C. neoformans* possui forma de leveduras arredondadas/ovais, podendo a espécie *C. gattii* apresentar-se também sob formas globosas e oblongas a elípticas, com tamanhos aproximados de 5 a 10 µm de diâmetro. Podem formar brotamentos, reproduzindo-se de forma assexuada, ou podem reproduzir-se de forma sexuada com produção de basidiósporos (Okagaki et al., 2010; Byrnes et al., 2011; Kwon-chung et al., 2014).

Cryptococcus spp., em forma de leveduras secas com aproximadamente 1–5 µm de tamanho ou basidiósporos que apresentam 1–2 µm, ambos com capacidade infecciosa, podem ser inalados e absorvidos durante o processo da respiração, depositando-se em regiões profundas do trato respiratório e posteriormente se disseminando hematogenicamente para várias partes do organismo, apresentando tropismo pelo Sistema Nervoso Central (Garcia-Hermoso et al., 1999; Cox et al., 2001; Botts, Hull, 2010).

A ocorrência de *C. gattii* têm sido identificadas de forma mais frequente em pacientes imunocompetentes, enquanto *C. neoformans* e suas variações têm maior

frequência relatada em indivíduos imunodeprimidos, sendo classificado como patógeno oportunista e altamente incidente em pacientes soropositivos para HIV em estágios que caracterizam a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida — AIDS (Nielsen et al., 2005; Srikanta et al., 2014; Holcomb et al., 2022).

Em pacientes imunocompetentes, geralmente, o patógeno é destruído pelos mecanismos de defesa do organismo, porém, pode ainda alojar-se no tecido e estabelecer uma infecção latente assintomática, que posteriormente, em condições de supressão do sistema imunológico, pode desencadear quadros clínicos importantes (Campbell et al., 2005; Lin, Heitman, 2006; Kwon-chung et al., 2014).

Todavia, em pessoas com deficiências no sistema imunológico, há uma ruptura no equilíbrio agente-hospedeiro, com maior probabilidade de desenvolvimento das formas graves da doença fúngica por *Cryptococcus* spp. (Campbell et al., 2005; Lin, Heitman, 2006; Kwon-chung et al., 2014).

As pesquisas apontam diversos fatores de risco para a meningite criptocócica, os quais incluem: a síndrome da imunodeficiência adquirida, câncer, *diabetes mellitus*, transplantados de órgão sólidos, doenças hepáticas, pacientes em uso prolongado de esteroides e terapia imunossupressora (Marincu et al., 2021; Lu Y et al., 2022).

A criptococose apresenta manifestações clínicas que vão desde febre e desconforto respiratório até sepse e falência múltipla de órgãos, apresentando predileção pelo sistema respiratório e nos casos mais graves envolvimento do sistema nervoso central (Ngan et al., 2022).

O paciente pode apresentar quadros clínicos de: pneumonias, meningoencefalites, manifestações cutâneas, urinárias, ósseas, oculares, articulares, gastrointestinais e, disseminação do patógeno com consequentes quadros de micoses sistêmicas (Kwon-chung et al., 2014; Ngan et al., 2022).

Cryptococcus spp. possui interessantes mecanismos de sobrevivência que lhe conferem a capacidade de latência, virulência, auxiliam nos mecanismos de fuga

das respostas imunológicas do hospedeiro, bem como na intensidade da agressão provocada, e ainda na invasão dos tecidos (Olszewski, Zhang, 2010; Alspaugh, 2015; Vélez et al., 2022).

Os fatores implicados são diversos, *Cryptococcus* spp. se adapta rapidamente as condições do meio, incluindo, primariamente, sua capacidade de desenvolver-se a uma temperatura de 37 °C que é a temperatura corporal humana (Mitchell, Perfect, 1995; Stempinski et al., 2022).

Cryptococcus spp. produz cápsula polissacarídica que envolve seu corpo celular, impedindo a fagocitose por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Poeta, 2004; Vélez et al., 2022), dificultando a adesão das proteínas do sistema complemento, anticorpos e outras moléculas que realizam a opsonização do fungo (O'Meara, Alspaugh, 2012; Sousa HR et al., 2022).

Durante o processo de fagocitose, a cápsula polissacarídica, o protege do estresse oxidativo no interior dos macrófagos. Além disso, interfere na ação de citocinas e na quimiotaxia produzidas pelas células do sistema imunológico (Retini et al., 1996; Zaragoza et al., 2003, 2004, 2009; Doering, 2009; Antachopoulos, Walsh, 2012; Trevijano-Contador et al., 2022).

Cryptococcus spp. também produz melanina e suas propriedades lhe confere resistência contra derivados de oxigênio e nitrogênio, raios ultravioletas, altas temperaturas e impede a entrada de substâncias extracelulares na célula fúngica, incluindo as drogas antifúngicas (Wang Y et al., 1995; Liu et al., 2008; Eisenman et al., 2009; Sousa HR et al., 2022).

Realiza ainda, a síntese de urease resultando no aumento do pH local e maior disponibilidade de nitrogênio (Cox et al., 2000; Singh et al., 2013), produz proteases e fosfolipases que degradam as membranas celulares e proteínas estruturais do hospedeiro favorecendo sua invasão e disseminação (Cox et al., 2001).

E por fim, é capaz de organizar-se em comunidades que se aderem firmemente às superfícies celulares, caracterizando os chamados biofilmes, os quais contribuem na sua colonização, dificultam a resposta imunológica e prejudicam a difusão dos medicamentos (Martinez, Casadevall, 2006).

Os biofilmes são comunidades de células aderidas em uma superfície biótica ou abiótica protegidas por uma matriz extracelular polimérica (MEC), apresentando fenótipos que as difere das células planctônicas ou livres. Sua formação está diretamente relacionada a infecções crônicas e persistentes, assim como ao desenvolvimento de resistência a resposta imunológica do hospedeiro e ao tratamento farmacológico (Martinez, Casadevall, 2006; Costa-Orlandi et al., 2017; Rathore et al., 2022).

A formação de biofilme ocorre de forma bem organizada e depende do perfil da célula fúngica e características do meio, dentre outros fatores. O microrganismo utiliza desse mecanismo para garantir sua sobrevivência no organismo hospedeiro, invadir e colonizar os diversos ambientes e se proteger contra a resposta imunológica, constituindo-se, ainda, como uma importante barreira física contra a terapia antimicrobiana (Martinez, Casadevall, 2007; Martinez et al., 2008; Ravi et al., 2009).

O uso de dispositivos médicos compostos de poliestireno e outros materiais, como válvulas cerebrais, cateteres de derivação ventriculoatrial, fístula de diálise peritoneal de politetrafluoretileno, válvulas cardíacas, articulações protéticas, cateteres de polivinil, assim como superfícies de vidro, viabilizam a formação de biofilmes de *Cryptococcus* spp. (Ravi et al., 2009; Santi et al., 2014; Rathore et al., 2022).

A formação de biofilme, em suma, se dá por etapas que incluem adesão superficial fúngica, formação de microcolônias e produção da matriz polissacarídica. A matriz extracelular (MEC) é produzida e composta por proteínas, polissacarídeos, lipídios, ácidos nucleicos e outras moléculas. Essa composição apresenta variações

entre as espécies e sofre interferências ambientais (Martinez, Casadevall, 2005; Costa-Orlandi et al., 2017).

A cápsula de polissacarídeo de *Cryptococcus* spp. é essencial para a formação de biofilme, uma vez que, sua formação está diretamente relacionada a intensa liberação e ao acúmulo de grandes quantidades de glucuronoxilomanana (GXM) na matriz extracelular. A natureza da cápsula permite interações entre a levedura e os diversos substratos presentes no meio, facilitando a fixação das células (Martinez, Casadevall, 2005, 2007; Robertson, Casadevall, 2009).

A composição do biofilme de *Cryptococcus* corresponde à 88% de glucuronoxilomanana (GXM), um polímero α -(1–3)-manana linear substituído com ácido β -(1–2)-glucopiranosilurônico e β -(1–4)-xilopiranosil, 10% de galactoxilomanana (GalXM) e 2% de manoproteínas que estão envolvidas na produção de citocinas e na imunidade mediada por células (Carmo et al., 2022; Rathore et al., 2022).

Essa organização densa de células associado à formação de canais de fluxo forma um ambiente favorável para a troca de nutrientes, gases, material genético e quorum sensing (Martinez, Casadevall, 2005). A organização do biofilme e a interação célula-célula é fundamental para a patogênese, facilitando a colonização e sobrevivência do microrganismo no tecido e também ativando mecanismos de proteção para escape da resposta imunológica (Albuquerque, Casadevall, 2012; Alspaugh, 2015; Wang D et al., 2022).

Quorum sensing é o mecanismo de comunicação intercelular que envolve a produção e o reconhecimento de moléculas extracelulares autogeradas, também denominadas de autoindutores. Essas moléculas são produzidas e acumuladas durante o crescimento celular e provocam mudanças com o intuito de estimular a cooperação populacional do microrganismo (Bassler, 1999; Kievit, Iglewski, 2000; Albuquerque et al., 2013).

Quando as moléculas autoindutoras produzidas e liberadas no meio excedem determinada concentração, ocorre a ativação de uma cascata de transdução de sinais que alteram a expressão gênica e o metabolismo microbiano, modificando o comportamento do microrganismo, a exemplo da expressão de fatores de virulência em resposta a densidade populacional (Bassler, 1999; Kievit, Iglewski, 2000; Albuquerque et al., 2013; Korem et al., 2017).

Portanto, a complexa organização em biofilme de *Cryptococcus* spp. lhe confere maior resistência e sobrevivência. A matriz exopolissacarídica promove a fixação de moléculas de nutrientes no meio biofilme-líquido e fornece proteção contra alterações ambientais, tais como: alterações no pH; concentração de sal; desidratação; dentre outros fatores que possam ser prejudiciais para o microrganismo (Benaducci et al., 2016).

Além disso, os fármacos antifúngicos apresentam dificuldades em penetrar e alcançar a célula fúngica circundada pela matriz extracelular polimérica característica dessa estrutura, constituindo-se como uma eficiente barreira física. A MEC pode ligar-se aos antifúngicos impedindo sua ação na superfície ou dentro das células fúngicas (Martinez, Casadevall, 2006; Robertson et al., 2012; Liao et al., 2015).

2.2 Terapia convencional para criptococose e mecanismos de resistência de *Cryptococcus* spp. aos fármacos antifúngicos

No manejo terapêutico das doenças criptocócicas é necessário individualizar esse tratamento conforme as características do paciente, levando em considerações condições como a espécie de *Cryptococcus* responsável pela infecção, limitação de recursos, custos, carga fúngica, eficácia e efeitos adversos das drogas,

disponibilidade dos fármacos, neoplasias, gravidez, sorologia positiva para HIV, imunocompetência ou imunodeficiência, transplantados, crianças, e outros quadros clínicos (Perfect et al., 2010; Perfect, Bicanic, 2015).

Qualquer que seja as condições preexistentes, o diagnóstico precoce e a decisão terapêutica de forma célere aumentam as chances de sobrevivência do paciente (Saag et al., 2000; Mourad, Perfect, 2018a, 2018b). A terapêutica da criptococose é dividida nas seguintes fases: indução, consolidação e manutenção (ou profilaxia secundária) (Carmo et al., 2022).

O regime terapêutico, composto por três fases, “indução-consolidação-manutenção”, é a estratégia utilizada em pacientes com infecções sistêmicas. A fase de indução tem como propósito alcançar a eliminação total ou uma redução drástica da carga fúngica, sendo que o tempo mínimo de duração dessa fase, via de regra, é de duas semanas (Mourad, Perfect, 2018a, 2018b; Carmo et al., 2022).

A fase de consolidação tem como finalidade manter a negatividade fúngica e normalizar os parâmetros clínicos e laboratoriais, e deve ser mantida durante no mínimo oito semanas. Por fim, a manutenção ou profilaxia secundária, depende de avaliação prévia da resposta imune do paciente, recomendando-se que seja mantida por no mínimo o período de 01 ano (Kon, 2008; Carmo et al., 2022).

De modo geral, a droga preconizada para tratamento em infecções sistêmicas na fase de indução é a anfotericina B. Um composto polieno com amplo espectro de ação, usado de forma isolada ou em associação com outras drogas como a 5-fluorocitosina (5-FC). Para regime de manutenção e consolidação são utilizados os triazólicos como o fluconazol (Zhai et al., 2012; Perfect, Bicanic 2015).

Na fase de indução, as formulações de anfotericina B e suas concentrações recomendadas são: AmB desoxicolato intravenosa-IV 0,7-1 mg/kg/dia; ou AmB lipossomal 3-4 mg/kg/dia; ou complexo lipídico de AmB 5 mg/kg/dia. A associação é feita com administração oral de 5-FC (100 mg/kg/dia), podendo ser utilizado 5-FC

intravenoso em alguns casos específicos ou quando há incapacidade de ingestão oral (Mourad, Perfect, 2018a, 2018b).

Com a associação da anfotericina B e flucitosina na fase de indução, o líquido cefalorraquidiano (LCR) se tornará estéril, em 60% a 90% dos casos, dentro de duas semanas. A realização de punção lombar permitirá avaliar a esterilização do LCR e necessidade de se prolongar a terapia de indução. E apesar dos riscos de toxicidade da AmB combinada com a flucitosina, grande parte dos pacientes obterão sucesso com esse regime terapêutico (Saag et al., 2000; Barchiesi et al., 2004; Ngan et al., 2022).

Nos países com poucos recursos, o tratamento de indução, em geral, é realizado com AmB desoxicolato, formulação mais tóxica e com mais relatos de reações à infusão. A Organização Mundial da Saúde (OMS) sugere que pacientes tratados com anfotericina B sejam submetidos a cuidados prévios que inclui pré-hidratação com um 1L de soro fisiológico e suplementação de potássio (40 mEq/dia) e magnésio (16 mEq/dia) para se evitar complicações como hipocalcemia e nefrotoxicidade (Vidal et al., 2013; Lizarazo, Castañeda, 2022).

Embora as diretrizes da OMS recomendem que a terapia de indução seja realizada com a combinação de anfotericina B com a flucitosina, este fármaco não está disponível em muitos países devido ao seu alto custo. Nesses casos, recomenda-se que a indução seja realizada com anfotericina B mais fluconazol em doses 800 – 1200 mg/dia (Merry, Boulware, 2016; Mourad, Perfect, 2018a, 2018b; Carmo et al., 2022).

Após a terapia de indução, inicia-se a fase de consolidação, com a administração do fluconazol, na dose de 400 – 800 mg/dia por 08 semanas. Concentrações de fluconazol em torno de 800 mg/dia são consideradas fungicidas, enquanto doses menores são consideradas fungistáticas. Sendo assim, até que a cultura do LCR se apresente estéril, a dose sugerida de fluconazol no início da fase de consolidação é de 800 mg/dia (Vidal et al., 2013).

Para a fase final da terapia, chamada de manutenção ou profilaxia secundária, o fluconazol é utilizado na dose de 200 mg/dia, em média, por 12 meses (Vidal et al., 2013; Mourad, Perfect, 2018a, 2018b).

Os compostos polienos, como a anfotericina B, agem ligando-se ao ergosterol e provocando a formação de poros na membrana, aumentando a permeabilidade celular e fazendo com que a célula fúngica perca importantes componentes intracelulares. Sua ação leva a estresse oxidativo, desequilíbrio eletrolítico e por fim, morte celular. Os Efeitos adversos incluem anemia, distúrbios eletrolíticos, insuficiência renal, reações no local da infusão, dentre outros (Palacios et al., 2011; Gray et al., 2012; Ngan et al., 2022).

A 5-fluorcitocina consegue se ligar ao RNA do fungo e alterar a síntese de DNA, mas deve ser utilizada com outro fármaco que facilite a sua absorção pela célula. Por essa razão, é comumente associada à anfotericina B, que provoca a formação de poros na membrana e facilita a sua entrada nas células. Tem ação fungistática e os principais efeitos colaterais são distúrbios gastrointestinais, elevação das aminotransferases, anemia, leucopenia e trombocitopenia (Barchiesi et al., 2000; Roemer, Krysan, 2014; Ngan et al., 2022).

Já os compostos triazólicos atuam inibindo a síntese do ergosterol, através da inibição da enzima 14 α -desmetilase do citocromo P450 (CYP), colesterol essencial à formação da membrana plasmática dos fungos. O triazol mais comumente utilizado é o fluconazol, que possui alta biodisponibilidade e amplo espectro. Pode causar erupções cutâneas e alterações nas enzimas hepáticas (Barchiesi et al., 2000; Roemer, Krysan, 2014; Cui et al., 2022).

Tratando-se de infecções por *Cryptococcus* spp., nas infecções sistêmicas com acometimento do sistema nervoso central, caracterizando a meningite criptocócica, é de fundamental importância que a droga de escolha para terapêutica, apresente facilidade em atravessar a barreira hematoencefálica e eliminar a infecção cerebral (Zhai et al., 2012; Peyclit et al., 2021).

Os antifúngicos apresentam grandes obstáculos, quer seja pelo reduzido número de compostos disponíveis, como pelas próprias características das células fúngicas e sua similaridade estrutural e metabólica com as células animais, contribuindo para maiores riscos de toxicidade (Cowen, Steinbach, 2008; Scorzoni et al., 2017).

Ademais, diversos estudos têm demonstrado resistência de *Cryptococcus* spp. a medicamentos antifúngicos, especialmente em pacientes com AIDS que fazem terapia com azóis por longo prazo. O fungo acaba se adaptando a concentrações elevadas dos compostos, desenvolvendo cepas resistentes e resultando em falhas terapêuticas (Mondon et al., 1999; Sionov et al., 2009; Varma, Kwon-Chung, 2010).

