

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

REPOSICIONAMENTO DO FÁRMACO AMIODARONA COMO ALTERNATIVA
TERAPÊUTICA PARA A CRIPTOCOCOSE

Dissertação de Mestrado

Natália Kronbauer de Oliveira

Porto Alegre, 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

REPOSICIONAMENTO DO FÁRMACO AMIODARONA COMO ALTERNATIVA
TERAPÊUTICA PARA A CRIPTOCOCOSE

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Natália Kronbauer de Oliveira

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Livia Kmetzsch Rosa e Silva

Porto Alegre, 2019

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, situado no Centro de Biotecnologia, e no Laboratório de Sistemas Nanoestruturados para Administração de Fármacos, situado na Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Lívia Kmetzsch Rosa e Silva por todos os ensinamentos, paciência, apoio e dedicação. Foi um privilégio ser sua aluna durante os últimos cinco anos e ter a oportunidade de me tornar uma profissional melhor.

Ao Prof. Charley Christian Staats pelo seu auxílio e ensinamentos durante todo o trabalho, seja como comissão de acompanhamento, responsável pela redação científica ou simplesmente para tirar qualquer dúvida.

Aos Profs. Marilene Henning Vainstein e Augusto Schrank pela oportunidade, apoio e ensinamentos durante o projeto.

Às Profs. Sílvia Guterres e Adriana Pohlmann pela oportunidade de parceria e de aprendizado em uma área totalmente diferente do que eu estava acostumada.

À pós-doc Luiza Abrahão Frank pela paciência de me ensinar, pela amizade e incentivo.

Aos meus amigos e colegas dos laboratórios 220 e 219. Principalmente os colegas de grupo Eamim Squizani, Júlia Reuwsaat, Bárbara Marques e Heryk Motta, e à Ane Garcia, Camila Diehl e Uriel Perin por toda a ajuda, o apoio, os ensinamentos, a amizade e companheirismo que fazem meus dias mais alegres.

Aos meus pais, Sérgio Roberto de Oliveira e Marisa Kronbauer de Oliveira por todo o amor e apoio incondicionais que sempre me deram. Vocês são meu exemplo e meu suporte, obrigado por sempre lutarem para me oferecer o melhor.

Ao meu irmão Bruno Kronbauer de Oliveira pelo companheirismo, inclusive me acompanhando na Universidade nos fins de semana.

À UFRGS e ao PPGBCM pelo ensino de qualidade.

E às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	6
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. Introdução.....	11
1.1. Criptococose e disseminação para o sistema nervoso central	11
1.2. Determinantes de virulência	13
1.2.1. Cápsula polissacarídica	14
1.2.2. Melanina.....	15
1.2.3. Urease.....	15
1.3. Via de sinalização mediada por Ca ²⁺ -calcineurina	16
1.4. Tratamento da criptococose.....	20
1.5. Reposicionamento de fármacos	22
1.6. Amiodarona	24
1.7. Nanocápsulas poliméricas	25
2. Objetivos.....	29
2.1. Objetivo Geral.....	29
2.2. Objetivos Específicos	29
3. Manuscrito	30
4. Discussão.....	54
5. Conclusões.....	59
6. Perspectivas	59
7. Referências	60

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
ATPase	Adenosinatrifosfatases
BMEC	Célula do endotélio microvascular cerebral (<i>Brain microvascular endothelial cell</i>)
MIC	Concentração inibitória mínima (<i>Minimum inhibitory concentration</i>)
OD	Densidade ótica
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
g	Gramma
°C	Graus Celsius
CD4	Grupamento de diferenciação 4 (<i>Cluster of differentiation 4</i>)
h	Hora
FIC index	Índice de concentração inibitória fracionada (<i>Fraction inhibitory concentration index</i>)
IgE	Imunoglobulina E
IL-4 e IL-13	Interleucina 4 e 13
Th1	Linfócito T helper do tipo 1
Th2	Linfócito T helper do tipo 2
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mV	Milivolts
min	Minuto

LNC	Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (<i>Lipid-core nanocapsules</i>)
LNC _{AMD}	Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo amiodarona (<i>Lipid-core nanocapsules containing amiodarone</i>)
LNC _{FLU}	Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo fluconazol (<i>Lipid-core nanocapsules containing fluconazole</i>)
LNC _{AMD+FLU}	Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo amiodarona e fluconazol (<i>Lipid-core nanocapsules containing amiodarone and fluconazole</i>)
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
n	Número
pmol	Picomol
%	Por cento
Kg	Quilograma
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Segundo
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
ART	Terapia antirretroviral (<i>Antiretroviral therapy</i>)
U	Unidade
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human immunodeficiency virus</i>)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: O modelo de disseminação de *Cryptococcus neoformans* do ambiente ao cérebro humano. 13
- Figura 2: Descrição da via de sinalização mediada por Ca^{2+} -calcineurina em *Cryptococcus neoformans*. 19
- Figura 3: Esquema de potenciais alvos antifúngicos em *Cryptococcus neoformans*. 22

