

RESSALVA

Atendendo solicitação do (a) autor
(a), o texto completo desta tese será
disponibilizado a partir de

27/11/2019



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

THAÍS CRISTINE PEREIRA

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

2019

THAÍS CRISTINE PEREIRA

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

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

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

Orientadora: Profa. Dra. Liliana Scorzoni

São José dos Campos

2019

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

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

Pereira, Thaís Cristine

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

78 f. : il.

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

Orientadora: Liliana Scorzoni.

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Liliana Scorzoni (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Haroldo Cesar de Oliveira

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Instituto Carlos Chagas

Campus de Curitiba, Paraná

São José dos Campos, 27 de maio de 2019.

DEDICATÓRIA

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

meus dias são melhores com vocês. Vocês são maravilhosas.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS*

Afeltra J, Verweij PE. Antifungal activity of nonantifungal drugs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003 Jul;22(7):397-407. Epub 2003 Jun 26. Review. PubMed PMID: 12884072

Agustinho DP, Miller LC, Li LX, Doering TL. Peeling the onion: the outer layers of *Cryptococcus neoformans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(7):e180040.doi: 10.1590/0074-02760180040. Epub 2018 May 7. Review. PubMed PMID: 29742198; PubMed Central PMCID: PMC5951675

Alvarez M, Casadevall A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol*. 2006 Nov 7;16(21):2161-5. PubMed PMID: 17084702.

Alvarez M, Casadevall A. Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. *BMC Immunol*. 2007 Aug 16;8:16. PubMed PMID: 17705844; PubMed Central PMCID: PMC1988836.

Archer DB, Peberdy JF. The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. *Crit Rev Biotechnol*. 1997;17(4):273-306. Review. PubMed PMID: 9397531.

Arendrup MC. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Jun;20 Suppl 6:42-8. doi: 10.1111/1469-0691.12513. Epub 2014 Feb 3. Review. PubMed PMID: 2437270

Arvanitis M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E. Invertebrate models of fungal infection. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Sep;1832(9):1378-83. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.03.008. Epub 2013 Mar 19. Review. PubMed PMID: 23517918.

Azevedo MM, Teixeira-Santos R, Silva AP, Cruz L, Ricardo E, Pina-Vaz C, et al. The effect of antibacterial and non-antibacterial compounds alone or associated with antifungals upon fungi. *Front Microbiol*. 2015 Jul 3;6:669. doi:10.3389/fmicb.2015.00669. eCollection 2015. Review. PubMed PMID: 26191055; PubMed Central PMCID: PMC4490243.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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