A resistência microbiológica ao fármaco antifúngico ocorre quando as concentrações necessárias do fármaco para inibir o crescimento fúngico são maiores do que aquelas utilizadas em cepas do tipo selvagem (células que não possuem resistência antifúngica adquirida). A resistência clínica está associada a ineficácia do fármaco em inibir o crescimento fúngico, causando persistência e/ou progressão de uma infecção (Parente-Rocha et al., 2017; Yadav et al., 2022).

Fatores envolvidos nos quadros de resistência aos fármacos, incluem desde resistência intrínseca de cepas endógenas, à substituição de cepas endógenas sensíveis por cepas resistentes por pressão seletiva de drogas antifúngicas. Pode, ainda, haver aquisição ambiental ou transferência de espécies superinfectantes entre indivíduos, além de alterações no fenótipo celular (leveduras/hifas) e crescimento populacional (White TC et al., 1998).

Os mecanismos moleculares de resistência fúngica podem, de forma geral, ser categorizados em dois importantes grupos. O primeiro grupo envolve mecanismos desenvolvidos para impedir a ação do antimicrobiano na célula e o segundo grupo são os mecanismos desenvolvidos para que a célula suporte o estresse induzido pelas drogas administradas (Cowen, Steinbach, 2008).

Os fungos precisam se adaptar a presença dos antifúngicos, iniciando, mecanismos moleculares para sua sobrevivência, que incluem: (1) mutação na molécula fúngica alvo da ação da droga, alterando sua ligação/afinidade com o fármaco; (2) redução na importação do fármaco; (3) modificação ou degradação do fármaco dentro da célula; (4) desenvolvimento de um sistema de efluxo que remove a droga da célula e; (5) superexpressão da proteína alvo por modificação da região promotora do gene (White TC et al., 1998; Ghannoum, Rice., 1999; Parente-Rocha et al., 2017).

A anfotericina B, como já citada anteriormente, é um polieno que age formando canais na membrana fúngica com a consequente liberação de íons (K^+ , Na^+ , H^+ , Cl^-), levando a lise celular. Além disso, a formação de importantes complexos (droga-lipídio) depredam o ergosterol do fosfolipídio da membrana celular fúngica, levando ao esgotamento do ergosterol na célula (Hull et al., 2012; Parente-Rocha et al., 2017).

Apesar da resistência contra a anfotericina B apresentar baixos índices, ela pode ocorrer devido uma mutação na via de biossíntese do ergosterol que leva a uma menor afinidade de ligação ao fármaco, ou pela redução na quantidade de ergosterol disponível, possível defeito na enzima envolvida na síntese de ergosterol ($\delta 8-7$ isomerase) e/ou em consequência da presença de biofilmes (Cowen, Steinbach, 2008; Palacios et al., 2011; Gray et al., 2012; Mesa-Arango et al., 2012; Rogers et al., 2022).

O rápido desenvolvimento de resistência à flucitosina é um dos fatores que impede seu uso na monoterapia para criptococose. A flucitosina consegue interferir na síntese de RNA, DNA e no metabolismo da pirimidina. Sua ação farmacológica só ocorre nas células fúngicas, não atuando em células de mamíferos (Bermas, Geddes-McAlister, 2020; Padda, Parmar, 2022).

Ao entrar na célula fúngica, com o auxílio de uma enzima (citosina permease), esse composto é convertido em 5-fluorouracil (5FU) através da enzima citosina

desaminase. Uma fração do 5FU é convertido em ácido 5-fluorouridílico (FUMP) pela UMP pirofosforilase, que após nova fosforilação é incorporado ao RNA alterando a síntese proteica. Outra fração dessa molécula é convertida em monofosfato de 5-fluorodesoxiuridina, alterando a síntese de DNA e a divisão nuclear por inibir a enzima timidilato sintase (Ghannoum, Rice, 1999; Vermes et al., 2000; Padda, Parmar, 2022).

A resistência à flucitosina por *C. gattii* possui mecanismos ainda desconhecidos. No entanto, os mecanismos de resistência por *C. neoformans* parecem estar relacionados a uma redução da atividade da citosina permease (*fcy2*) prejudicando a entrada do composto na célula e/ou alteração na ação enzimática da citosina desaminase (*cy1*) ou uracil fosforribosil transferase (*fur1*) (White TC et al., 1998; Rogers et al., 2022).

Por conseguinte, o fluconazol, derivado triazólico, age alterando a biossíntese de ergosterol através da inibição da enzima C14 α -lanosterol demetilase dependente do citocromo P-450, esta enzima é codificada pelo gene *ERG11*. Dessa forma, ocorrerá um acúmulo de um esteroide intermediário tóxico, o 14- α -metil-ergosta-8-eno-3,6-diol, resultando em depleção do ergosterol e alteração da estrutura e função da célula fúngica (Ghannoum, Rice, 1999; Lupetti et al., 2002; Cowen, Steinbach, 2008; Parente-Rocha et al., 2017; Yadav et al., 2022; Bermas, Geddes-McAlister, 2020).

Cryptococcus spp. possui diversos mecanismos que conferem a esse patógeno resistência ao fluconazol e inclui: mutações e/ou superexpressão no gene *ERG11*; superexpressão do gene *AFR1*; superexpressão de bombas de efluxo e heterorresistência (Fontes et al., 2017; Atim et al., 2022; Kane, Carter, 2022).

Várias mutações pontuais no gene *ERG11*, com consequentes substituições de aminoácidos (G344S, G484S, G470R e Y145F), alteram a via de síntese do ergosterol, com a subsequente modificação da enzima alvo do fármaco, C14 α -lanosterol demetilase, resultando em menor afinidade ou incapacidade dos azóis se ligarem a essa enzima (Bosco-Borgeat et al., 2016; Rogers et al., 2022).

Por sua vez, a expressão aumentada do gene *ERG11* provoca uma elevada produção da enzima C14 α -lanosterol demetilase, levando à necessidade de grandes concentrações intracelulares do fármaco para inibição efetiva da enzima alvo (Cannon et al., 2009; Yang ML et al., 2015; Atim et al., 2022).

A superexpressão do gene *AFR1* resulta em uma regulação positiva do transportador ABC 1 (CnAFR1), com isso ocorre um efluxo ativo do fármaco antifúngico através da membrana celular para fora da célula, diminuindo a concentração da droga no local de ação. Associado, também ocorre o aumento da expressão de Mdr1, transportador ABC que pertence à subclasse de resistência a múltiplas drogas (Sanguinetti et al., 2006; Yang ML et al., 2015).

Tratando-se do mecanismo de heterorresistência, este parece ter origem a partir da duplicação de cromossomos (dissomia do cromossomo 1), que carregam os genes que codificam para *AFR1* e *ERG11*. Possui característica dinâmica, heterogênea e é cepa dependente (Rogers et al., 2022).

Na heterorresistência uma subpopulação se adapta a concentrações mais altas do fármaco, de maneira gradual, resultando em populações com diferentes suscetibilidades a droga. É considerada uma resposta adaptativa ao estresse induzido e é reversível ao reduzir a exposição à droga (Cheong, McCormack, 2013; Roemer, Krysan, 2014; Hope et al., 2019; Rogers et al., 2022).

2.3 Reposicionamento de fármaco como uma nova abordagem terapêutica

Considerando todas essas questões supracitadas, limitações da terapia antifúngica disponível, desenvolvimento de resistência, toxicidade e o alto custo dos antifúngicos, se faz necessário o desenvolvimento de novas terapias para essa finalidade (Oliver et al., 2008; Chen X et al., 2014; Azevedo, 2015).

Alternativas terapêuticas têm sido avaliadas para contornar essa problemática, com pesquisas que objetivam obter maior variabilidade terapêutica e o desenvolvimento de fármacos mais eficazes, com amplo espectro fúngico, maior biodisponibilidade e redução de efeitos colaterais (Oliver et al., 2008; Chen X et al., 2014; Azevedo, 2015).

Dentro desse contexto, investigar ações antifúngicas de outras classes de fármacos, como antidepressivos, anti-inflamatórios, anti-helmínticos, antibacterianos, dentre outros, tem demonstrado ser uma alternativa econômica, célere e viável para o tratamento de infecções fúngicas (Oliver et al., 2008; Chen X et al., 2014; Azevedo, 2015; Donlin, Meyers, 2022).

A combinação de fármacos, pode permitir a redução da dose dos fármacos tradicionalmente utilizados e redução do tempo de tratamento, o que consequentemente também reduz os riscos de toxicidade e pode causar importantes impactos na evolução da resistência (Mukherjee et al., 2005; Baym et al., 2016; Spitzer et al., 2017; Truong et al., 2018).

Ao combinar fármacos, a resistência pode ser neutralizada ou até mesmo revertida, processo chamado de inversão de seleção, o que geralmente é resultante do fato da própria resistência desenvolvida à primeira droga conferir maior sensibilidade do patógeno a segunda droga administrada (Mukherjee et al., 2005; Baym et al., 2016; Spitzer et al., 2017; Truong et al., 2018).

Ademais, algumas pesquisas demonstram que a combinação de compostos pode levar a condição conhecida como sinergismo, onde um fármaco aumenta a eficácia da ação de outro fármaco já eficaz para determinada doença, podendo atuar facilitando o direcionamento desse composto para o local de ação, aumentando sua taxa de absorção, sua biodisponibilidade no local alvo ou mesmo retardando seu metabolismo e resultando em maior eficácia da terapêutica quando comparado ao uso isolado de um dos fármacos (Spitzer et al., 2017; Kane, Carter, 2022).

A descoberta e o desenvolvimento de novas drogas é um processo que requer alto investimento e demanda tempo, em torno de 12 a 17 anos, para atender as exigências regulatórias que visam à segurança, eficácia e qualidade das pesquisas. Em contrapartida, o reposicionamento de fármacos permite reduzir significativamente o tempo de desenvolvimento, com apenas 3 a 12 anos para reposicionar um medicamento antigo para um novo tipo de tratamento (Hua et al., 2022; Donlin, Meyers, 2022).

O processo tradicional para o desenvolvimento de medicamentos inclui quatro etapas de descoberta do princípio ativo, estudos pré-clínicos, ensaios clínicos e monitoramento de segurança pós-comercialização. No reposicionamento, dados clínicos e perfis clínicos já estão disponíveis, permitindo, em alguns casos, que os compostos passem para a Fase II, quando demonstram ser suficientemente seguros para ensaios pré-clínicos (Hua et al., 2022; Yang S et al., 2022).

Em suma, o reposicionamento de fármacos permite a avaliação de novos usos para medicamentos aprovados ou em investigação, sendo, portanto, considerada uma alternativa mais rápida e econômica na busca por fármacos antifúngicos. Dessa forma, fármacos utilizados para outras finalidades terapêuticas são testados para identificação de possível ação contra infecções fúngicas, já que o processo de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos, em geral, é demorado e custoso (Firacative et al., 2021).

Diversas drogas têm sido investigadas quanto a sua ação antifúngica, fármacos antibacterianos como tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, rifampicina e outros, parecem ser capazes de alterar a expressão de genes responsáveis por características indispensáveis à sobrevivência e invasão fúngica, como permeabilidade da membrana, adesão, formação de hifas e biofilme (Zeng et al., 2019; Gao et al., 2020; Zhang et al., 2021).

Imunossupressores como a dexametasona demonstraram ação efetiva sobre fosfolípases extracelulares. Drogas antiarrítmicas usadas para controle da

frequência cardíaca, como o cloridrato de verapamil, apresentaram ação capaz de inibir adesão, formação de hifas, colonização gastrointestinal e diminuição da resistência do microrganismo ao estresse oxidativo provocado pela resposta imunológica do hospedeiro (Zeng et al., 2019; Gao et al., 2020; Zhang et al., 2021).

Nesse sentido, drogas antidepressivas também vêm sendo investigadas, e os estudos constatarem achados promissores dessa classe de medicamentos. Fármacos inibidores seletivos de recaptação de serotonina e norepinefrina, com ação antidepressiva e ansiolítica, por exemplo, são amplamente prescritos por serem considerados seguros e possuírem baixo índice de efeitos colaterais (Spadari et al., 2020; Zhang et al., 2021).

Pesquisas realizadas com cloridrato de fluoxetina, cloridrato de sertralina e cloridrato de paroxetina identificaram ação antifúngica positiva tanto em combinação com fármacos antifúngicos quanto na forma isolada desses compostos (Costa Silva et al., 2017; Spadari et al., 2020; Pereira et al., 2021; Zhang et al., 2021; Menezes et al., 2022).

Enquanto os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRSs) possui ação unimodal, ou seja, interfere na recaptação apenas da serotonina, outra classe de fármacos, como o cloridrato de duloxetina, da classe dos inibidores seletivos de recaptação de serotonina-norepinefrina, com mecanismo de ação semelhante, possui ação bimodal, ou seja, há o bloqueio da recaptação sináptica central de serotonina e norepinefrina (Salem et al., 2022).

Os mecanismos precisos que expliquem a ação antidepressiva do cloridrato de duloxetina são desconhecidos, podendo estar relacionados à potencialização da atividade serotoninérgica e noradrenérgica no SNC. O fármaco sofre metabolismo hepático através das isoenzimas 1A2 e 2D6 do citocromo P450 (CYP1A2 e CYP2D6) em compostos inativos. Esses metabólitos inativos, são eliminados grande parte na urina e cerca de 20% é eliminado nas fezes (Frampton, Plosker, 2007; Smith, Nicholson, 2007).

A meia-vida de eliminação é de cerca de 12 horas. Apesar de o cloridrato de duloxetine ser metabolizado principalmente pelas isoenzimas do citocromo P-450, ele não interfere e/ou interage significativamente com o CYP3A4, portanto, não há preocupações quanto à administração concomitante com fármacos que afetam essa enzima metabólica, como antibióticos macrolídeos ou agentes antifúngicos (Frampton, Plosker, 2007; Smith, Nicholson, 2007).

Cloridrato de duloxetine é comercializado em apresentações capsulares de 20, 30 e 60 mg. Na prática clínica, nos quadros de transtorno de ansiedade generalizada, fibromialgia e dor neuropática diabética, é utilizado uma dosagem inicial comumente de 60 mg/dia, que pode ser aumentada até uma dose máxima de 120 mg/dia. Casos de superdosagem relatados encontram-se na faixa de 300 mg a 1400 mg resultante de ingestões agudas do fármaco isolado ou em combinação com outras drogas (Preskorn, 2004; Vey, Kovelman, 2010).

O fármaco cloridrato de duloxetine foi inicialmente aprovado para o tratamento do transtorno depressivo maior. Com relação a outros antidepressivos, suas características farmacodinâmicas são favoráveis devido a sua dupla inibição, tolerância, segurança, apresentando ainda, menores efeitos adversos e possibilidade reduzida de ligação com outros receptores neurais (Salem et al., 2022).

Posteriormente, cloridrato de duloxetine foi aprovado pelo FDA (Federal Drug Administration) dos EUA (Estados Unidos da América) para uso em outros quadros clínicos, como na dor neuropática periférica diabética, ocorrendo, portanto, reposicionamento do seu uso para condições não enquadradas no rol dos distúrbios psiquiátricos (Waitekus, Kirkpatrick, 2004).

Esse fármaco foi o primeiro antidepressivo, nos EUA, que teve aprovada sua aplicação para diagnósticos fora do campo da psiquiatria. Nesse mesmo ano, o cloridrato de duloxetine foi aprovado, na Europa, para uso no tratamento da incontinência urinária de esforço (Waitekus, Kirkpatrick, 2004).

No Brasil, o cloridrato de duloxetina também é aplicado além do âmbito psiquiátrico, há estudos que avaliam a eficácia e efeitos adversos do cloridrato de duloxetina em pacientes com dores neuropáticas por diversas condições clínicas (Oliveira Júnior, Almeida, 2018; Illeez et al., 2022; Santos et al., 2022).

O cloridrato de duloxetina pode apresentar alguns eventos adversos agudos, tais como constipação, diminuição do apetite, tontura, boca seca, fadiga e náusea. E apesar de apresentar boa eficácia, segurança e tolerância, as recomendações do fabricante sugerem precaução quanto ao risco de aumento dos níveis de transaminases hepáticas, não sendo recomendada a prescrição para pacientes que faz uso substancial de álcool ou evidência de doença hepática crônica (Hanje et al., 2006; Qin et al., 2022).

Estudos com o objetivo de elucidar a ação antifúngica do cloridrato de duloxetina ainda são escassos na literatura, embora já existam investigações bem-sucedidas de outros fármacos de categoria de atuação semelhante, demonstrando, por conseguinte, a necessidade de se explorar suas ações antimicrobianas, tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo* (Zhang et al., 2021; Menezes et al., 2022).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica do fármaco cloridrato de duloxetina isolado e em combinação ao antifúngico tradicionalmente utilizado, anfotericina B, frente a cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, *in vitro* e *in vivo* em modelo invertebrado *Galleria mellonella*.

3.2 Objetivos específicos

- a) determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM);
- b) avaliar o efeito sinérgico do antifúngico anfotericina B em associação com o cloridrato de duloxetina;
- c) determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM);
- d) verificar a ação do cloridrato de duloxetina sobre o ergosterol presente na membrana de *Cryptococcus* spp.;
- e) verificar a ação isolada do cloridrato de duloxetina sobre o biofilme de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*;

- f) avaliar *in vivo*, no modelo invertebrado *Galleria mellonella*, a toxicidade e eficácia antifúngica do cloridrato de duloxetine.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos e condições de cultivo

Neste trabalho foram utilizados, para triagem inicial, através do experimento de microdiluição em caldo, cinco isolados clínicos de *C. neoformans*, um isolado clínico de *C. gattii*, as cepas *C. neoformans* H99 (The American Type Culture Collection ATCC) 208821 e *C. gattii* ATCC 56990. As leveduras foram cultivadas em Sabouraud e incubadas a 37 °C, com agitação de 80 rpm. Como controle no ensaio de microdiluição em caldo foi utilizada *Candida krusei* ATCC 6258 também cultivada em caldo Sabouraud por 24 horas a 37 °C. As cepas clínicas são isolados do líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes, de acordo com Carmo (2021). 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.