RESUMO

Cryptococcus neoformans é o agente etiológico da meningite criptocócica, uma importante infecção oportunista em indivíduos imunocomprometidos. O tratamento recomendado com anfotericina B e fluconazol tem baixa eficiência, com toxicidade e resistência como problemas recorrentes. Portanto, o reposicionamento de fármacos já utilizados na clínica que demonstram atividade antifúngica se mostra promissor. Considerando a importância da homeostase de cálcio na virulência de *C. neoformans*, foi avaliado o uso do bloqueador de canais de cálcio amiodarona como uma alternativa terapêutica contra a criptococose. A concentração inibitória mínima (MIC) de amiodarona foi determinada para as linhagens H99 (selvagem) e mutante para o transportador vacuolar de cálcio Pmc1 (*pmc1*). Ambas as linhagens foram sensíveis a amiodarona, e o seu sinergismo com fluconazol foi observado. A atividade de urease foi avaliada nas referidas linhagens, sendo observado um aumento na presença de amiodarona e em sua combinação com fluconazol. A expressão relativa de genes envolvidos na via de sinalização mediada por Ca^{2+} -calcineurina também foi afetada pela exposição de *C. neoformans* a amiodarona. Além disto, células das linhagens H99 e *pmc1* demonstraram níveis aumentados de cálcio intracelular na presença de amiodarona em relação à condição controle. No intuito de avaliar o efeito *in vivo* da utilização de amiodarona para o controle da criptococose, um modelo murino de infecção foi utilizado. O tratamento com amiodarona ocasionou um aumento da carga fúngica nos pulmões, e a combinação deste fármaco com fluconazol não apresentou o efeito sinérgico observado nos ensaios *in vitro*. De modo a alcançar uma melhor biodistribuição do fármaco e eficácia no tratamento, nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo amiodarona (LNC_{AMD}), fluconazol (LNC_{FLU}) e ambos os fármacos associados (LNC_{AMD+FLU}) foram produzidas. Quando avaliadas em um modelo de tratamento intranasal, todas as formulações de nanocápsulas apresentaram efeito antifúngico, incluindo a LNC produzida sem fármaco, o que indica um potencial efeito antifúngico da própria formulação. Em um modelo intraperitoneal de tratamento, a LNC_{AMD} demonstrou um efeito antifúngico pronunciado em relação ao fármaco livre, o que não ocorreu com as formulações de LNC_{FLU} e LNC_{AMD+FLU}. Considerando todos os resultados obtidos, a nanotecnologia pode se mostrar efetiva e promissora para o tratamento de infecções por *C. neoformans*.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is the etiological agent of cryptococcal meningoencephalitis, an important opportunistic infection in immunocompromised individuals. The recommended treatment with amphotericin B and fluconazole has low efficiency, with toxicity and resistance as recurrent problems. Hence, repurposing drugs already used in the clinic that demonstrate antifungal activity have proved promising. Considering the importance of calcium storage mediated by calcium transporters on cryptococcal virulence, the use of the calcium channel blocker amiodarone as an alternative therapy for cryptococcosis was evaluated. The minimum inhibitory concentration (MIC) of amiodarone was evaluated for H99 wild type strain and null mutant strain for calcium transporter Pmc1 (*pmc1*). Both strains displayed high sensitivity to amiodarone, which was also synergistic with fluconazole. Urease activity was evaluated in these strains, showing an increase in the presence of amiodarone and in its combination with fluconazole. The relative expression of important genes involved in the calcium-calcineurin signaling pathway was also affected by exposure to amiodarone. Furthermore, H99 and *pmc1* strains increased intracellular calcium levels in the presence of amiodarone. In order to assess the *in vivo* effect of amiodarone in *C. neoformans* treatment, a murine cryptococcosis model was performed. Amiodarone treatment increased the fungal burden in the lungs, whereas its combination with fluconazole did not exhibit the synergistic effect observed *in vitro*. In order to achieve a better biodistribution and efficacy in treatment, lipid-core nanocapsules containing amiodarone (LNC_{AMD}), fluconazole (LNC_{FLU}) and both drugs associated (LNC_{AMD+FLU}) were produced. In an intranasal model of treatment, all the lipid-core nanocapsules had antifungal effect, including the control LNC, which indicates a potential antifungal effect of the formulation on its own. In an intraperitoneal treatment model, LNC_{AMD} showed an enhanced anticryptococcal effect compared to the free drug that was not observed for LNC_{FLU} and LNC_{AMD+FLU} formulations. Considering all the results obtained, nanotechnology might prove effective in treating *C. neoformans* infections.

1. Introdução

Cryptococcus neoformans é uma levedura oportunista pertencente ao filo Basidiomycota, um dos principais agentes causadores de meningite em indivíduos imunocomprometidos. Em 2013, foram estimadas 1,4 milhão de mortes relacionadas à AIDS, sendo as associadas à meningite criptocócica correspondendo a 15 % do total. No ano de 2014, 223.100 casos de criptococose foram estimados, sendo que 73 % ocorreram na África Subsaariana, com um total de 181.100 fatalidades. Os números têm diminuído desde estimativas de 2008 devido à rápida expansão da terapia antirretroviral (ART), no entanto, a criptococose permanece a segunda maior causa de mortalidade em portadores do vírus HIV, sendo a primeira a tuberculose (RAJASINGHAM et al., 2017).

C. neoformans é frequentemente isolado do ambiente, principalmente de fezes de pombos e amostras de solo. A maioria das infecções é associada ao sorotipo A de *C. neoformans*, o qual apresenta distribuição mundial. Uma pequena porcentagem da doença é causada por *C. neoformans* sorotipo D, sendo este sorotipo predominantemente isolado na Europa (MAZIARZ; PERFECT, 2016). *Cryptococcus gattii*, caracterizado por infectar indivíduos imunocompetentes, normalmente é associado a eucaliptos, no entanto, foi também isolado de árvores de clima temperado, como abetos e cedros. A presença dessa levedura em parques na ilha de Vancouver, no Canadá, foi associada ao surto ocorrido no início da década de 2000 (KIDD et al., 2004). A incidência de infecções por *C. gattii* entre 1999 e 2003 nesta região foi de 8,5 a 37 casos por milhão de habitantes por ano, incidência superior à observada na Austrália (0,94 casos/milhão/ano), onde *C. gattii* é endêmico (CHEN et al., 2000; HOANG et al., 2004).

1.1. Criptococose e disseminação para o sistema nervoso central

A infecção inicia pela inalação de esporos ou células dessecadas provenientes do solo ou excretas de pombos para o tecido pulmonar. A colonização pode resultar na eliminação do fungo; infecção assintomática, na qual células fúngicas entram em latência em forma de granulomas; ou doença pulmonar, caracterizada por nódulos e inflamação do tecido pulmonar. A infecção pode também se disseminar para outros tecidos, com especial tropismo para o sistema nervoso central (Figura 1) (IDNURM et al., 2005; SABIITI; MAY, 2012).

Uma vez no pulmão, o fungo pode sobreviver extracelularmente ou ser internalizado por células epiteliais do pulmão ou, ainda, por macrófagos alveolares. Uma

resposta Th1 é induzida na tentativa de eliminar as leveduras internalizadas, podendo resultar na formação de granulomas em indivíduos imunocompetentes, na tentativa de conter a infecção (MCQUISTON; WILLIAMSON, 2012). Para causar meningite, as células fúngicas devem penetrar a barreira hematoencefálica, cujas células endoteliais são unidas pelas junções aderentes (WEKSLER, 2005). As células de *Cryptococcus* ficam aderidas aos capilares de pequeno diâmetro, onde interagem com as células endoteliais (SHI et al., 2010).

Há três principais mecanismos de transmigração para o sistema nervoso central já descritos em *C. neoformans*: paracelular, transcelular e cavalo de Troia. No modelo de disseminação por Cavalo de Troia, o fungo é transportado através da barreira hematoencefálica internalizado por fagócitos (CHARLIER et al., 2009). As células fúngicas, após serem fagocitadas, replicam no interior do fagossomo, podendo levar à lise celular ou à exocitose não lítica (vomocitose) (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006; MA et al., 2006). Recentemente, foi demonstrado que o local provável para entrada dos fagócitos é no espaço perivascular, nas vênulas pós-capilares. Ademais, o mesmo estudo demonstrou que depleção de monócitos leva à diminuição de 90 % de células de *C. neoformans* no tecido cerebral (KAUFMAN-FRANCIS et al., 2018). O modelo transcelular permite que *Cryptococcus* atravesse a barreira hematoencefálica por meio de transcitose através das células endoteliais microvasculares (BMECs) (VU et al., 2009). A ligação de *C. neoformans* às células endoteliais pode ocorrer pela ligação do receptor CD44 das BMECs com o ácido hialurônico de *C. neoformans*, levando à reorganização do citoesqueleto e fagocitose (JONG et al., 2008). Paralelamente, fosfolipase B1 (Plb1) de *C. neoformans* age em fosfolipídeos da membrana da célula hospedeira, contribuindo para a regulação da transcitose e invasão do tecido cerebral (MARUVADA et al., 2012). Do mesmo modo, a metaloprotease Mpr1 liga as leveduras à superfície das células endoteliais (VU et al., 2014). Por fim, no modelo paracelular, o patógeno atravessa a barreira hematoencefálica pelos espaços intercelulares ao enfraquecer as junções aderentes que ligam as células endoteliais. No intuito de promover a passagem intercelular, manoproteínas de *C. neoformans* se ligam ao plasminogênio do hospedeiro, que é ativado para a forma de plasmina que, então, quebra a matriz extracelular e membrana (STIE; BRUNI; FOX, 2009). Além disto, a atividade de urease pode converter ureia em amônia, uma vez que a ureia é uniformemente distribuída no corpo humano. Essa hidrólise tem efeitos danosos na matriz extracelular, promovendo a travessia