4.2 Compostos e antifúngicos

Para avaliar a sensibilidade e os efeitos sinérgicos em *C. neoformans* e *C. gattii* foram utilizados os fármacos cloridrato de duloxetina (Galena, Campinas, Brasil), inibidor seletivo da recaptação de serotonina e noradrenalina, e o antifúngico anfotericina B (Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

4.3 Avaliação da sensibilidade e determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

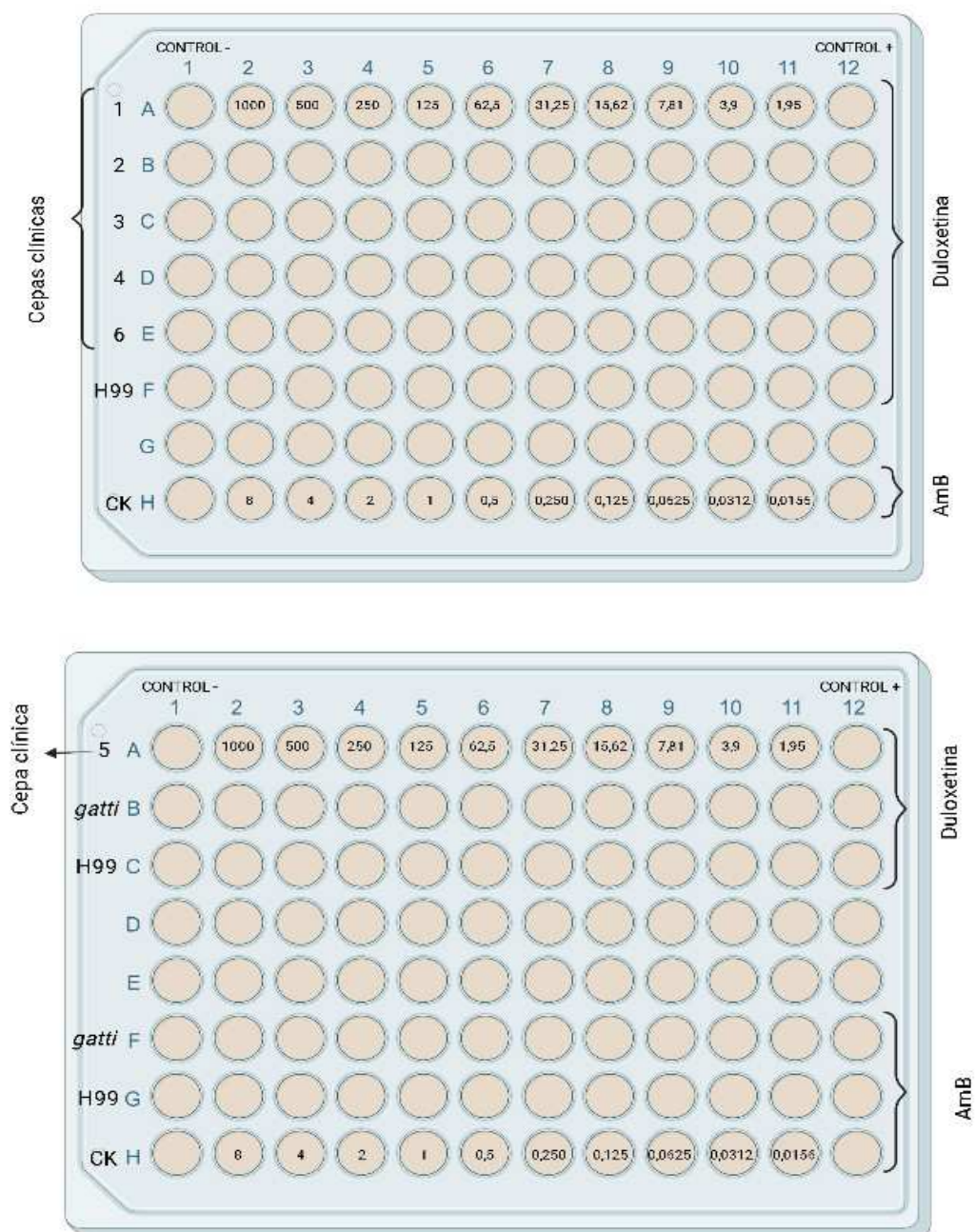
No teste de sensibilidade foi utilizado a técnica de microdiluição em caldo conforme protocolo do European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2017). O meio de cultura para a realização do teste de sensibilidade e diluição dos compostos foi RPMI-1640 (com L-glutamina, pH 7,0, sem bicarbonato de sódio) acrescido de 2% de glicose tamponado com MOPS 0,165 M. O controle do teste foi realizado com anfotericina B (faixa de concentração: 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,125 µg/mL, 0,0625 µg/mL, 0,0312 µg/mL e 0,0156 µg/mL), conforme Quadro 1. O fármaco cloridrato de duloxetina foi diluído em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente diluído em RPMI para obter uma concentração de trabalho inicial de 2.000 µg/mL. Foram realizadas diluições seriadas de 100 µL do composto em placa de 96 poços (faixa de concentração: 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,62 µg/mL, 7,81 µg/mL, 3,9 µg/mL e 1,95 µg/mL), as concentrações finais podem ser observadas no Quadro 1. A Figura 1 mostra uma representação gráfica da placa utilizada no experimento.

Quadro 1 – Diluições dos fármacos

FÁRMACOS		DILUIÇÕES SERIADAS DOS FÁRMACOS									
Cloridrato de Duloxetina	µg/mL	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,9	1,95
Anfotericina B	µg/mL	8	4	2	1	0,5	0,250	0,125	0,0625	0,0312	0,0156

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 1 – Representação das placas utilizadas para triagem inicial de sensibilidade das diversas cepas clínicas e padrão frente ao composto cloridrato de duloxetina



Fonte: Elaborado pela autora utilizando a ferramenta Biorender.

A próxima etapa consistiu na inoculação de 100 µL de inóculo padronizado a $2,5 \times 10^5$ células/mL nos poços de numeração 02 a 12 das linhas correspondentes a cada cepa. Essas placas foram novamente incubadas na estufa a 37 °C com agitação de 80 rpm por 48 h.

Após 48 horas de incubação os resultados foram analisados por leitura visual e por leitura espectrofotométrica a 530 nm. A concentração inibitória mínima (CIM) foi a menor concentração do composto em que foi observado a inibição total do crescimento fúngico.

4.4 Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após a leitura visual e leitura espectrofotométrica a 530 nm realizada no teste de sensibilidade, uma fração de cada poço foi transferida delicadamente, com auxílios de palitos de madeira estéreis, para uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud e devidamente demarcada, onde cada região da placa de Petri correspondia a sua localização na placa de 96 poços. Após 48 h de incubação a 37 °C, foi observado se houve o crescimento ou não de colônias e suas respectivas concentrações. A concentração fungicida mínima foi determinada pela menor concentração onde não foi observado crescimento.

4.5 Ensaio de quantificação de ergosterol

Inicialmente, *C. neoformans* e *C. gatti*, foram cultivados em ágar Sabouraud suplementado com o fármaco antifúngico AmB ou o fármaco antidepressivo

cloridrato de duloxetina, nas concentrações de 5X MIC e 7X MIC, incubados a 37 °C por 48 h. Após esse período, 20 mg de massa fúngica úmida foi coletada e adicionadas a tubos de falcon contendo 3 mL de solução de hidróxido de potássio a 25% em etanol. Após essa etapa foram submetidos a uma temperatura de 85 °C em banho-maria por 1 hora. Posteriormente, 1 mL de água destilada esterilizada e 3 mL de heptano foram adicionados em cada tudo, e os tubos foram submetidos a agitação mecânica por 3 minutos. Em seguida, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por mais 5 minutos para a formação das fases aquosa e lipofílica. Com a formação das duas camadas, 600 µL do sobrenadante, referente a camada superficial rica em ergosterol, foram coletados e transferidos para eppendorfs. Por fim, 100 µL desta suspensão foi transferida para uma placa de 96 poços de quartzo, para leitura de absorbância em espectrofotômetro a 282 nm.

Solução padrão de ergosterol de 2000 µg/mL (em etanol) e a concentração da curva de 0,5 µg/mL a 1024 µg/mL.

4.6 Avaliação da atividade sinérgica do cloridrato de duloxetina com a anfotericina B

Foi utilizada a técnica do “tabuleiro de xadrez” para avaliar a atividade sinérgica do cloridrato de duloxetina com anfotericina B. Essa técnica é baseada no teste de sensibilidade por microdiluição em caldo, preconizada pelo EUCAST (EUCAST, 2017). Os compostos foram adicionados às placas de 96 poços e foram realizadas diluições seriadas com os compostos a serem combinados.

Os fármacos, cloridrato de duloxetina e anfotericina B, foram utilizados na linha H e coluna 12, respectivamente, de forma isolada, para confirmação de efetividade das drogas, baseado na Concentração Inibitória Mínima (CIM) já

estabelecida nos experimentos anteriores. Com relação ao cloridrato de duloxetina, na linha H/coluna 02 foi inoculado 200 μL do fármaco com concentração de 2.000 $\mu\text{g/mL}$, no entanto, 100 μL foi utilizado para realização da diluição seriada até a coluna 11. Os poços referentes a anfotericina B receberam 100 μL do fármaco já diluídos na concentração corresponde (16 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$). Ambos receberam 100 μL da suspensão fúngica de $2,5 \times 10^5$, resultando em uma concentração inicial de 1.000 $\mu\text{g/mL}$ do cloridrato de duloxetina e 8 $\mu\text{g/mL}$ da anfotericina B.

A coluna 1 (linhas A a D) correspondeu ao controle positivo, contendo 100 μL de RPMI e 100 μL de inóculo com células fúngicas, enquanto a coluna 1 (linhas E a H) correspondeu ao controle negativo recebendo apenas 200 μL de RPMI.

A região central da placa (Colunas 02 a 11 e linhas A a G) foi inoculada da seguinte forma: colunas 03 a 10 receberam inicialmente 50 μL de RPMI. A coluna 02 (linhas A até G) foi adicionado 100 μL do cloridrato de duloxetina em uma concentração de 2.000 $\mu\text{g/mL}$, 50 μL foram utilizados para realizar a diluição seriada até a coluna 11. Após essa etapa, foi acrescentado 50 μL de AmB com as concentrações referentes às linhas correspondentes. E por fim, foram inoculados os 100 μL da suspensão fúngica de $2,5 \times 10^5$ cells/mL.

As placas foram incubadas a 37 °C e após 48 h foi realizada a leitura visual e leitura espectrofotométrica a 530 nm. O resultado do experimento foi a determinação da menor concentração de cada composto capaz de inibir o crescimento fúngico completamente, representado por turbidez zero índice de concentração inibitória fracionária (FICI) e foi calculado usando a equação: $\Sigma\text{FIC} = \text{FICA} + \text{FICB}$, onde o FIC é a razão da CIM do fármaco em combinação com a CIM sozinha (Odds, 2003; White RL et al., 1996). Uma combinação foi considerada sinérgica a uma $\text{FICI} \leq 0,5$, indiferente a $\text{FICI} > 1$ e ≤ 4 e antagonista em $\text{FICI} > 4,0$. A mesma fórmula foi utilizada para calcular o índice de concentração fungicida fracionária (FFCI), usando valores CFM em vez de CIM. No Quadro 2, pode-se

observar a disposição dos fármacos e as concentrações finais na placa.

Quadro 2 – Concentrações finais dos fármacos ($\mu\text{g/mL}$) na placa de sinergismo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	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	+	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	+	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	+	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	-	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	-	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	-	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	-	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90	1,95	

Legenda: Esquema representativo onde o fármaco cloridrato de duloxetina e suas concentrações estão representados pela cor azul, e o fármaco anfotericina B e suas concentrações pela cor vermelha. O controle positivo está representado pelo (+) e o negativo pelo (-).

Fonte: Elaborado pela autora.

4.7 Atividade antifúngica do cloridrato de duloxetina em biofilme de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.

A formação de biofilme foi realizada de acordo com Martinez e Casadevall (2006), com algumas modificações. Para isso, 100 µL da suspensão fúngica com cepas de *C. neoformans* ATCC 208821 e *C. gattii* ATCC 56990 e concentração de 10^7 células/mL foram inoculadas em placas de 96 poços e incubadas a 37 °C, sem agitação durante 24 h. Transcorrido esse período os microrganismos/caldo foram removidos e os poços foram lavados por 2 vezes com solução salina a 0,85% (NaCl) para remoção das leveduras não aderentes. Em seguida, foi adicionado tratamento, por 24 horas, expondo esse biofilme aos compostos de cloridrato de duloxetina ou anfotericina B. As concentrações dos fármacos utilizados para tratamento do biofilme são descritas no Quadro 3.

Quadro 3 – Concentrações dos fármacos (µg/mL) utilizados para tratamento do biofilme

Fármaco	Microrganismo	CIM (µg/mL)	Concentração do fármaco para tratamento do biofilme (µg/mL).	
Cloridrato de Duloxetina	<i>C. gattii</i>	15,62	10 x CIM	156,2
			20 x CIM	312,4
	<i>C. neoformans</i>	31,25	10 x CIM	312,5
			20 x CIM	625
Anfotericina B	<i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	0,5	5 x CIM	2,5
			10 x CIM	5,0

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.8 Avaliação do efeito do tratamento na biomassa do biofilme por cristal violeta

A mensuração do efeito do fármaco na biomassa dos biofilmes foi realizada utilizando a metodologia descrita de acordo com Peeters et al. (2008). Após formação do biofilme conforme item 4.7, foi adicionado tratamento dos biofilmes com a solução de cloridrato de duloxetina e anfotericina B. Decorridos 24 h, os fármacos foram removidos, os poços novamente lavados por duas vezes com solução salina a 0,85% e fixados por 15 minutos com 100 µL de álcool absoluto. Após a retirada do álcool, a placa foi armazenada na estufa a 37 °C para secagem. Decorrido mais 24 horas do último procedimento (secagem) foi adicionado 100 µL de cristal violeta a 0,5%, e após sua retirada os poços foram lavados com NaCl até que esse composto se apresentasse translúcido. Logo após, foi acrescentado em cada poço 100 µL de álcool e essa solução foi transferida para uma nova placa de 96 poços para proceder à leitura espectrofotométrica a 530 nm.

4.9 Avaliação da viabilidade celular por XTT

A atividade metabólica dos biofilmes foi avaliada de acordo com Martinez e Casadevall (2006), a partir do ensaio de redução de XTT. O ensaio foi realizado com adição em cada poço de 50 µL de solução de XTT (1 mg / mL em PBS) e 4 µL da solução de 1 mM menadiona em acetona (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). As microplacas foram incubadas a 37 °C por 5 h e medidas as absorbâncias a 490 nm. Meio RPMI foi incluído como controle negativo.

4.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os biofilmes foram formados, conforme item 4.7, entretanto para esse ensaio a formação do biofilme foi realizada sobre corpos de prova confeccionados em resina acrílica termopolimerizável à base de polimetilmetacrilato (Vipi Cril Plus, VIPI, Pirassununga, Brasil). Os corpos de prova foram autoclavados e posicionados em placas de 24 poços e foi acrescentado 2 mL de meio de cultura. Após a etapa de formação e tratamento, os biofilmes foram fixados com 2,5 mL de tampão fosfato 0,1 M, 0,50 mL de glutaraldeído a 2,5% e 2 mL de paraformaldeído a 4% por 2 h. Ao término deste período os corpos de prova foram lavados com PBS. Prosseguimos, então, a desidratação com 1 mL de acetona nas concentrações de 50, 70, 90, e 100% por 10 min em cada concentração, em seguida acetona 100% acrescido de HMDS, na proporção de 1:1 por 30 min, e por fim, HDMS 100% por mais 30 min. Ao finalizar o processo de desidratação, a placa foi colocada para secagem total em temperatura ambiente. Os corpos de prova foram retirados do fundo da placa com auxílio de pinça estéril, transferidos para stubs de alumínio e recobertos com ouro por 160 s a 40 mA. Após a metalização, as peças foram examinadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Varredura do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT/Unesp), operando em 15 kV nos aumentos de 2.000; 4.000 e 8.000 vezes.

4.11 Atividade antifúngica *in vivo* em modelo experimental *Galleria mellonella*

As amostras de *Galleria mellonella*, utilizadas no experimento, são cultivadas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia/UNESP São José dos Campos – SP. Foram selecionadas, 24 horas antes do

experimento, cinco grupos contendo 10 larvas cada e sem alterações de cor, com peso de 250 – 300 mg, armazenadas em placas de Petri e sem alimento, incubadas em estufa, sem iluminação e a uma temperatura de 37 °C. Antes do início da inoculação, foi realizada a limpeza das pró-patas com etanol 70% e com uma seringa Hamilton foi injetado 10 µL de inóculo e/ou solução de tratamento através da última pró-pata esquerda de cada larva. O grupo controle foi composto por larvas injetadas apenas com solução salina.

4.12 Ensaio de sobrevivência

Foi utilizado uma suspensão fúngica de 10^8 células/mL para inoculação em cada larva de *Galleria mellonella* para análise da curva de sobrevivência. As larvas foram infectadas com 10 µL de inóculo através da proleg esquerda e incubadas a 37 °C para monitoramento durante os sete dias consecutivos. A morte das larvas foi identificada pela ausência de movimento após estímulos com uma pinça. Como controle, as larvas receberam apenas solução salina.

4.13 Efeito antifúngico do cloridrato de duloxetina em *Galleria mellonella*

Os grupos de larvas foram tratadas com as concentrações de cloridrato de duloxetina que apresentaram melhor atividade *in vitro*. Para os ensaios de eficácia as larvas foram infectadas com 1×10^8 células/larva e tratadas com valores baseados nos resultados obtidos nos testes de sensibilidade. Portanto utilizamos concentrações e suas correspondentes doses de 1 x (3,125 mg/larva), 3 x (9,375

mg/larva) e 5 x (15,625 mg/larva) dos valores de concentração inibitória mínima já encontrados do composto cloridrato de duloxetina. Os tratamentos foram administrados 1 h após a infecção. As larvas foram incubadas a 37 °C e avaliadas a cada 24 h durante 7 dias consecutivos. Em cada experimento, foram utilizados grupos contendo 10 larvas e o experimento foi realizado em triplicata.