paracelular (FU et al., 2018; OLSZEWSKI et al., 2004). Uma vez estabelecida a infecção, pacientes apresentam dores de cabeça, febre, indisposição e estado mental alterado. A complicação mais comum é aumento da pressão intracraniana, podendo levar à perda visual e auditiva (SABIITI; MAY, 2012).

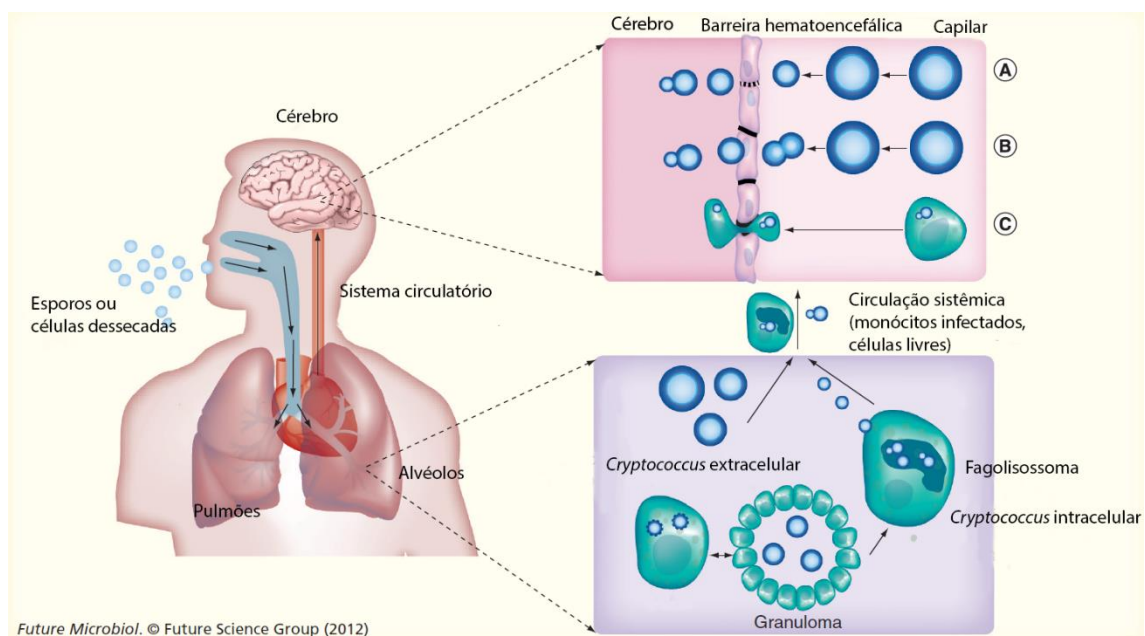


Figura 1: O modelo de disseminação de *Cryptococcus neoformans* do ambiente ao cérebro humano. Por meio da inalação, esporos ou células dessecadas de *C. neoformans* colonizam o espaço alveolar nos pulmões. Em indivíduos imunocompetentes há a formação de granulomas. Nestes granulomas, as células fúngicas podem permanecer latentes ou, após reativação, causarem infecção dependendo do *status* imunológico do paciente. Em indivíduos imunocomprometidos, fagócitos com fungos internalizados podem disseminar pela corrente sanguínea. Células de *Cryptococcus* extracelulares podem permanecer nos pulmões ou disseminar por via transcelular para a circulação sanguínea. Nos capilares cerebrais, *Cryptococcus* pode penetrar a barreira hematoencefálica por: (A) mecanismo paracelular; (B) mecanismo transcelular ou; (C) Cavalos de Troia. Adaptado de SABIITI; MAY, 2012.

1.2. Determinantes de virulência

C. neoformans apresenta determinantes de virulência essenciais para evadir agentes antimicrobianos e manipular a resposta imune do hospedeiro. Dentre eles, podemos destacar a cápsula polissacarídica, a produção de melanina e a atividade de urease, os quais serão discutidos a seguir.

1.2.1. Cápsula Polissacarídica

A cápsula polissacarídica está ancorada à parede celular e é composta principalmente por dois polissacarídeos, glucuronoxilomanana (GXM) e glucuronoxilomanogalactana (GXMGal) (DOERING, 2009). Ela também pode incluir manoproteínas, ácido hialurônico e ácido siálico em menores concentrações. GXM totaliza 90 – 95 % da composição total e é formada por uma cadeia principal de α (1,3) manose, com substituições β (1,2) e β (1,4) xilose e β (1,2) ácido glucurônico (CHERNIAK et al., 1980; MERRIFIELD; STEPHEN, 1980). GXMGal representa por volta de 5 – 8 % da cápsula e é formada por uma cadeia principal de α (1,6) galactana com substituições a cada dois resíduos por α (1,3) manose, cadeias laterais de β (1,4) galactose, que são adicionalmente substituídas por resíduos de β (1,2), β (1,3) xilose e β (1,3) ácido glucurônico (CHERNIAK et al., 1998; HEISS et al., 2009). O tamanho da cápsula varia entre populações e entre espécies de *Cryptococcus*, sendo afetada pelas condições de cultivo *in vitro*. A sua indução é observada em condições alcalinas, altas concentrações de CO₂, soro mamífero e privação de nutrientes (GRANGER; PERFECT; DURACK, 1985; ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004). Cápsulas reduzidas, por sua vez, são observadas sob alta pressão osmótica e abundância de nutrientes (DYKSTRA; FRIEDMAN; MURPHY, 1977).

Cápsulas polissacarídicas protegem micro-organismos de dessecação, estresse oxidativo e fagocitose por amebas (OPHIR; GUTNICK, 1994; STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001; ZARAGOZA et al., 2008). A cápsula de *C. neoformans* contribui para a virulência por meio de mecanismos que conferem proteção contra fagocitose e interferem a imunidade. Esta estrutura tem um papel antifagocítico e, conseqüentemente, linhagens altamente encapsuladas são menos fagocitadas por macrófagos e se concentram mais no pulmão, reduzindo sua taxa de disseminação sistêmica. A redução na fagocitose leva à diminuição na proliferação de células T, resultando em interferência com a resposta imune (SYME et al., 1999; VECCHIARELLI et al., 1994; XIE et al., 2012). Ademais, a cápsula também depleta componentes do sistema complemento, inibindo a resposta imune. Deste modo, linhagens acapsulares são avirulentas (ZARAGOZA; FRIES; CASADEVALL, 2003). Também é responsável por promover a sobrevivência intracelular, demonstrando um papel crucial na latência da levedura (FELDMESSER et al., 2000).

1.2.2. Melanina

Melaninas são pigmentos hidrofóbicos, carregados negativamente e de alto peso molecular que são formados pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos. Quando *C. neoformans* é exposto a compostos *o*-difenólicos, como 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), as células adquirem coloração marrom (WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995). A síntese de melanina é catalisada pela enzima lacase e *C. neoformans* possui dois genes que codificam essa proteína, *LAC1* e *LAC2*. No entanto, apenas *LAC1* é expresso em níveis significativos na maioria das condições, e é o único que impacta na virulência quando deletado (PUKKILA-WORLEY et al., 2005; ZHU; WILLIAMSON, 2004). A enzima lacase é do tipo oxidase multicobre e está localizada na parede celular do fungo (ZHU et al., 2001).

No ambiente, a melanização das células de *C. neoformans* as tornam menos suscetíveis aos efeitos fungicidas da luz ultravioleta e à exposição a altas temperaturas, congelamento e descongelamento (ROSAS; CASADEVALL, 1997; WANG; CASADEVALL, 1994). Ademais, células de *C. neoformans* em excretas de pombos podem estar melanizadas (NOSANCHUK et al., 1999). Durante infecção de um hospedeiro, células melanizadas tornam-se menos suscetíveis a oxidantes, morte mediada por peptídeos microbicidas, ingestão e morte por macrófagos (DOERING et al., 1999; LIU; TEWARI; WILLIAMSON, 1999; WANG; CASADEVALL, 1994). Além disto, a melanização têm um papel de proteção contra fármacos antimicrobicidas, como anfotericina B, caspofungina e azóis (VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002). Há indícios que o neurotropismo de *C. neoformans* está associado com a capacidade do fungo de converter catecolaminas em melanina. Catecolaminas incluem dopamina, epinefrina e norepinefrina, que possuem função como neurotransmissores no sistema nervoso central. Observações que áreas do cérebro ricos em catecolaminas são frequentemente infectados e que células se encontram melanizadas no tecido cerebral suportam essa possibilidade (LEE; DICKSON; CASADEVALL, 1996; NOSANCHUK et al., 2000).