4.14 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o software *GraphPad Prism* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Os dados obtidos pelos testes de atividade antifúngica em biofilmes passaram pelo Kruskal-Wallis test com Dunn, como pós-teste, o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. As curvas de sobrevivência em *Galleria mellonella* foram analisadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do fármaco cloridrato de duloxetina *in vitro*

5.1.1 Determinação da CIM e CFM do cloridrato de duloxetina

Todos os cinco isolados clínicos de *C. neoformans* (cepas 1, 2, 3, 4, 6), o isolado clínico de *C. gattii* (cepa 1), as cepas *C. neoformans* ATCC 208821 e *C. gattii* ATCC 56990 apresentaram sensibilidade ao fármaco cloridrato de duloxetina. A *Candida krusei* foi utilizada como controle do experimento e apresentou CIM da AmB de 1,0 µg/mL. *C. gattii* ATCC 56990 e *C. neoformans* ATCC 208821 foram utilizados também como controle do experimento apresentando CIM da AmB de 0,5 µg/mL.

O cloridrato de duloxetina apresentou valores de CIM e CFM nas faixas de 15,62 a 62,5 µg/mL para cepas clínicas e ATCC de *C. gattii* e *C. neoformans*. Os valores de CIM e CFM de todas as cepas frente ao cloridrato de duloxetina podem ser observados no Quadro 4.

Quadro 4 – Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima do cloridrato de duloxetina nas cepas utilizadas no experimento

Cepas	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
<i>C. neoformans</i> 1	62,5	62,5
<i>C. neoformans</i> 2	62,5	62,5
<i>C. neoformans</i> 3	62,5	62,5
<i>C. neoformans</i> 4	62,5	62,5
<i>C. neoformans</i> 6	62,5	62,5
<i>C. neoformans</i> ATCC 208821	31,25	31,25
<i>C. gattii</i> 1	15,62	15,62
<i>C. gattii</i> ATCC 56990	15,62	15,62

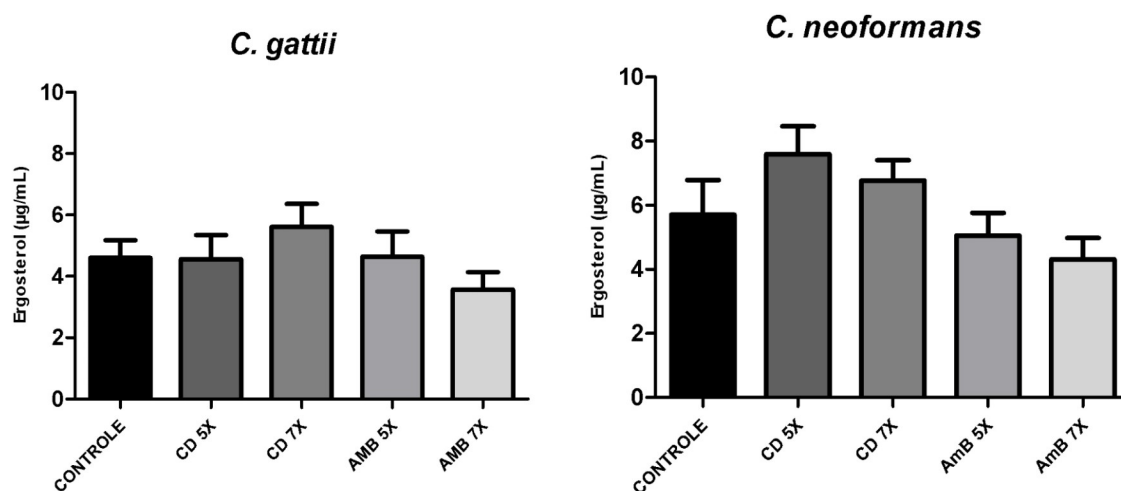
Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima; CFM: Concentração Fungicida Mínima.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.1.2 Ensaio de quantificação de ergosterol

Foi realizado o ensaio de quantificação do ergosterol visando determinar a ação do cloridrato de duloxetina na membrana celular fúngica. As amostras das cepas cultivadas *C. neoformans* ATCC 208821 e *C. gattii* ATCC 56990 foram avaliadas após tratamento com cloridrato de duloxetina (5 x CIM e 7 X CIM) e comparadas com os resultados obtidos com o grupo que recebeu tratamento com anfotericina B (5 x CIM e 7 x CIM), bem como com o grupo que não recebeu tratamento (Figura 2).

Figura 2 – Quantificação do ergosterol após tratamento de *C. gattii* e *C. neoformans* com o cloridrato de duloxetine e a anfotericina B



Legenda: *C. gattii* – CD: Cloridrato de Duloxetine 5 x CIM (78,1 µg/mL), 7 x CIM (109,34 µg/mL); AmB: Anfotericina B 5 x CIM (2,5 µg/mL), 7 x CIM (3,5 µg/mL). *C. neoformans* – CD: Cloridrato de Duloxetine 5 x CIM (156,2 µg/mL), 7 x CIM (218,7 µg/mL); AmB: Anfotericina B 5 x CIM (2,5 µg/mL), 7 x CIM (3,5 µg/mL). Não houve 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.

Em relação à ação do cloridrato de duloxetine sobre o conteúdo do ergosterol, principal esterol da membrana fúngica, foi observado que o tratamento de *C. gattii* e *C. neoformans* com esse fármaco aumentou o conteúdo de ergosterol quando comparado com controle sem tratamento. Por outro lado, o tratamento com anfotericina B manteve níveis semelhantes ao controle ou um pouco abaixo do controle. Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas em nenhum dos tratamentos avaliados.

5.1.3 Avaliação do efeito sinérgico do cloridrato de duloxetina em associação ao antifúngico anfotericina B *in vitro* pela técnica do tabuleiro de xadrez.

A avaliação do efeito sinérgico do fármaco cloridrato de duloxetina com a anfotericina B, apresentou 01 combinação sinérgica (0,78 µg/mL de cloridrato de duloxetina e 0,124 µg/mL de anfotericina B), reduzindo o valor da CIM em 4 vezes tanto para cloridrato de duloxetina quanto para anfotericina B. Além disso, sete outras combinações apresentaram valores aditivos nos experimentos com *C. neoformans* (como pode ser observado na Tabela 1). Em relação a avaliação do efeito combinatório entre cloridrato de duloxetina e anfotericina B para *C. gattii*, todas as concentrações avaliadas resultaram em resultados de classificação indiferente.

Tabela 1 – Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) do cloridrato de duloxetina e anfotericina B em combinação contra *C. neoformans* ATCC 208821

Valores de CIM (µg/mL)		Concentrações aditivas/sinérgicas encontradas (µg/mL)		Valores de ICIF	Redução da concentração em comparação com a CIM	
CD	AmB	CD	AmB		CD	AmB
31,25	0,5	15,62	0,25	0,99984 (Aditivo)	2 x	2 x
31,25	0,5	7,81	0,25	0,74992 (Aditivo)	4 x	2 x
31,25	0,5	15,62	0,125	0,74984 (Aditivo)	2 x	4 x
31,25	0,5	3,9	0,25	0,6248 (Aditivo)	8 x	2 x
31,25	0,5	1,95	0,25	0,5624 (Aditivo)	16 x	2 x
31,25	0,5	0,97	0,25	0,53104 (Aditivo)	32 x	2 x
31,25	0,5	7,81	0,125	0,49992 (Sinérgico)	4 x	4 x

Legenda: CD: Cloridrato de Duloxetina; AmB: Anfotericina B; CIM: Concentração Inibitória Mínima; ICIF: Índice de concentração fracionária inibitória.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.1.4 Avaliação da ação isolada do cloridrato de duloxetina em biofilme de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.

Após formação do biofilme, o tratamento foi realizado utilizando 10 x e 20 x o CIM encontrado do cloridrato de duloxetina para cada microrganismo (*C. neoformans* ATCC 208821 e *C. gattii* ATCC 56990) e 5 x e 10 x do CIM estabelecido para o fármaco anfotericina B. Os valores utilizados podem ser visualizados no Quadro 5 abaixo.

Quadro 5 – Valores dos fármacos ($\mu\text{g/mL}$) utilizados para tratamento do Biofilme

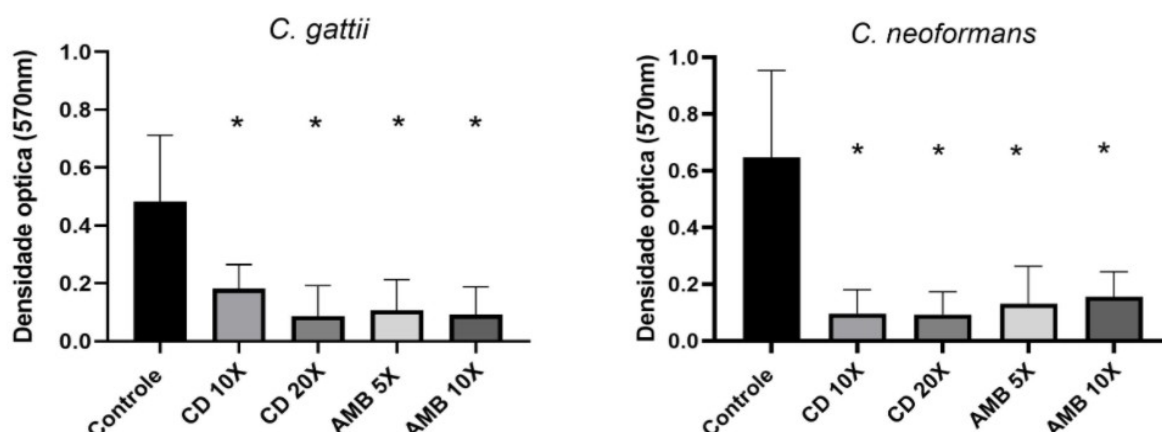
Microrganismo	Cloridrato de Duloxetina			Anfotericina B		
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	10 x CIM ($\mu\text{g/mL}$)	20 x CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	5 x CIM ($\mu\text{g/mL}$)	10 x CIM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>C. neoformans</i> ATCC 208821	31,25	312,5	625	0,5	2,5	5
<i>C. gattii</i> ATCC 56990	15,62	156,2	312,4	0,5	2,5	5

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nos ensaios com o fármaco cloridrato de duloxetina nas concentrações equivalentes de 10 x CIM e 20 x CIM, houve redução significativa da biomassa em relação ao controle sem tratamento ($p < 0,05$) para ambos os microrganismos, como pode ser observado na Figura 3 e Tabela 2 abaixo.

Figura 3 – Quantificação da biomassa por cristal violeta após tratamento do biofilme de *C. gattii* e *C. neoformans* com o cloridrato de duloxetina e a AmB



Legenda: *C. gattii* – CD: Cloridrato de Duloxetina 10 x CIM (156,2 µg/mL), 20 x CIM (312,4 µg/mL); AmB: Anfotericina B 5 x CIM (2,5 µg/mL), 10 x CIM (5 µg/mL). *C. neoformans* – CD: Cloridrato de Duloxetina 10 x CIM (312,5 µg/mL), 20 x CIM (625 µg/mL); AmB: Anfotericina B 5 x CIM (2,5 µg/mL), 10 x CIM (5 µg/mL). 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.

Tabela 2 – Análise de redução da biomassa por cristal violeta após tratamentos com os fármacos isolados com base no valor de CIM

<i>C. gattii</i>		<i>C. neoformans</i>	
Fármaco	Redução em comparação ao controle	Fármaco	Redução em comparação ao controle
Controle	-	Controle	-
CD 10 x	2,64 vezes (62,25%)	CD 10 x	6,7 vezes (85,17%)
CD 20 x	5,6 vezes (82,16%)	CD 20 x	6,9 vezes (85,63%)
AmB 5 x	4,54 vezes (78,04%)	AmB 5 x	5,0 vezes (80%)
AmB 10 x	5,30 vezes (81,13%)	AmB 10 x	4,0 vezes (76,1%)

Legenda: *C. gattii* – CD: Cloridrato de Duloxetina 10 x CIM (156,2 µg/mL), 20 x CIM (312,4 µg/mL); AmB: Anfotericina B 5 x CIM (2,5 µg/mL), 10 x CIM (5 µg/mL). *C. neoformans* – CD: Cloridrato de Duloxetina 10 x CIM (312,5 µg/mL), 20 x CIM (625 µg/mL); AmB: Anfotericina B 5 x CIM (2,5 µg/mL), 10 x CIM (5 µg/mL). Fonte: Elaborado pela autora.

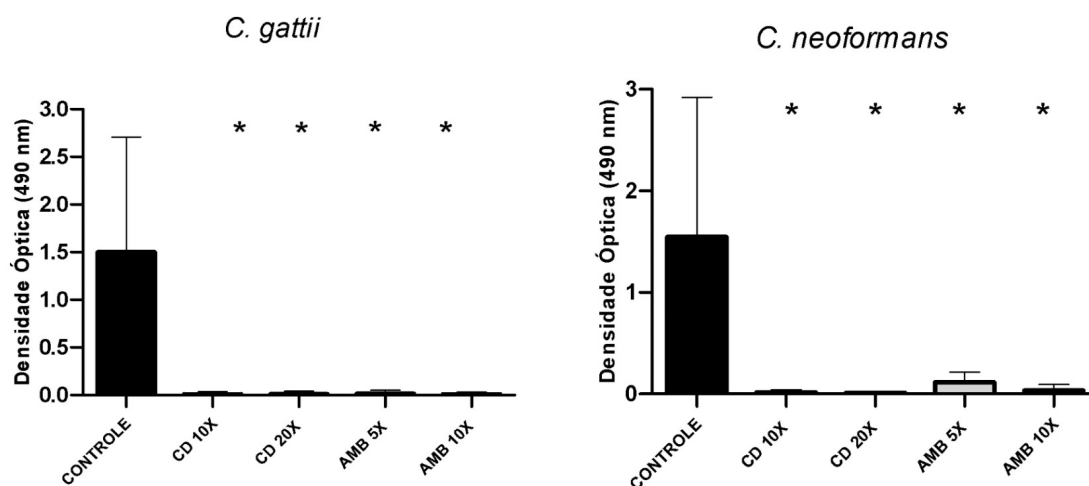
As concentrações de 10 x CIM e 20 x CIM do cloridrato de duloxetina para o microrganismo *C. gattii* apresentaram reduções da biomassa equivalentes a 62,25% ($p=0,0076$) e 82,16% ($p=0,0001$) respectivamente. Com relação ao tratamento com o antifúngico tradicional, anfotericina B, este alcançou uma redução em 78,04% ($p=0,0001$) na concentração de 5 x CIM e 81,13% ($p=0,0001$) na concentração de 10 x CIM. A comparação foi realizada com o grupo controle que não recebeu tratamento.

Tratando-se da espécie *C. neoformans*, as concentrações de 10 x CIM e 20 x CIM do cloridrato de duloxetina apresentaram reduções da biomassa equivalentes a 85,17% ($p=0,0001$) e 85,63% ($p=0,0001$) respectivamente. Com relação ao tratamento com o antifúngico tradicional, anfotericina B, este alcançou uma redução em 80% ($p=0,0007$) na concentração de 5 x CIM e 76,1% na concentração de 10 x CIM. A comparação foi realizada com o grupo controle que não recebeu tratamento.

5.1.5 Quantificação do efeito do cloridrato de duloxetina na atividade metabólica do biofilme de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.

Após os resultados da quantificação da biomassa por cristal violeta após tratamento do biofilme de *C. gattii* e *C. neoformans* com o cloridrato de duloxetina e a anfotericina B, foi investigado também seu efeito sobre a atividade metabólica do biofilme usando o ensaio XTT, conforme Figura 4 e Tabela 3.

Figura 4 – Efeito do cloridrato de duloxetina na atividade metabólica do biofilme de *C. neoformans* e *C. gattii*.



Legenda: *C. gattii* – CD: Cloridrato de Duloxetina 10 x CIM (156,2 µg/mL), 20 x CIM (312,4 µg/mL); AmB: Anfotericina B 5 x CIM (2,5 µg/mL), 10 x CIM (5 µg/mL). *C. neoformans* – CD: Cloridrato de Duloxetina 10 x CIM (312,5 µg/mL), 20 x CIM (625 µg/mL); AmB: Anfotericina B 5 x CIM (2,5 µg/mL), 10 x CIM (5 µg/mL). 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.

Tabela 3 – Análise da atividade metabólica do biofilme de *C. neoformans* e *C. gattii* após tratamento com o cloridrato de duloxetina

<i>C. gattii</i>		<i>C. neoformans</i>	
Fármaco	Redução em comparação ao controle	Fármaco	Redução em comparação ao controle
Controle	-	Controle	-
CD 10 x	99,6%	CD 10 x	98,9%
CD 20 x	99,2%	CD 20 x	99,5%
AmB 5 x	98,9%	AmB 5 x	89,9%
AmB 10 x	99,4%	AmB 10 x	97,8%

Legenda: *C. gattii* – CD: Cloridrato de Duloxetina 10 x CIM (156,2 µg/mL), 20 x CIM (312,4 µg/mL); AmB: Anfotericina B 5 x CIM (2,5 µg/mL), 10 x CIM (5 µg/mL). *C. neoformans* – CD: Cloridrato de Duloxetina 10 x CIM (312,5 µg/mL), 20 x CIM (625 µg/mL); AmB: Anfotericina B 5 x CIM (2,5 µg/mL), 10 x CIM (5 µg/mL). Fonte: Elaborado pela autora.

As concentrações de 10 x CIM e 20 x CIM do cloridrato de duloxetina para o microrganismo *C. gattii* apresentaram reduções na atividade metabólica após tratamento com cloridrato de duloxetina de 99,6% ($p=0,0001$) e 99,2% ($p=0,0001$) respectivamente. Com relação ao tratamento com o antifúngico tradicional, anfotericina B, este alcançou uma redução de 98,9% ($p=0,0002$) na concentração de 5 x CIM e 99,4% ($p=0,0001$) na concentração de 10 x CIM. A comparação foi realizada com o grupo controle que não recebeu tratamento.

Tratando-se da espécie *C. neoformans*, as concentrações de 10 x CIM e 20 x CIM do cloridrato de duloxetina apresentaram reduções da atividade metabólica após tratamento com cloridrato de duloxetina equivalente a 98,9% ($p=0,0001$) e 99,5% ($p=0,0001$) respectivamente. Com relação ao tratamento com o antifúngico tradicional, anfotericina B, este alcançou uma redução em 89,9% ($p=0,0001$) na concentração de 5 x CIM e 97,8% na concentração de 10 x CIM. A comparação foi realizada com o grupo controle que não recebeu tratamento.

5.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

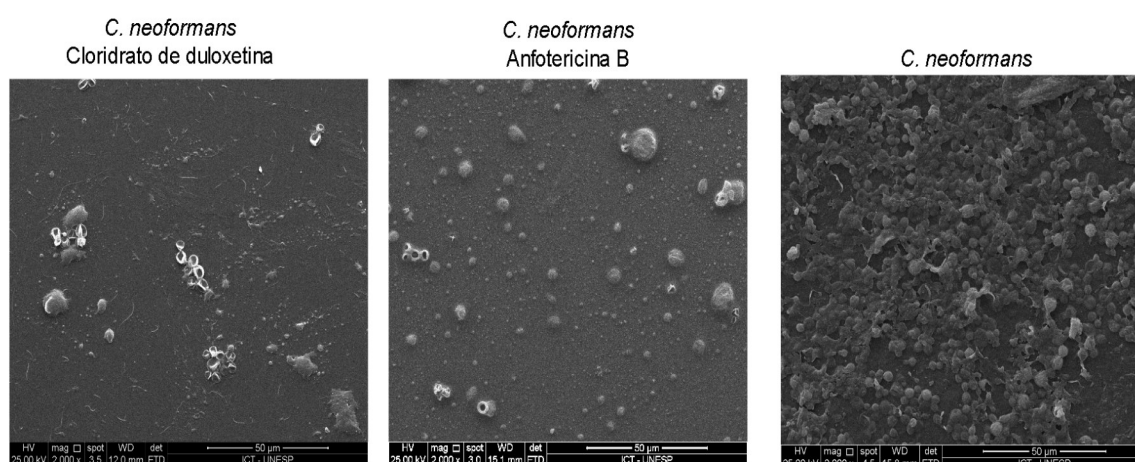
Após a observação da atividade do cloridrato de duloxetina contra biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii*, o efeito do tratamento na constituição do biofilme de *C. neoformans* foi visualizado por MEV.

Uma redução drástica do biofilme foi aparente ao comparar o grupo controle, *C. neoformans* não tratado, com os respectivos grupos submetidos ao tratamento: cloridrato de duloxetina 10 x CIM (312,5 µg/mL) e anfotericina B 5 x CIM (2,5 µg/mL).

Esses dados corroboraram com os resultados dos ensaios de mensuração da biomassa dos biofilmes por cristal violeta e da atividade metabólica dos biofilmes a partir do ensaio de redução de XTT. Os grupos tratados com os fármacos

demonstraram um biofilme desestruturado, com menor quantidade de microrganismos e menor densidade, conforme pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilme de *C. neoformans* (aumento de 2.000x)



Legenda: Imagens no aumento de 2 Kx. *C. neoformans* – CD: Cloridrato de Duloxetina 10 x CIM (312,5 µg/mL); *C. neoformans* – AmB: Anfotericina B 5 x CIM (2,5 µg/mL); Grupo Controle sem tratamento.

Fonte: Elaborado pela autora.

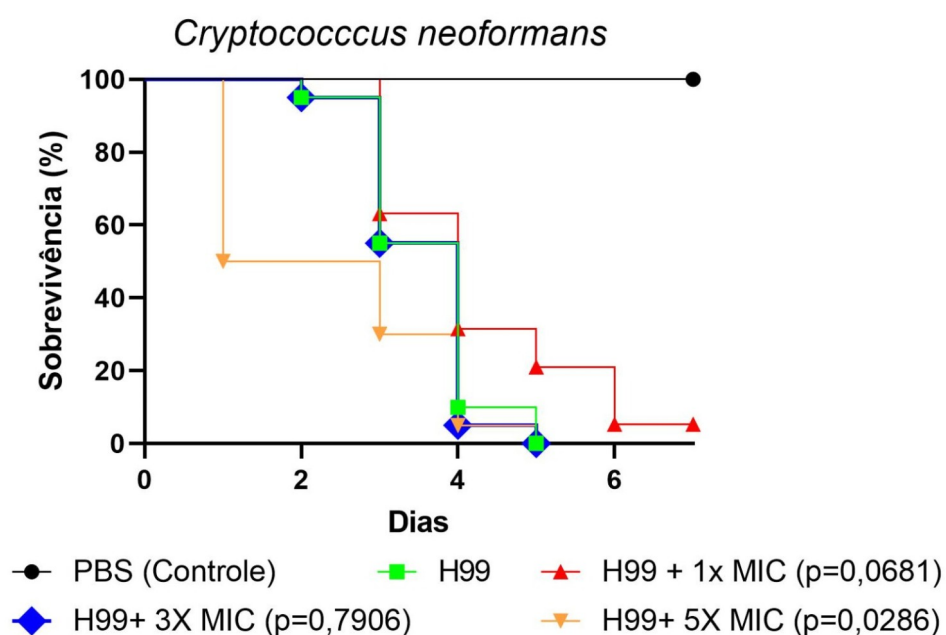
5.2 Avaliação do cloridrato de duloxetina *in vivo*

5.2.1 Avaliação da ação antifúngica do cloridrato de duloxetina em modelo experimental *Galleria mellonella*

Nesse ensaio foram avaliadas as doses de 3,125 mg/larva, 9,375 mg/larva e 15,625 mg/larva do cloridrato de duloxetina, os valores são respectivamente 1 x

CIM, 3 x CIM, 5 x CIM transformados em doses por larvas. Os resultados demonstraram toxicidade na dose de 5 x CIM (15,625 mg/larva) com a ocorrência da morte de larvas em tempo inferior quando comparado ao grupo inoculado com *C. neoformans* que não recebeu tratamento. Na concentração de 1 x CIM (3,125 mg/larva) foi observado aumento da sobrevivência das larvas, apesar de não apresentar significância estatística colocar valor de p. (Figura 6).

Figura 6 – Representação gráfica do ensaio de eficácia antifúngica do cloridrato de duloxetine em *Galleria mellonella*



Legenda: Cloridrato de Duloxetine – 1 x CIM (3,125 mg/larva), 3 x CIM (9,375 mg/larva), 5 x CIM (15,625 mg/larva). Na concentração de 15,625 mg/larva foi observado significância estatística em relação ao controle sem tratamento. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o teste de Log-rank (Mantel-Cox).

Fonte: Elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

Milhões de pessoas são infectadas com fungos anualmente, grande parte está relacionada a infecções superficiais que acometem principalmente a pele e mucosas, e apesar de não se caracterizarem como uma ameaça a vida, prejudicam a qualidade de vida dos pacientes e podem em situações oportunas espalhar-se, causando quadros clínicos graves e debilitantes (Sousa F et al., 2020; Aguiar et al., 2022).

Estima-se que 1,5 milhão dessas infecções são infecções fúngicas invasivas, com acometimento dos órgãos internos, corrente sanguínea, pulmão, fígado, rins, sistema nervoso central, exigindo hospitalização, celeridade no diagnóstico e terapêutica bem direcionada e eficaz. Esse tipo de infecção é um grande desafio, apresentando altas taxas de mortalidade e grandes custos para o sistema de saúde (Sousa F et al., 2020; Cui et al., 2022).

O tratamento das infecções fúngicas por *Cryptococcus* spp., especialmente nos casos de meningite cryptocócica, inclui anfotericina B (desoxicolato ou lipossomal), flucitosina e fluconazol, esses compostos apresentam vantagens e desvantagens no âmbito do seu espectro de ação, interações medicamentosas, farmacocinética e farmacodinâmica, mecanismos de resistência e toxicidade (Sousa F et al., 2020; Donlin, Meyers, 2022).

Com a limitação das drogas antifúngicas utilizadas nos tratamentos atuais, cada vez mais pesquisas estão sendo realizadas, com o objetivo de desenvolver novas técnicas e insumos para a terapia das infecções fúngicas por *Cryptococcus* spp. e contornar a problemática referente ao crescente desenvolvimento de resistência por parte desse microrganismo e elevada toxicidade da terapia clássica (Aguiar et al., 2022; Kim et al., 2022).

Dentre as alternativas terapêuticas investigadas, pesquisas envolvendo o reposicionamento de fármacos ganhou notoriedade nos últimos anos, pois permite a economia de tempo e redução de custos, uma vez que fármacos com mecanismos de ação, alvos moleculares e dados de toxicidade já conhecidos, comercializados e utilizados na prática clínica para determinadas doenças, são testados para avaliação de uma possível atividade antifúngica (Peyclit et al., 2021; Breuer et al., 2022; Kim et al., 2022).

Dentro desse contexto e com base em pesquisas já desenvolvidas, a classe dos inibidores seletivos de recaptação de serotonina, como cloridrato de sertralina, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina, assim como inibidores seletivos de recaptação de serotonina e norepinefrina, como o cloridrato de duloxetina, dentre outras drogas utilizadas em quadros psiquiátricos, têm sido considerados fármacos promissores (Dolan et al., 2009; Bouz, Doležal, 2021; Breuer et al., 2022).

Cloridrato de sertralina é um dos antidepressivos mais comumente prescrito na clínica. Villanueva-Lozano et al. (2020), demonstraram que esse composto apresentou importante ação fungicida contra patógenos fúngicos emergentes (*Lomentospora prolificans*, *Scedosporium* spp., *Fusarium* spp., *Paecilomyces* spp., *Alternaria* spp. e *Curvularia* spp.) com concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima na faixa de 8–32 µg/mL (Villanueva-Lozano et al., 2020).

Estudos *in vitro*, Zhai et al. (2012) e Peyclit et al. (2021), também demonstraram ação fungicida de cloridrato de sertralina contra algumas espécies dos principais patógenos responsáveis por infecções invasivas, como *Aspergillus* e *Candida*, com CIMs variando de 7 a 256 µg/mL (Zhai et al., 2012; Peyclit et al., 2021).

Quanto a infecções por espécies de *Cryptococcus* spp., cloridrato de sertralina, droga neurotrópica e que, portanto, atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, apresentou ação fungicida particularmente potente, com CIMs inferiores a 10 µg/mL (Zhai et al., 2012; Peyclit et al., 2021). De acordo com Treviño-Rangel et al. (2016), esse fármaco é capaz de atingir níveis no sistema nervoso

central 20 a 40 vezes maiores do que aqueles encontrados no plasma sanguíneo após sua administração (Treviño-Rangel et al., 2016).

Nos estudos de Treviño-Rangel et al. (2016), a atividade antifúngica do cloridrato de sertralina também foi avaliada em modelos murinos. Essa abordagem experimental permite reproduzir infecções bastante semelhantes às infecções em humanos, e dessa forma, melhor avaliação da progressão da doença, características de virulência do microrganismo e sinais clínicos de determinadas infecções. Assim como, são especialmente importantes para se avaliar a eficácia de determinados fármacos frente a uma infecção (Treviño-Rangel et al., 2016).

Treviño-Rangel et al. (2016), realizaram o tratamento da infecção criptocócica em murinos utilizando sertralina na dose de 15 mg/kg, o que reduziu a carga fúngica no cérebro e baço com eficácia comparável à do fluconazol, fármaco propriamente antifúngico e pertencente a terapia convencional já utilizada na prática clínica (Treviño-Rangel et al., 2016).

O cloridrato de duloxetina, fármaco também antidepressivo, inibidor seletivo da recaptação de serotonina e noradrenalina, têm recentemente despertado a atenção dos pesquisadores quanto a possível ação antifúngica, apesar de estudos avaliando sua eficácia e mecanismos de ação ainda serem escassos na literatura (Menezes et al., 2022).

Dentro desse contexto, este estudo realizou uma avaliação da atividade antifúngica do fármaco cloridrato de duloxetina através de metodologias que permitiram pontuar o efeito antifúngico da droga em cepas clínicas e padrão de *C. neoformans* e *C. gattii*, bem como sua ação antibiofilme e seu comportamento em modelos de infecção experimental *Galleria mellonella*.

No presente estudo, todas as cepas utilizadas, os cinco isolados clínicos de *C. neoformans* (cepas 1, 2, 3, 4, 6), o isolado clínico de *C. gattii* (cepa 5), as cepas *C. neoformans* ATCC 208821 e *C. gattii* ATCC 56990 apresentaram sensibilidade ao fármaco cloridrato de duloxetina.

Com relação aos resultados referentes as cepas ATCC, o cloridrato de duloxetina apresentou valores de CIM de 15,62 µg/mL para *C. gattii* (ATCC 56990) e 31,25 µg/mL para *C. neoformans* (ATCC 208821), resultado próximo do estudo publicado por Menezes et al. (2022) em que foi verificado valores de CIM e CFM de 18,5 µg/mL para *C. neoformans* (Menezes et al., 2022).

Com base nos resultados dos testes de suscetibilidade antifúngica, citado acima, foi possível identificar a concentração ideal da droga para total inibição do crescimento fúngico (15,62 µg/mL para *C. gattii* ATCC 56990 e 31,25 µg/mL para *C. neoformans* ATCC 208821), sendo esse um fator-chave para o planejamento dos futuros experimentos e melhor delineamento da atividade do fármaco utilizado nos ensaios.

Por conseguinte, com base nos resultados promissores encontrados nos ensaios, prosseguimos para quantificação do ergosterol com o intuito de avaliar uma possível ação do cloridrato de duloxetina na membrana celular fúngica.

No entanto, *C. neoformans* ATCC 208821 e *C. gattii* ATCC 56990, após tratamento com o cloridrato de duloxetina (5 x CIM e 7 X CIM), não apresentaram reduções da síntese de ergosterol. Porém, os resultados sugerem que o tratamento com esse fármaco aumentou o conteúdo de ergosterol quando comparados com o grupo que não recebeu tratamento. Não sendo identificado diferenças estatísticas em nenhum dos tratamentos avaliados.

Com isso, o mecanismo de ação do cloridrato de duloxetina não parece estar relacionado a depleção do ergosterol. Futuros experimentos serão necessários para investigação mais detalhada do mecanismo de ação do cloridrato de duloxetina.

Ainda com base nos valores de CIM encontrados, foi verificado se esse composto apresentava atividade sinérgica com o antifúngico anfotericina B, através da técnica do Tabuleiro de Xadrez, método aceito para investigar interações medicamentosas em doenças infecciosas.

A avaliação do efeito sinérgico do fármaco cloridrato de duloxetine com a anfotericina B, apresentou 01 combinação sinérgica, reduzindo o valor da CIM em 4 vezes tanto para cloridrato de duloxetine quanto para anfotericina B. Todas as outras combinações apresentaram valores aditivos (Aditiva: $0,5 < ICIF \leq 1,0$) nos experimentos com *C. neoformans*, e indiferente (Indiferente: $1,0 < ICIF \leq 4,0$) nos ensaios com *C. gattii*.

De acordo com Nayak e Xu (2010), a importância dessa análise baseia-se no fato de que a associação de fármacos pode produzir combinações mais eficazes com redução significativa de toxicidade, especialmente quando se utiliza na terapêutica a anfotericina B (AmB), já que dessa forma, pode-se reduzir a quantidade total de AmB no tratamento proposto (Nayak, Xu, 2010).

Segundo Liao et al. (2015), a anfotericina B é o mais potente antifúngico utilizado atualmente, e quando administrada em altas concentrações possui ação efetiva contra biofilmes fúngicos, incluído aqueles formados por espécies de *Cryptococcus* spp. No entanto, por ser uma droga altamente tóxica, se torna inviável sua utilização em grandes concentrações e por períodos prolongados, tornando interessante sua associação com outros fármacos (Liao et al., 2015).

Exemplo de uma terapia combinada comumente utilizada na clínica é a associação da anfotericina B com o fluconazol, ainda que, o fluconazol tenha ação fungistática e não fungicida e possua uma menor eficiência para atravessar a barreira hematoencefálica. Conforme Nayak e Xu (2010) a droga apresenta concentração plasmática máxima de aproximadamente 4,92 – 17,6 µg/g no cérebro após uso de cápsula oral de 400 mg (Nayak, Xu, 2010; Krysan, 2015; Alkhalifa et al., 2022).

Em casos de fármacos que apresentam resultados sinérgicos, a ação antifúngica pode ser intensificada pela simples associação dos fármacos quando comparado ao uso da droga nas mesmas concentrações de forma isolada, além de reduzir o desenvolvimento de resistências (Wambaugh et al., 2020).

Estudos *in vitro* avaliando a atividade sinérgica do cloridrato de sertralina com o fluconazol, Nayak e Xu (2010); Zhai et al. (2012) e Treviño-Rangel et al. (2016), demonstraram resultados aditivos ou sinérgicos dessa combinação e que a depuração fúngica do líquido cefalorraquidiano apresentou-se acelerada com relação ao uso de qualquer droga isoladamente nos experimentos em modelos animais (Nayak, Xu, 2010; Zhai et al., 2012; Treviño-Rangel et al., 2016).