1.2.3. Urease

O sistema de ativação da urease (Ure1) de *Cryptococcus*, uma enzima dependente de níquel, requer as enzimas acessórias Ure4, Ure6 e Ure7 para formar um complexo ativo. Linhagens com mutações para as proteínas acessórias disseminaram para o cérebro

em taxas similares ao mutante nulo *ure1*, o que indica que é a atividade de urease, e não *Ure1*, que representa um determinante de virulência (SINGH et al., 2013). A urease catalisa a hidrólise de ureia em amônia e essa atividade aumenta a invasão da levedura ao sistema nervoso central por promover o sequestro do fungo em microcapilares. Esse sequestro pode ser devido ao seu tamanho físico e/ou à forças biológicas (OLSZEWSKI et al., 2004; ZIMMER, 2000). O aumento da transmigração também pode ser devido aos efeitos tóxicos da amônia às células endoteliais capilares, comprometendo a integridade da barreira hematoencefálica (SINGH et al., 2013). Esses fatos demonstram que, apesar de não ser necessária para o crescimento do fungo no tecido cerebral, a atividade de urease é fundamental para a disseminação.

A expressão de urease, apesar de não ser fundamental para a taxa de crescimento imediata nos pulmões, é associada com uma remoção ineficiente do micro-organismo após algumas semanas de infecção, período que coincide com a polarização de células T. A observação de aumento de leucócitos no tecido pulmonar sugere uma resposta imune ineficiente. A expressão de urease se mostrou correlacionada com aumento de eosinofilia e níveis de IgE no soro. A alta produção das citocinas IL-4 e IL-13 demonstrou que a resposta imune se polarizou para uma resposta Th2, já demonstrada como não protetora contra infecções por *C. neoformans*. Ademais, células dendríticas imaturas se mostraram aumentadas nos linfonodos associados ao pulmão, o que também caracteriza uma resposta Th2 (OSTERHOLZER et al., 2009).

1.3. Via de sinalização mediada por Ca^{2+} -calcineurina

Íons intracelulares de cálcio (Ca^{2+}) são importantes segundos mensageiros e a via de sinalização mediada por Ca^{2+} -calcineurina regula processos fundamentais como tolerância a 37 °C, *mating*, frutificação monocariótica, resposta a estresse ambiental e virulência (CRUZ; FOX; HEITMAN, 2001; FOX et al., 2001; KOZUBOWSKI et al., 2011; KOZUBOWSKI; LEE; HEITMAN, 2009; ODOM et al., 1997). As concentrações de cálcio são muito baixas em um estado basal (50-200 nM), no entanto, o sistema de influxo de cálcio é ativado em resposta a vários estresses externos (estresse alcalino, hiperosmótico, térmico, oxidativo, salino), resultando em um rápido influxo de íons (CUI et al., 2009; LIU et al., 2015; WANG et al., 2011). A elevação transiente dos níveis de cálcio também pode ser devido à liberação de compartimentos internos (LOCKE et al., 2000). A proteína calmodulina detecta o aumento do cálcio intracelular, para subsequentemente ativar a fosfatase calcineurina (Figura 2). A calcineurina é constituída

de duas subunidades: uma subunidade A catalítica e uma subunidade B regulatória. A ligação ocorre na porção C-terminal da subunidade A, induzindo mudanças conformacionais que vão terminar com a autoinibição que ocorre nesse sítio (KRAUS; NICHOLS; HEITMAN, 2005).

A calcineurina ativada age nos seus alvos *downstream*, como o fator de transcrição Crz1, induzindo sua desfosforilação e translocação do citoplasma para o núcleo. Crz1 ativa a expressão de genes responsivos a calcineurina, cujos produtos regulam a homeostase de cálcio e tolerância a estresse (LEV et al., 2012). Recentemente foi demonstrado que muitos genes podem ser regulados pela calcineurina, independentemente de Crz1 e, do mesmo modo, que genes também podem ser regulados pelo Crz1 independentemente da calcineurina (CHOW et al., 2017). Além de Crz1, foram identificados outros alvos da desfosforilação dependente de calcineurina, incluindo proteínas cujos ortólogos têm papéis em resposta a estresse, ligação/estabilidade de mRNA, translocação de proteínas e vesículas. Diversas proteínas como Pbp1 (*Poly(A) binding protein*) e Puf4 (*Pumilio-homology domain family*) foram identificadas como alvos e colocalizaram com a calcineurina (PARK et al., 2016).