Cloridrato de sertralina foi utilizado como adjuvante no tratamento de casos de meningite cryptocócica na África. Esse estudo clínico publicado por Rhein et al. (2016) incluiu 172 pacientes infectados pelo HIV. Foi associado 100 – 400 mg/dia de sertralina à terapia padrão de anfotericina + fluconazol e os resultados demonstraram atividade fungicida precoce com base, dentre outros fatores, na análise da taxa de depuração do LCR – líquido cefalorraquidiano (Rhein et al., 2016).

Fundamentado nos resultados do estudo piloto citado acima, em que se analisou também a segurança, eficácia microbiológica e farmacocinética do cloridrato de sertralina adjuvante, um novo estudo controlado, randomizado de fase III, foi realizado e publicado em 2019. No entanto, nesse ensaio clínico duplo-cego e controlado por placebo, a taxa de eliminação fúngica do líquido cefalorraquidiano foi semelhante entre os grupos (Rhein et al., 2019).

Os estudos apontam como um dos mecanismos de virulência para o comprometimento do organismo hospedeiro e para proteção do *Cryptococcus* spp, quer pela resposta imunológica, bem como, pela ação farmacológica, a capacidade desses microrganismos formarem biofilmes. As células fúngicas pertencentes a biofilmes produzem matriz extracelular polimérica densa que dificulta substancialmente a penetração de fármacos, e dessa forma, interfere no sucesso da terapêutica (Martinez, Casadevall, 2006).

No presente estudo, os ensaios com o fármaco cloridrato de duloxetina, através da técnica com cristal violeta, apresentaram redução significativa da biomassa de *C.*

gattii e *C. neoformans* em relação ao controle sem tratamento ($p < 0,05$). São resultados promissores para futuras pesquisas.

Cloridrato de duloxetina apresentou elevada eficácia antibiofilme. Além disso, nos estudos de Menezes et al. (2022) o cloridrato de duloxetina apresentou atividade antifúngica sinérgica com fluconazol, apresentando 12 concentrações sinérgicas (Menezes et al., 2022).

As concentrações isoladas de 312,4 $\mu\text{g/mL}$ do cloridrato de duloxetina para o microrganismo *C. gattii* apresentaram reduções da biomassa equivalentes a 82,16%. Tratando-se da espécie *C. neoformans*, as concentrações isoladas de 312,5 $\mu\text{g/mL}$ do cloridrato de duloxetina apresentaram reduções da biomassa equivalentes a 85,63% ($p = 0,0001$). Ambos resultados comparados com grupos controles que não receberam tratamento.

Nos estudos publicados por Pereira et al. (2021) foi realizada uma análise da ação de dois fármacos da classe dos inibidores seletivos de recaptação da serotonina, o cloridrato de fluoxetina e o cloridrato de paroxetina, sobre biofilmes de *C. neoformans*. Os experimentos demonstraram que cloridrato de fluoxetina reduziu a biomassa do biofilme de *C. neoformans* em até 36% com concentrações de 19,2 $\mu\text{g/mL}$, apresentando também bons resultados quando combinada à anfotericina B, com redução de 10% na viabilidade do biofilme (Pereira et al., 2021).

O cloridrato de paroxetina, por sua vez, também reduziu a biomassa em até 36%, porém não apresentou resultados estatisticamente significativos com relação redução da viabilidade celular do biofilme. Quando combinada com a anfotericina B (0,12 $\mu\text{g/mL}$) constatou-se redução da biomassa de 27% e viabilidade de 11%. Os autores concluíram que o cloridrato de fluoxetina e o cloridrato de paroxetina apresentaram ação na viabilidade celular do biofilme somente quando combinadas com a Anfotericina B (Pereira et al., 2021).

Os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRSs) também foram testados em diversos estudos com o gênero *Candida* spp. No trabalho realizado por

Oliveira Júnior e Almeida (2018), cloridrato de fluoxetina e cloridrato de sertralina foram analisadas, através dos ensaios de cristal violeta e MTT, quanto a sua capacidade de reduzir a biomassa e prejudicar a viabilidade metabólica do biofilme (Oliveira Júnior, Almeida, 2018).

No trabalho publicado por Oliveira Júnior e Almeida (2018), os melhores resultados demonstraram que cloridrato de fluoxetina, na concentração de 3,9 mg/mL, foi capaz de reduzir significativamente a biomassa do biofilme ($p < 0,05$) em 82% para *C. glabrata* e a viabilidade do biofilme em 96% para *C. krusei*. Enquanto, a sertralina alcançou uma redução de 88% na biomassa do biofilme de *C. glabrata* e 90% na viabilidade do biofilme de *C. parapsilosis* (Oliveira Júnior, Almeida, 2018).

Com relação à viabilidade celular, neste estudo, após tratamento com cloridrato de duloxetina, os biofilmes produzidos pelas cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* apresentaram perfil semelhante. Os resultados do ensaio XTT, que avaliou a atividade metabólica celular pela atividade mitocondrial, demonstrou redução na atividade metabólica de todas as espécies estudadas.

As concentrações de 10 x CIM e 20 x CIM do cloridrato de duloxetina tanto para o microrganismo *C. gattii* quanto para espécie *C. neoformans* apresentaram reduções na atividade metabólica acima de 99% em comparação ao grupo controle que não recebeu tratamento. Portanto, o tratamento com o cloridrato de duloxetina parece resultar em disfunção mitocondrial e toxicidade para *C. neoformans* e *C. gattii*.

Seguindo esta tendência, a análise de microscopia eletrônica de varredura, neste estudo, corrobora com os resultados dos ensaios de mensuração da biomassa dos biofilmes por cristal violeta e da atividade metabólica dos biofilmes a partir do ensaio de redução de XTT, já que as imagens de *C. neoformans* apresentaram eliminação e desagregação da constituição dos biofilmes submetidos a tratamentos com o cloridrato de duloxetina.

Estudos como o de Martinez e Casadevall (2007), apontam relatos da formação de biofilmes por *C. neoformans* em placas de poliestireno e dispositivos médicos protéticos, incluindo cateteres de derivação ventriculoatrial, configurando-se como um grande desafio para saúde pública. Citam ainda, que a formação do biofilme impede a penetração eficiente de drogas antifúngicas, conferindo maior resistência do que seus homólogos planctônicos (Martinez, Casadevall, 2006).

Benaducci et al. (2016) realizaram um estudo comparando a virulência de células planctônicas e de biofilme de *C. neoformans* e *C. gattii* no modelo *Galleria mellonella* (Benaducci et al., 2016).

No estudo supracitado, após 04 dias de infecção, as larvas infectadas com células dos biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii* morreram, ao passo que, 30% das larvas infectadas com células planctônicas de *C. neoformans* e 80% das larvas infectadas com *C. gattii* ainda se apresentavam vivas. No final de 7 dias, algumas larvas infectadas com células planctônicas ainda estavam vivas, não atingindo 100% de mortalidade em nenhuma das cepas testadas (Benaducci et al., 2016).

Em 2021, Pereira et al. confirmaram que os fármacos, cloridrato de verapamil, cloridrato de fluoxetina e cloridrato de paroxetina, inibidores seletivos de recaptação da serotonina, apesar de não terem apresentado toxicidade também não aumentaram a sobrevivência das larvas infectadas com *C. neoformans*, tanto nos ensaios com os fármacos isolados quanto em combinações sinérgicas com a anfotericina B (Pereira et al., 2021).

Os autores justificaram seus resultados descrevendo que à característica desses fármacos, de serem altamente lipossolúveis, faz com que esses compostos fiquem armazenados no tecido adiposo das larvas de *Galleria mellonella* e sejam liberados lentamente na hemolinfa, isso interfere no tempo de absorção da droga e sua concentração e distribuição no invertebrado, consequentemente prejudica a ação do fármaco para eliminação das leveduras (Pereira et al., 2021).

O cloridrato de duloxetina, possui mecanismo de ação semelhante, é um fármaco da classe dos inibidores seletivos de recaptação da serotonina e noradrenalina, uma droga lipossolúvel.

Nos ensaios realizados nesse estudo, os resultados encontrados demonstraram que, em baixas concentrações 3,125 mg/larva (1 x CIM), apesar de não apresentarem significância estatística, foi observado aumento da sobrevivência das larvas e em concentrações maiores, os resultados demonstraram toxicidade na dose de 5 x CIM (15,625 mg/larva) com a ocorrência da morte de larvas em tempo inferior quando comparado ao grupo inoculado com *C. neoformans* que não recebeu tratamento.

Nos estudos realizados por Menezes et al. (2022), o tratamento com cloridrato de duloxetina isolado e em combinações sinérgicas, também não aumentou a sobrevivência das larvas infectadas com *C. neoformans* (Menezes et al., 2022).

Assim, o presente estudo investigou a efetividade antifúngica do cloridrato de duloxetina. Os ensaios validaram a hipótese de que o cloridrato de duloxetina apresenta ação antifúngica e antibiofilme *in vitro* frente a cepas clínicas e cepas padrões de *C. neoformans* e *C. gattii*.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos nesse estudo é possível concluir:

- a) cloridrato de duloxetina foi ativo frente a todas as cepas utilizadas, os cinco isolados clínicos de *C. neoformans* (cepas 1, 2, 3, 4, 6), o isolado clínico de *C. gattii* (cepa 5), as cepas *C. neoformans* ATCC 208821 e *C. gattii* ATCC 56990, apresentando valor da CIM e CFM nas faixas de 15,62 – 62,5 µg/mL;
- b) cloridrato de duloxetina não promoveu redução na quantidade de ergosterol presente na membrana de *C. gattii* ATCC e *C. neoformans* ATCC;
- c) o efeito sinérgico do cloridrato de duloxetina com a anfotericina B, apresentou 01 combinação sinérgica, reduzindo o valor da CIM em 4 vezes tanto para cloridrato de duloxetina quanto para anfotericina B. Para *C. gattii* o resultado das combinações foi indiferente.
- d) cloridrato de duloxetina apresentou redução significativa da biomassa (acima de 80%) e da atividade metabólica (acima de 99%) de *C. gattii* e *C. neoformans* em relação ao controle sem tratamento ($p < 0,05$);
- e) em relação ao modelo *in vivo*, *Galleria mellonella*, foi observado que o tratamento com o cloridrato de duloxetina na dose de 1 x CIM (3,125 mg/larva) aumentou o tempo de sobrevivência das larvas infectadas em 02 dias quando comparado ao grupo controle sem tratamento.

REFERÊNCIAS

- Aguiar TKB, Neto NAS, Freitas CDT, Silva AFB, Bezerra LP, Malveira EA, et al. Antifungal potential of synthetic peptides against *Cryptococcus neoformans*: mechanism of action studies reveal synthetic peptides induce membrane-pore Formation, DNA degradation, and apoptosis. *Pharmaceutics*. 2022 Aug 12;14(8):1678. doi: 10.3390/pharmaceutics14081678. PMID: 36015304; PMCID: PMC9416200.
- Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi a review. *Med Mycol*. 2012 May;50(4):337-45. doi: 10.3109/13693786.2011.652201. Epub 2012 Jan 24. PMID: 22268493; PMCID: PMC4294699.
- Albuquerque P, Nicola AM, Nieves E, Paes HC, Williamson PR, Silva-Pereira I, et al. Quorum sensing-mediated, cell density dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *mBio*. 2013 Dec 31;5(1):e00986-13. doi: 10.1128/mBio.00986-13. PMID: 24381301; PMCID: PMC3884061.
- Alkhalifa BA, Bulatova NR, abuRokba W, Darwish RM. Serotonin reuptake inhibitors effect on fluconazole activity against resistant *Candida glabrata* strains. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022 Jun;29:49-54. doi: 10.1016/j.jgar.2022.01.030. Epub 2022 Feb 16. PMID: 35181564.
- Alspaugh JA. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Fungal Genet Biol*. 2015 May;78:55-8. doi: 10.1016/j.fgb.2014.09.004. Epub 2014 Sep 23. PMID: 25256589; PMCID: PMC4370805.
- Antachopoulos C, Walsh TJ. Immunotherapy of *Cryptococcus* infections. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Feb;18(2):126-33. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03741.x. PMID: 22264261.
- Atim PB, Meya DB, Gerlach ES, Muhanguzi D, Male A, Kanamwanji B, et al. Lack of association between fluconazole susceptibility and *ERG11* nucleotide polymorphisms in *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from Uganda. *J Fungi (Basel)*. 2022 May 15;8(5):508. doi: 10.3390/jof8050508. PMID: 35628763; PMCID: PMC9145384.
- Azevedo MM, Teixeira-Santos R, Silva AP, Cruz L, Ricardo E, Pina-Vaz C, et al. The effect of antibacterial and non-antibacterial compounds alone or associated with

antifungals upon fungi. *Front Microbiol.* 2015 Jul 3;6:669. doi: 10.3389/fmicb.2015.00669. PMID: 26191055; PMCID: PMC4490243.

Badiee P, Hashemizadeh Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. *Indian J Med Res.* 2014 Feb;139(2):195-204. PMID: 24718393; PMCID: PMC4001330.

Baker RP, Chrissian C, Stark RE, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* melanization incorporates multiple catecholamines to produce polytypic melanin. *J Biol Chem.* 2022 Jan;298(1):101519. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101519. Epub 2021 Dec 20. PMID: 34942148; PMCID: PMC8760516.

Barbarossa A, Rosato A, Corbo F, Clodoveo ML, Fracchiolla G, Carrieri A, et al. Non-antibiotic drug repositioning as an alternative antimicrobial approach. *Antibiotics (Basel).* 2022 Jun 17;11(6):816. doi: 10.3390/antibiotics11060816. PMID: 35740222; PMCID: PMC9220406.

Barchiesi F, Schimizzi AM, Caselli F, Novelli A, Fallani S, Giannini D, et al. Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Sep;44(9):2435-41. doi: 10.1128/AAC.44.9.2435-2441.2000. PMID: 10952592; PMCID: PMC90082.

Barchiesi F, Spreghini E, Schimizzi AM, Maracci M, Giannini D, Carle F, et al. Posaconazole and amphotericin B combination therapy against *Cryptococcus neoformans* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Sep;48(9):3312-6. doi: 10.1128/AAC.48.9.3312-3316.2004. PMID: 15328090; PMCID: PMC514762.

Bassler BL. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol.* 1999 Dec;2(6):582-7. doi: 10.1016/s1369-5274(99)00025-9. PMID: 10607620.

Baym M, Stone LK, Kishony R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. *Science.* 2016 Jan 1;351(6268):aad3292. doi: 10.1126/science.aad3292. PMID: 26722002; PMCID: PMC5496981.

Benaducci T, Sardi Jde C, Lourencetti NM, Scorzoni L, Gullo FP, Rossi SA, et al. Virulence of *Cryptococcus* sp. biofilms *in vitro* and *in vivo* using *Galleria mellonella* as an alternative model. *Front Microbiol.* 2016 Mar 9;7:290. doi: 10.3389/fmicb.2016.00290. PMID: 27014214; PMCID: PMC4783715.

Bermas A, Geddes-McAlister J. Combatting the evolution of antifungal resistance in *Cryptococcus neoformans*. Mol Microbiol. 2020 Nov;114(5):721-734. doi: 10.1111/mmi.14565. Epub 2020 Jul 22. PMID: 32697029.

Binder U, Lass-Flörl C. Epidemiology of invasive fungal infections in the mediterranean area. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2011;3(1):e20110016. doi: 10.4084/mjhid.2011.0016. Epub 2011 Mar 31. PMID: 21625305; PMCID: PMC3103242.

Boekhout T, Van Belkum A, Leenders ACAP, Verbrugh HA, Mukamurangwa P, Swinne D, et al. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: Taxonomic and epidemiological aspects. Int J Syst Bacteriol. 1997;47(2):432–42. doi: 10.1099/00207713-47-2-432. PMID: 9103633.

Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. J Fungi (Basel). 2017 Oct 18;3(4):57. doi: 10.3390/jof3040057. PMID: 29371573; PMCID: PMC5753159.

Bosco-Borgeat ME, Mazza M, Taverna CG, Córdoba S, Murisengo OA, Vivot W, et al. Amino acid substitution in *Cryptococcus neoformans* lanosterol 14- α -demethylase involved in fluconazole resistance in clinical isolates. Rev Argent Microbiol. 2016 Apr-Jun;48(2):137-42. doi: 10.1016/j.ram.2016.03.003. Epub 2016 Jun 14. PMID: 27311753.

Bose I, Reese AJ, Ory JJ, Janbon G, Doering TL. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. Eukaryot Cell. 2003;2(4):655–63. doi: 10.1128/EC.2.4.655-663.2003. PMID: 12912884.

Botts MR, Hull CM. Dueling in the lung: how *Cryptococcus* spores race the host for survival. Curr Opin Microbiol. 2010 Aug;13(4):437-42. doi: 10.1016/j.mib.2010.05.003. PMID: 20570552; PMCID: PMC2920366.

Bouz G, Doležal M. Advances in antifungal drug development: An up-to-date mini review. Pharmaceuticals (Basel). 2021 Dec 16;14(12):1312. doi: 10.3390/ph14121312. PMID: 34959712; PMCID: PMC8706862.

Buchanan KL, Murphy JW. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? Emerg Infect Dis. 1998 Jan-Mar;4(1):71-83. doi: 10.3201/eid0401.980109. PMID: 9452400; PMCID: PMC2627665

Burgess TB, Condliffe AM, Elks PM. A fun-guide to innate immune responses to fungal infections. *J Fungi (Basel)*. 2022 Jul 29;8(8):805. doi: 10.3390/jof8080805. PMID: 36012793; PMCID: PMC9409918.

Butts A, Krysan DJ. Antifungal drug discovery: something old and something new. *PLoS Pathog*. 2012 Sep;8(9):e1002870. doi: 10.1371/journal.ppat.1002870. Epub 2012 Sep 6. PMID: 22969422; PMCID: PMC3435257.

Breuer MR, Dasgupta A, Vasselli JG, Lin X, Shaw BD, Sachs MS. The antidepressant sertraline induces the formation of supersized lipid droplets in the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *J Fungi (Basel)*. 2022 Jun 17;8(6):642. doi: 10.3390/jof8060642. PMID: 35736125; PMCID: PMC9224953.

Byrnes EJ 3rd, Bartlett KH, Perfect JR, Heitman J. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. *Microbes Infect*. 2011 Oct;13(11):895-907. doi: 10.1016/j.micinf.2011.05.009. Epub 2011 Jun 1. PMID: 21684347; PMCID: PMC3318971.

Campbell LT, Fraser JA, Nichols CB, Dietrich FS, Carter D, Heitman J. Clinical and environmental isolates of *Cryptococcus gattii* from Australia that retain sexual fecundity. *Eukaryot Cell*. 2005 Aug;4(8):1410-9. doi: 10.1128/EC.4.8.1410-1419.2005. PMID: 16087746; PMCID: PMC1214531.

Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Apr;22(2):291-321, Table of Contents. doi: 10.1128/CMR.00051-08. PMID: 19366916; PMCID: PMC2668233.

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 Ciência e Tecnologia; 2021.

Carmo FN do, 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. *Braz J Microbiol*. 2022 Sep;53(3):1321-1337. doi: 10.1007/s42770-022-00744-y. Epub 2022 Apr 29. PMID: 35486354; PMCID: PMC9433474.

Chastain DB, Rao A, Yaseyyedi A, Henao-Martínez AF, Borges T, Franco-Paredes C. Cerebral Cryptococcomas: A systematic scoping review of available evidence to

facilitate diagnosis and treatment. *Pathogens*. 2022 Feb 3;11(2):205. doi: 10.3390/pathogens11020205. PMID: 35215148; PMCID: PMC8879191.

Cheong JW, McCormack J. Fluconazole resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic? *Med Mycol*. 2013 Apr;51(3):261-9. doi: 10.3109/13693786.2012.715763. Epub 2012 Sep 19. PMID: 22989195.

Chen SC, Meyer W, Sorrell TC. *Cryptococcus gattii* infections. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Oct;27(4):980-1024. doi: 10.1128/CMR.00126-13. PMID: 25278580; PMCID: PMC4187630.

Chen X, Ren B, Chen M, Liu MX, Ren W, Wang QX, et al. ASDCD: antifungal synergistic drug combination database. *PLoS One*. 2014 Jan 24;9(1):e86499. doi: 10.1371/journal.pone.0086499. PMID: 24475134; PMCID: PMC3901703.

Chen YC, Kuo SF, Lin SY, Lin YS, Lee CH. Epidemiological and clinical characteristics, antifungal susceptibility, and MLST-based genetic analysis of *Cryptococcus* isolates in Southern Taiwan in 2013-2020. *J Fungi (Basel)*. 2022 Mar 11;8(3):287. doi: 10.3390/jof8030287. PMID: 35330289; PMCID: PMC8951076.

Costa-Orlandi CB, Sardi JCO, Pitangui NS, de Oliveira HC, Scorzoni L, Galeane MC, et al. Fungal biofilms and polymicrobial diseases. *J Fungi (Basel)*. 2017 May 10;3(2):22. doi: 10.3390/jof3020022. PMID: 29371540; PMCID: PMC5715925.

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. PMID: 28411060.

Cowen LE, Steinbach WJ. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryot Cell*. 2008 May;7(5):747-64. doi: 10.1128/EC.00041-08. Epub 2008 Mar 28. PMID: 18375617; PMCID: PMC2394973.

Cox GM, McDade HC, Chen SC, Tucker SC, Gottfredsson M, Wright LC et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*. 2001 Jan;39(1):166-75. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02236.x. PMID: 11123698.

Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun*. 2000 Feb;68(2):443-8. doi: 10.1128/IAI.68.2.443-448.2000. PMID: 10639402; PMCID: PMC97161

Cui X, Wang L, Lü Y, Yue C. Development and research progress of anti-drug resistant fungal drugs. *J Infect Public Health*. 2022 Sep;15(9):986-1000. doi: 10.1016/j.jiph.2022.08.004. Epub 2022 Aug 10. PMID: 35981408.

Deaguero IG, Huda MN, Rodriguez V, Zicari J, Al-Hilal TA, Badruddoza AZM, et al. Nano-vesicle based anti-fungal formulation shows higher stability, skin diffusion, biosafety and anti-fungal efficacy in vitro. *Pharmaceutics*. 2020 Jun 5;12(6):516. doi: 10.3390/pharmaceutics12060516. PMID: 32517047; PMCID: PMC7355414.

Del Poeta M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 2004 Oct;3(5):1067-75. doi: 10.1128/EC.3.5.1067-1075.2004. PMID: 15470235; PMCID: PMC522596.

Doering TL. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Microbiol*. 2009;63:223-47. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162753. PMID: 19575556; PMCID: PMC2880894.

Dolan K, Montgomery S, Buchheit B, Didone L, Wellington M, Krysan DJ. Antifungal activity of tamoxifen: *in vitro* and *in vivo* activities and mechanistic characterization. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Aug;53(8):3337-46. doi: 10.1128/AAC.01564-08. Epub 2009 Jun 1. PMID: 19487443; PMCID: PMC2715577

Donlin MJ, Meyers MJ. Repurposing and optimization of drugs for discovery of novel antifungals. *Drug Discov Today*. 2022 Jul;27(7):2008-2014. doi: 10.1016/j.drudis.2022.04.021. Epub 2022 Apr 27. PMID: 35489676.

Eisenman HC, Frases S, Nicola AM, Rodrigues ML, Casadevall A. Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology (Reading)*. 2009 Dec;155(Pt 12):3860-3867. doi: 10.1099/mic.0.032854-0. Epub 2009 Sep 3. PMID: 19729402; PMCID: PMC2889422.

Firacative C, Trilles L, Meyer W. Recent advances in *Cryptococcus* and Cryptococcosis. *Microorganisms*. 2021 Dec 23;10(1):13. doi: 10.3390/microorganisms10010013. PMID: 35056462; PMCID: PMC8779235.

Fontes AC, Bretas Oliveira D, Santos JR, Carneiro HC, Ribeiro NQ, Oliveira LV, et al. A subdose of fluconazole alters the virulence of *Cryptococcus gattii* during murine cryptococcosis and modulates type I interferon expression. *Med Mycol*. 2017 Feb 1;55(2):203-212. doi: 10.1093/mmy/myw056. Epub 2016 Aug 2. PMID: 27486215.

Frampton JE, Plosker GL. Duloxetine: a review of its use in the treatment of major depressive disorder. *CNS Drugs*. 2007;21(7):581-609. doi: 10.2165/00023210-200721070-00004. PMID: 17579500.

Gao L, Sun Y, Yuan M, Li M, Zeng T. *In vitro* and *in vivo* study on the synergistic effect of minocycline and azoles against pathogenic fungi. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020 May 21;64(6):e00290-20. doi: 10.1128/AAC.00290-20. PMID: 32253207; PMCID: PMC7269466.

Garcia-Hermoso D, Janbon G, Dromer F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *J Clin Microbiol*. 1999 Oct;37(10):3204-9. doi: 10.1128/JCM.37.10.3204-3209.1999. PMID: 10488178; PMCID: PMC85528.

Gerstein AC, Jackson KM, McDonald TR, Wang Y, Lueck BD, Bohjanen S, et al. Identification of pathogen genomic differences that impact human immune response and disease during *Cryptococcus neoformans* infection. *mBio*. 2019 Jul 16;10(4):e01440-19. doi: 10.1128/mBio.01440-19. PMID: 31311883; PMCID: PMC6635531.

Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999 Oct;12(4):501-17. doi: 10.1128/CMR.12.4.501. PMID: 10515900; PMCID: PMC88922.

Gray KC, Palacios DS, Dailey I, Endo MM, Uno BE, Wilcock BC et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Feb 14;109(7):2234-9. doi: 10.1073/pnas.1117280109. Epub 2012 Jan 17. PMID: 22308411; PMCID: PMC3289339.

Grupo do consenso de criptococose. Consenso em criptococose - 2008. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(5):524-44.
<https://doi.org/10.1590/S003786822008000500022>

Hanje AJ, Pell LJ, Votolato NA, Frankel WL, Kirkpatrick RB. Case report: fulminant hepatic failure involving duloxetine hydrochloride. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006 Jul;4(7):912-7. doi: 10.1016/j.cgh.2006.04.018. Epub 2006 Jun 22. PMID: 16797245.

Hasim S, Coleman JJ. Targeting the fungal cell wall: current therapies and implications for development of alternative antifungal agents. *Future Med Chem*. 2019 Apr;11(8):869-883. doi: 10.4155/fmc-2018-0465. Epub 2019 Apr 17. PMID: 30994368; PMCID: PMC6543504.

Holcomb ZE, Steinbrink JM, Zaas AK, Betancourt M, Tenor JL, Toffaletti DL, et al. Transcriptional profiles elucidate differential host responses to infection with *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J Fungi (Basel)*. 2022 Apr 22;8(5):430. doi: 10.3390/jof8050430. PMID: 35628686; PMCID: PMC9143552.

Heung LJ. Monocytes and the host response to fungal pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Feb 13;10:34. doi: 10.3389/fcimb.2020.00034. PMID: 32117808; PMCID: PMC7031161.

Hua Y, Dai X, Xu Y, Xing G, Liu H, Lu T, et al. Drug repositioning: Progress and challenges in drug discovery for various diseases. *Eur J Med Chem*. 2022 Apr 15;234:114239. doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114239. Epub 2022 Feb 28. PMID: 35290843; PMCID: PMC8883737.

Hull CM, Bader O, Parker JE, Weig M, Gross U, Warrilow AG, et al. Two clinical isolates of *Candida glabrata* exhibiting reduced sensitivity to amphotericin B both harbor mutations in ERG2. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Dec;56(12):6417-21. doi: 10.1128/AAC.01145-12. Epub 2012 Oct 1. PMID: 23027188; PMCID: PMC3497184.

Idnurm A, Lin X. Rising to the challenge of multiple *Cryptococcus* species and the diseases they cause. *Fungal Genet Biol*. 2015 May;78:1-6. doi: 10.1016/j.fgb.2015.05.002. Epub 2015 May 14. PMID: 25983191; PMCID: PMC4461476.

Illeez OG, Oktay KNK, Aktas I, Ozkan FU, Nazligül T, Begoglu FA, et al. Comparison of the effects of duloxetine and pregabalin on pain and associated factors in patients with knee osteoarthritis. *Rev Assoc Med Bras*. 2022;68(3):377–83. doi: 10.1590/1806-9282.20211047. PMID: 35442367.

Iyer KR, Revie NM, Fu C, Robbins N, Cowen LE. Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. *Nat Rev Microbiol*. 2021 Jul;19(7):454-466. doi: 10.1038/s41579-021-00511-0. Epub 2021 Feb 8. PMID: 33558691; PMCID: PMC7868659.

Kane A, Carter DA. Augmenting azoles with drug synergy to expand the antifungal toolbox. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 Apr 14;15(4):482. doi: 10.3390/ph15040482. PMID: 35455479; PMCID: PMC9027798.

Kievit TR de, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun*. 2000 Sep;68(9):4839-49. doi: 10.1128/IAI.68.9.4839-4849.2000. PMID: 10948095; PMCID: PMC101676.

Kim JH, Cheng LW, Land KM. Advances in antifungal development: Discovery of new drugs and drug repurposing. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 Jun 24;15(7):787. doi: 10.3390/ph15070787. PMID: 35890086; PMCID: PMC9318969.

Korem M, Kagan S, Polacheck I. The effect of novel heterocyclic compounds on cryptococcal biofilm. *J Fungi (Basel)*. 2017 Jul 20;3(3):42. doi: 10.3390/jof3030042. PMID: 29371559; PMCID: PMC5715956.

Krysan DJ. Toward improved anti-cryptococcal drugs: Novel molecules and repurposed drugs. *Fungal Genet Biol*. 2015 May;78:93-8. doi: 10.1016/j.fgb.2014.12.001. Epub 2014 Dec 13. PMID: 25514636.

Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang Z, Janbon G, Idnurm A, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014 Jul 1;4(7):a019760. doi: 10.1101/cshperspect.a019760. PMID: 24985132; PMCID: PMC4066639.

Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res*. 2006 Jun;6(4):574-87. doi: 10.1111/j.1567-1364.2006.00088.x. PMID: 16696653.

Liao Z, ZhangGuan X, Zhu Z, Yao X, Yang Y, Jiang Y, et al. Enhancement of the antibiofilm activity of amphotericin B by polyamine biosynthesis inhibitors. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Jul;46(1):45-52. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.02.021. Epub 2015 Apr 14. PMID: 25937097.

Lin J, Pham T, Hipsher K, Glueck N, Fan Y, Lin X. Immunoprotection against Cryptococcosis offered by Znf2 depends on capsule and the hyphal morphology. *mBio*. 2022 Jan 11;13(1):e0278521. doi: 10.1128/mbio.02785-21. Epub ahead of print. PMID: 35012334; PMCID: PMC8749420.

Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol*. 2006;60:69-105. doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142102. PMID: 16704346.

Liu OW, Chun CD, Chow ED, Chen C, Madhani HD, Noble SM. Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Cell*. 2008 Oct 3;135(1):174-88. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.046. PMID: 18854164; PMCID: PMC2628477.

Lizarazo J, Castañeda E. Central nervous system cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii* in the tropics. *Curr Trop Med Rep*. 2022;9(1):1-7. doi: 10.1007/s40475-022-00253-w. Epub 2022 Mar 30. PMID: 35378784; PMCID: PMC8967080.

Lu CW, Liu WD, Hsu HH, Wu UI, Jeng YM, Chen YC, et al. Video-assisted thoracoscopic surgery for primary pulmonary cryptococcosis. *J Formos Med Assoc*. 2022 Apr 30:S0929-6646(22)00179-6. doi: 10.1016/j.jfma.2022.04.014. Epub ahead of print. PMID: 35501211.

Lu Y, Ding M, Huang J, Fu C, Wan Y, Jiang J, et al. Clinical characteristics and image features of pulmonary cryptococcosis: a retrospective analysis of 50 cases in a chinese hospital. *BMC Pulm Med*. 2022 Apr 8;22(1):137. doi: 10.1186/s12890-022-01930-2. PMID: 35395794; PMCID: PMC8994255.

Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M, Kelly S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med*. 2002 Feb;8(2):76-81. doi: 10.1016/s1471-4914(02)02280-3. PMID: 11815273.

Marincu I, Citu C, Vidican I, Bratosin F, Mares M, Suci O, et al. Clinical profile of 24 AIDS patients with cryptococcal meningitis in the HAART Era: A Report from an Infectious Diseases Tertiary Hospital in Western Romania. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Dec 28;12(1):54. doi: 10.3390/diagnostics12010054. PMID: 35054221; PMCID: PMC8774555.

Martinez LR, Casadevall A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. *Infect Immun*. 2005 Oct;73(10):6350-62. doi: 10.1128/IAI.73.10.6350-6362.2005. PMID: 16177306; PMCID: PMC1230912.

Martinez LR, Casadevall A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Mar;50(3):1021-33. doi: 10.1128/AAC.50.3.1021-1033.2006. PMID: 16495265; PMCID: PMC1426450.

Martinez LR, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Jul;73(14):4592-601. doi: 10.1128/AEM.02506-06. Epub 2007 May 18. PMID: 17513597; PMCID: PMC1932807.

Martinez LR, Ibom DC, Casadevall A, Fries BC. Characterization of phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* biofilms. *Mycopathologia*. 2008 Oct;166(4):175-80. doi: 10.1007/s11046-008-9133-0. Epub 2008 Jun 21. PMID: 18568421; PMCID: PMC2721796.

Menezes RT, Pereira TC, Junqueira JC, Oliveira LD, Scorzoni L. Synergistic combination of duloxetine hydrochloride and fluconazole reduces the cell growth and capsule size of *Cryptococcus neoformans*. *An Acad Bras Cienc*. 2022 May 9;94(2):e20211021. doi: 10.1590/0001-376520220211021. PMID: 35544847.

Merry M, Boulware DR. Cryptococcal meningitis treatment strategies affected by the explosive cost of flucytosine in the United States: A cost-effectiveness analysis. *Clin Infect Dis*. 2016 Jun 15;62(12):1564-8. doi: 10.1093/cid/ciw151. Epub 2016 Mar 23. PMID: 27009249; PMCID: PMC4885648.

Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev*. 1995 Oct;8(4):515-48. doi: 10.1128/CMR.8.4.515. PMID: 8665468; PMCID: PMC172874.

Mourad A, Perfect JR. The war on cryptococcosis: A Review of the antifungal arsenal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018a;113(7):e170391. doi: 10.1590/0074-02760170391. Epub 2018 Feb 19. PMID: 29513785; PMCID: PMC5851043.

Mourad A, Perfect JR. Present and future therapy of *Cryptococcus* Infections. J Fungi (Basel). 2018b; Jul 3;4(3):79. doi: 10.3390/jof4030079. PMID: 29970809; PMCID: PMC6162641.

Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA, Ghannoum MA. Combination treatment of invasive fungal infections. Clin Microbiol Rev. 2005 Jan;18(1):163-94. doi: 10.1128/CMR.18.1.163-194.2005. PMID: 15653825; PMCID: PMC544182.

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; PMCID: PMC3441194.

Mondon P, Petter R, Amalfitano G, Luzzati R, Concia E, Polacheck I, et al. Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Aug;43(8):1856-61. doi: 10.1128/AAC.43.8.1856. PMID: 10428902; PMCID: PMC89380.

Nayak R, Xu J. Effects of sertraline hydrochloride and fluconazole combinations on *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Mycology 2010;1:99–105. doi: 10.1080/21501203.2010.487054.

Ngan NTT, Flower B, Day JN. Treatment of cryptococcal meningitis: how have we got here and where are we going? Drugs. 2022 Aug;82(12):1237-49. doi: 10.1007/s40265-022-01757-5. Epub 2022 Sep 16. PMID: 36112342; PMCID: PMC9483520.