A homeostase celular de cálcio é mantida através da ação coordenada de transportadores no vacúolo, membrana plasmática, Golgi e retículo endoplasmático (RE). Em células fúngicas, o canal formado pelas proteínas Cch1 e Mid1 representa o único canal de alta afinidade de cálcio na membrana plasmática que medeia o influxo de cálcio. Cch1 funciona como o poro do canal e é necessário para a captação de cálcio em ambientes de baixa concentração de cálcio. Mutantes nulos *cch1* demonstraram apenas uma atenuação da virulência, indicando que *C. neoformans* pode ter uma necessidade limitada de Cch1 (LIU et al., 2006). Mid1 é uma proteína associada à Cch1 que possui uma região moduladora fundamental para manter a homeostase de cálcio. Essa região afeta a atividade do canal Cch1 diretamente e é o provável ponto de contato entre Cch1 e Mid1 (HONG et al., 2013). O canal é ativado pela depleção dos estoques de cálcio no RE ou pelo estresse do RE, atuando para reabastecer esses estoques e retomar a homeostase da célula. Eca1 é uma Ca^{2+} -ATPase de retículo endoplasmático/sarcoplasmático (SERCA). Para realizar suas funções, o RE necessita de altos níveis de Ca^{2+} , além de ser um dos principais estoques de Ca^{2+} intracelular, liberando-o no citosol em resposta à certos estímulos. SERCAs são importantes para repor as reservas de Ca^{2+} do RE e manter a homeostase. Eca1 está envolvido na tolerância a múltiplos estresses (altos níveis de

cálcio, depleção de cálcio, estresse do RE, estresse osmótico) e é necessário para o crescimento a 37 °C. Ademais, *Eca1* contribui para a virulência de um modo dependente da temperatura: a 37 °C os mutantes nulos *eca1* são hipovirulentos (FAN et al., 2007).

O vacúolo é um importante compartimento em fungos, sendo crucial para diferenciação, adaptação a estresse, endocitose, autofagia e patogênese. Além disto, é o principal local de estocagem de cálcio em células fúngicas (OLSEN, 2014). O trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ *Vcx1* se localiza na membrana vacuolar e é um dos responsáveis pelo armazenamento de cálcio nesta organela. Dados de nosso grupo de pesquisa indicaram que *Vcx1* atua na tolerância a altas concentrações de cálcio em condições de inibição de calcineurina. A linhagem mutante *vcx1* apresentou redução na secreção de GXM, demonstrou uma taxa menor de fagocitose e possivelmente, teve um papel na sobrevivência dentro dos macrófagos. Ademais, *Vcx1* se mostrou necessário para a virulência de *C. neoformans* (KMETZSCH et al., 2010). A proteína Ca^{2+} -ATPase *Pmc1* também regula níveis citosólicos de cálcio, transportando cálcio para dentro do vacúolo. O mutante *pmc1* demonstrou ser mais sensível às altas concentrações de cálcio e o acúmulo citoplásmico deste íon foi observado em comparação com a linhagem selvagem. Além disto, o mutante *pmc1* apresentou virulência altamente atenuada, com cargas fúngicas reduzidas nos pulmões e nenhuma evidência de infecção cerebral, devido à sua capacidade reduzida de atravessar a barreira hematoencefálica e sobreviver no sistema nervoso central. Genes associados com urease, a via mediada por Ca^{2+} -calcineurina e formação da cápsula polissacarídica foram diferencialmente expressos, podendo explicar a diferença de transmigração (KMETZSCH et al., 2013; SQUIZANI et al., 2018). Em *Saccharomyces cerevisiae*, *Vcx1* foi identificado como sendo responsável por reestabelecer as concentrações citosólicas de cálcio após breves estresses com altas concentrações de cálcio, enquanto o *Pmc1* se mostrou crítico para a tolerância a longo prazo (FÖRSTER; KANE, 2000). Esses resultados demonstram que, do mesmo modo, as ações dos dois transportadores podem ser diferentes em *C. neoformans*.