Nielsen K, Cox GM, Litvintseva AP, Mylonakis E, Malliaris SD, Benjamin DK Jr, et al. *Cryptococcus neoformans* {alpha} strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. Infect Immun. 2005 Aug;73(8):4922-33. doi: 10.1128/IAI.73.8.4922-4933.2005. PMID: 16041006; PMCID: PMC1201212.

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

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

Oliveira Júnior JO de, Almeida MB de. The current treatment of fibromyalgia. *Brazilian J Pain*. 2018;1(3):255–62. doi: 10.5935/2595-0118.20180049.

Oliver BG, Silver PM, Marie C, Hoot SJ, Leyde SE, White TC. Tetracycline alters drug susceptibility in *Candida albicans* and other pathogenic fungi. *Microbiology (Reading)*. 2008 Mar;154(Pt 3):960-970. doi: 10.1099/mic.0.2007/013805-0. PMID: 18310042; PMCID: PMC2615396.

Olszewski MA, Zhang Y, Huffnagle GB. Mechanisms of cryptococcal virulence and persistence. *Future Microbiol*. 2010 Aug;5(8):1269-88. doi: 10.2217/fmb.10.93. PMID: 20722603.

O'Meara TR, Alspaugh JA. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Jul;25(3):387-408. doi: 10.1128/CMR.00001-12. PMID: 22763631; PMCID: PMC3416491.

Onyewu C, Blankenship JR, Del Poeta M, Heitman J. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Mar;47(3):956-64. doi: 10.1128/AAC.47.3.956-964.2003. PMID: 12604527; PMCID: PMC149324.

Padda IS, Parmar M. Flucytosine. [Updated 2023 Jan 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557607/>

Palacios DS, Dailey I, Siebert DM, Wilcock BC, Burke MD. Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Apr 26;108(17):6733-8. doi: 10.1073/pnas.1015023108. Epub 2011 Feb 28. PMID: 21368185; PMCID: PMC3084054.

Parente-Rocha JA, Bailão AM, Amaral AC, Taborda CP, Paccez JD, Borges CL, et al. Antifungal resistance, metabolic routes as drug targets, and new antifungal agents: An overview about endemic dimorphic fungi. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:9870679. doi: 10.1155/2017/9870679. Epub 2017 Jun 13. PMID: 28694566; PMCID: PMC5485324.

Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*. 2008

Feb;72(2):157-65. doi: 10.1016/j.mimet.2007.11.010. Epub 2007 Nov 21. PMID: 18155789.

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 Feb 19;79(2):ftab001. doi: 10.1093/femspd/ftab001. PMID: 33417701.

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 Feb 1;50(3):291-322. doi: 10.1086/649858. PMID: 20047480; PMCID: PMC5826644.

Perfect JR, Bicanic T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. Fungal Genet Biol. 2015 May;78:49-54. doi: 10.1016/j.fgb.2014.10.003. Epub 2014 Oct 13. PMID: 25312862; PMCID: PMC4395512.

Peyclit L, Yousfi H, Rolain JM, Bittar F. Drug repurposing in medical mycology: Identification of compounds as potential antifungals to overcome the emergence of multidrug-resistant fungi. Pharmaceuticals (Basel). 2021 May 20;14(5):488. doi: 10.3390/ph14050488. PMID: 34065420; PMCID: PMC8161392.

Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol. 2004 Oct;42(10):4419-31. doi: 10.1128/JCM.42.10.4419-4431.2004. PMID: 15472288; PMCID: PMC522363.

Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: Current epidemiological trends. Clin Infect Dis. 2006 aug;43: S3 – S14, doi:10.1086/504490.

Pfaller MA. The epidemiology of invasive mycoses narrowing the gap. Clin Infect Dis. 1998 Nov;27(5):1148-50. doi: 10.1093/clinids/27.5.1148. PMID: 9827261.

Preskorn SH. Duloxetine. J Psychiatr Pract. 2004 Nov;10(6):375-85. doi: 10.1097/00131746-200411000-00006. PMID: 15583519.

Qin X, Hakenjos JM, MacKenzie KR, Barzi M, Chavan H, Nyshadham P, et al. Metabolism of a selective serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor duloxetine in liver microsomes and mice. Drug Metab Dispos. 2022 Feb;50(2):128-139. doi:

10.1124/dmd.121.000633. Epub 2021 Nov 16. PMID: 34785568; PMCID: PMC8969139.

Rathore SS, Sathiyamoorthy J, Lalitha C, Ramakrishnan J. A holistic review on *Cryptococcus neoformans*. Microb Pathog. 2022;166(October 2021):105521. doi: 10.1016/j.micpath.2022.105521. PMID: 35436563.

Ravi S, Pierce C, Witt C, Wormley FL Jr. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans* under distinct environmental conditions. Mycopathologia. 2009 Jun;167(6):307-14. doi: 10.1007/s11046-008-9180-6. Epub 2009 Jan 8. PMID: 19130292; PMCID: PMC4278410.

Retini C, Vecchiarelli A, Monari C, Tascini C, Bistoni F, Kozel TR. Capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces proinflammatory cytokine release by human neutrophils. Infect Immun. 1996 Aug;64(8):2897-903. doi: 10.1128/iai.64.8.2897-2903.1996. PMID: 8757810; PMCID: PMC174164.

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. PMID: 29547801; PMCID: PMC6135714.

Riquelme M, Aguirre J, Bartnicki-García S, Braus GH, Feldbrügge M, Fleig U, et al. Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. Microbiol Mol Biol Rev. 2018 Apr 11;82(2):e00068-17. doi: 10.1128/MMBR.00068-17. PMID: 29643171; PMCID: PMC5968459.

Rhein J, Morawski BM, Hullsiek KH, Nabeta HW, Kiggundu R, Tugume L, et al. Efficacy of adjunctive sertraline for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: an open-label dose-ranging study. Lancet Infect Dis. 2016 Jul;16(7):809-818. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00074-8. Epub 2016 Mar 10. PMID: 26971081; PMCID: PMC4927382.

Rhein J, Huppler Hullsiek K, Tugume L, Nuwagira E, Mpoza E, Evans EE, et al. Adjunctive sertraline for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised, placebo-controlled, double-blind phase 3 trial. Lancet Infect Dis. 2019 Aug;19(8):843-851. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30127-6. PMID: 31345462; PMCID: PMC7041360.

Robertson EJ, Casadevall A. Antibody-mediated immobilization of *Cryptococcus neoformans* promotes biofilm formation. Appl Environ Microbiol. 2009

Apr;75(8):2528-33. doi: 10.1128/AEM.02846-08. Epub 2009 Feb 27. PMID: 19251903; PMCID: PMC2675221.

Robertson EJ, Wolf JM, Casadevall A. EDTA inhibits biofilm formation, extracellular vesicular secretion, and shedding of the capsular polysaccharide glucuronoxylomannan by *Cryptococcus neoformans*. Appl Environ Microbiol. 2012 Nov;78(22):7977-84. doi: 10.1128/AEM.01953-12. Epub 2012 Aug 31. PMID: 22941091; PMCID: PMC3485937.

Roemer T, Krysan DJ. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014 May 1;4(5):a019703. doi: 10.1101/cshperspect.a019703. PMID: 24789878; PMCID: PMC3996373.

Rogers TR, Verweij PE, Castanheira M, Dannaoui E, White PL, Arendrup MC; Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Molecular mechanisms of acquired antifungal drug resistance in principal fungal pathogens and EUCAST guidance for their laboratory detection and clinical implications. J Antimicrob Chemother. 2022 Jul 28;77(8):2053-2073. doi: 10.1093/jac/dkac161. PMID: 35703391; PMCID: PMC9333407.

Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, Pappas PG, Perfect JR, Powderly WG, et al. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2000 Apr;30(4):710-8. doi: 10.1086/313757. Epub 2000 Apr 20. PMID: 10770733.

Salem HF, Ali AA, Rabea YK, El-Ela FIA, Khallaf RA. Glycosomal thermosensitive in situ gel of duloxetine HCl as a novel nanopatform for rectal delivery: *in vitro* optimization and *in vivo* appraisal. Drug Deliv Transl Res. 2022 May 27. doi: 10.1007/s13346-022-01172-z. Epub ahead of print. PMID: 35622235.

Sanguinetti M, Posteraro B, La Sorda M, Torelli R, Fiori B, Santangelo R, et al. Role of AFR1, an ABC transporter-encoding gene, in the *in vivo* response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun. 2006 Feb;74(2):1352-9. doi: 10.1128/IAI.74.2.1352-1359.2006. PMID: 16428784; PMCID: PMC1360305.

Santi L, Beys-da-Silva WO, Berger M, Calzolari D, Guimarães JA, Moresco JJ, et al. Proteomic profile of *Cryptococcus neoformans* biofilm reveals changes in metabolic

processes. J Proteome Res. 2014 Mar 7;13(3):1545-59. doi: 10.1021/pr401075f. Epub 2014 Jan 27. PMID: 24467693; PMCID: PMC3993910.

Santos CM de GC dos, Melo JAV de, Assunção GMS. Hyperprolactinemia and galactorrhea associated with the use of duloxetine to treat chronic neuropathic pain. Case report. Brazilian J Pain. 2022;5(1):80–2. doi: 10.5935/2595-0118.20220011.

Scorzoni L, de Paula E Silva AC, Marcos CM, Assato PA, de Melo WC, de Oliveira HC, et al. Antifungal therapy: New advances in the understanding and treatment of mycosis. Front Microbiol. 2017 Jan 23;8:36. doi: 10.3389/fmicb.2017.00036. PMID: 28167935; PMCID: PMC5253656.

Singh A, Panting RJ, Varma A, Saijo T, Waldron KJ, Jong A, et al. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. mBio. 2013 May 7;4(3):e00220-13. doi: 10.1128/mBio.00220-13. PMID: 23653445; PMCID: PMC3663189.

Sionov E, Chang YC, Garraffo HM, Kwon-Chung KJ. Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Jul;53(7):2804-15. doi: 10.1128/AAC.00295-09. Epub 2009 May 4. PMID: 19414582; PMCID: PMC2704677.

Smith T, Nicholson RA. Review of duloxetine in the management of diabetic peripheral neuropathic pain. Vasc Health Risk Manag. 2007;3(6):833-44. PMID: 18200804; PMCID: PMC2350145.

Sousa F, Ferreira D, Reis S, Costa P. Current insights on antifungal therapy: Novel nanotechnology approaches for drug delivery systems and new drugs from natural sources. Pharmaceuticals (Basel). 2020 Sep 15;13(9):248. doi: 10.3390/ph13090248. PMID: 32942693; PMCID: PMC7558771.

Sousa HR de, Oliveira GP Jr, Frazão SO, Gorgonha KCM, Rosa CP, Garcez EM, et al. Faster *Cryptococcus* Melanization increases virulence in experimental and human Cryptococcosis. J Fungi (Basel). 2022 Apr 12;8(4):393. doi: 10.3390/jof8040393. PMID: 35448624; PMCID: PMC9029458.

Spadari CC, Wirth F, Lopes LB, Ishida K. New approaches for cryptococcosis treatment. Microorganisms. 2020 Apr 23;8(4):613. doi: 10.3390/microorganisms8040613. PMID: 32340403; PMCID: PMC7232457.

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. PMID: 27268286; PMCID: PMC5354157.

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. PMID: 24375706; PMCID: PMC3938112.

Stempinski PR, Goughenour KD, du Plooy LM, Alspaugh JA, Olszewski MA, Kozubowski L. The *Cryptococcus neoformans* Flc1 homologue controls calcium homeostasis and confers fungal pathogenicity in the infected hosts. *mBio*. 2022 Oct 26;13(5):e0225322. doi: 10.1128/mbio.02253-22. Epub 2022 Sep 28. PMID: 36169198; PMCID: PMC9600462.

Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Apr;14(4):398-405. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01935.x. Epub 2008 Jan 11. Erratum in: *Clin Microbiol Infect*. 2009 Jan;15(1):103. PMID: 18190574.

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. PMID: 26705833.

Trevijano-Contador N, Roselletti E, García-Rodas R, Vecchiarelli A, Zaragoza Ó. Role of IL-17 in morphogenesis and dissemination of *Cryptococcus neoformans* during murine infection. *Microorganisms*. 2022 Feb 5;10(2):373. doi: 10.3390/microorganisms10020373. PMID: 35208830; PMCID: PMC8876707.

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. PMID: 29740519; PMCID: PMC5937474.

Varma A, Kwon-Chung KJ. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jun;54(6):2303-11. doi: 10.1128/AAC.00153-10. Epub 2010 Apr 12. PMID: 20385871; PMCID: PMC2876399.

Vélez N, Vega-Vela N, Muñoz M, Gómez P, Escandón P, Ramírez JD, et al. Deciphering the association among pathogenicity, production and polymorphisms of capsule/melanin in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI. J Fungi (Basel). 2022 Feb 28;8(3):245. doi: 10.3390/jof8030245. PMID: 35330247; PMCID: PMC8950468.

Venturella G, Rambelli A. Micologia: Aiorphological comparative analysis on mycorrhizas of abies atebrodl?hsis (lojac.) riatixi and abies alba I. Seedlings in sicily. G Bot Ital. 1995; 129(2):196. doi: 10.1080/11263509509431073.

Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. J Antimicrob Chemother. 2000 Aug;46(2):171-9. doi: 10.1093/jac/46.2.171. PMID: 10933638.

Vey EL, Kovelman I. Adverse events, toxicity and post-mortem data on duloxetine: case reports and literature survey. J Forensic Leg Med. 2010 May;17(4):175-85. doi: 10.1016/j.jflm.2010.02.002. Epub 2010 Mar 19. PMID: 20382351.

Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Dauar RF, Boulware DR. Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. Braz J Infect Dis. 2013 May-Jun;17(3):353-62. doi: 10.1016/j.bjid.2012.10.020. Epub 2013 May 10. PMID: 23665012; PMCID: PMC3747670.

Villanueva-Lozano H, González GM, Espinosa-Mora JE, Bodden-Mendoza BA, Andrade A, Martínez-Reséndez MF, et al. Evaluation of the expanding spectrum of sertraline against uncommon fungal pathogens. J Infect Chemother. 2020 Mar;26(3):309-311. doi: 10.1016/j.jiac.2019.10.001. Epub 2019 Oct 31. PMID: 31678053.

Waitekus AB, Kirkpatrick P. Duloxetine hydrochloride. Nat Rev Drug Discov. 2004;3(11):907–8. doi: 10.1038/nrd1555. PMID: 15558861.

Wambaugh MA, Denham ST, Ayala M, Brammer B, Stonhill MA, Brown JC. Synergistic and antagonistic drug interactions in the treatment of systemic fungal infections. Elife. 2020 May 5;9:e54160. doi: 10.7554/eLife.54160. PMID: 32367801; PMCID: PMC7200157.

Wang D, Zhang Q, Wen Q, Ding G, Wang Y. Comparison of CT findings and histopathological characteristics of pulmonary cryptococcosis in immunocompetent

and immunocompromised patients. Sci Rep. 2022;1–8. doi: 10.1038/s41598-022-09794-6.

Wang Y, Aisen P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. Infect Immun. 1995 Aug;63(8):3131-6. doi: 10.1128/iai.63.8.3131-3136.1995. PMID: 7622240; PMCID: PMC173427.

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. PubMed PMID: 8843303; PubMed Central PMCID: PMC163439.

White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev. 1998 Apr;11(2):382-402. doi: 10.1128/CMR.11.2.382. PMID: 9564569; PMCID: PMC106838.

Yadav R, Pradhan M, Yadav K, Mahalvar A, Yadav H. Present scenarios and future prospects of herbal nanomedicine for antifungal therapy. J Drug Deliv Sci Technol. 2022 Aug;74:103430. doi: 10.1016/j.jddst.2022.103430. Epub 2022 May 13. PMID: 35582019; PMCID: PMC9101776.

Yang ML, Uhrig J, Vu K, Singapuri A, Dennis M, Gelli A, et al. Fluconazole susceptibility in *Cryptococcus gattii* is dependent on the ABC transporter Pdr11. antimicrob agents chemother. 2015 Dec 7;60(3):1202-7. doi: 10.1128/AAC.01777-15. PMID: 26643330; PMCID: PMC4775963.

Yang S, Yan D, Li M, Li D, Zhang S, Fan G, et al. Ergosterol depletion under bifonazole treatment induces cell membrane damage and triggers a ROS-mediated mitochondrial apoptosis in *Penicillium expansum*. Fungal Biol. 2022 Jan;126(1):1-10. doi: 10.1016/j.funbio.2021.09.002. Epub 2021 Oct 6. PMID: 34930554.

Zaitz C, Campbell I, Marques SA, Ruiz LR, Framil VMS. Compêndio de micologia Médica. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

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

Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Adv Appl Microbiol.

2009;68:133-216. doi: 10.1016/S0065-2164(09)01204-0. PMID: 19426855; PMCID: PMC2739887.

Zaragoza O, Taborda CP, Casadevall A. The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. Eur J Immunol. 2003 Jul;33(7):1957-67. doi: 10.1002/eji.200323848. PMID: 12884862.

Zeng Q, Zhang Z, Chen P, Long N, Lu L, Sang H. *In vitro* and *in vivo* Efficacy of a Synergistic Combination of Itraconazole and Verapamil Against *Aspergillus fumigatus*. Front Microbiol. 2019 Jun 7;10:1266. doi: 10.3389/fmicb.2019.01266. PMID: 31231346; PMCID: PMC6567931.

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. PMID: 22508310; PMCID: PMC3393448.

Zhang Q, Liu F, Zeng M, Mao Y, Song Z. Drug repurposing strategies in the development of potential antifungal agents. Appl Microbiol Biotechnol. 2021 Jul;105(13):5259-5279. doi: 10.1007/s00253-021-11407-7. Epub 2021 Jun 21. PMID: 34151414; PMCID: PMC8214983.