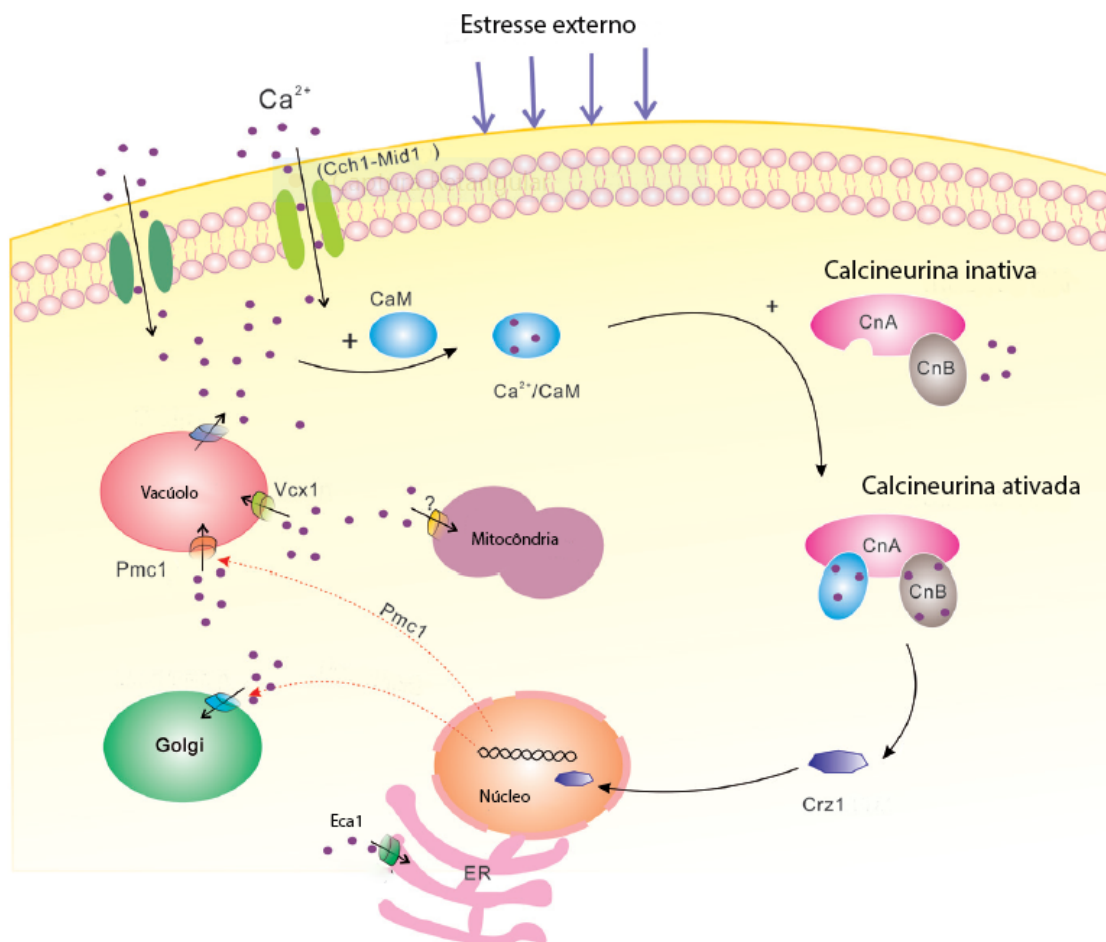


Figura 2: Descrição da via de sinalização mediada por Ca^{2+} -calcineurina em *Cryptococcus neoformans*. Na presença de determinados estresses externos (estresse alcalino, hiperosmótico, térmico, oxidativo, salino, etc), o sistema de influxo na membrana plasmática (Cch1-Mid1) é ativado, resultando em um rápido influxo de cálcio. O aumento transiente nas concentrações de cálcio intracelular também pode ser devido à secreção de compartimentos internos. O aumento de cálcio é detectado pela calmodulina (CaM), ligando-se aos íons de cálcio. Então, Ca^{2+} -calmodulina se liga a subunidade A da calcineurina (CnA), levando à sua ativação. A calcineurina ativada interage com Crz1, induzindo a sua desfosforilação e translocação para o núcleo. Essa sinalização induz a expressão de genes alvos. Subsequentemente, a concentração de cálcio intracelular é reduzida para níveis basais pela captação de cálcio pelas organelas celulares. Adaptado de LIU et al., 2015.

1.4. Tratamento da criptococose

Além da alta ocorrência de resistência e toxicidade, o tratamento da criptococose não se mostra muito efetivo. A mortalidade em um ano estimada em países de baixa renda é de 70% para pacientes em tratamento. Em países de média renda, a estimativa é de 40% de mortalidade para o mesmo grupo. Do mesmo modo, na Europa, as estimativas de mortalidade são em torno de 30%. Os melhores resultados são observados na América do Norte, onde a mortalidade é de 20% para pacientes em tratamento (RAJASINGHAM et al., 2017). Esses dados demonstram a necessidade do desenvolvimento de novos tratamentos e antifúngicos para combater a criptococose.

O tratamento de doenças fúngicas é um desafio devido às similaridades entre as maquinarias celulares de fungos e células do hospedeiro, limitando a disponibilidade de alvos específicos para drogas antifúngicas (Figura 3). Em 1950, foi aprovado o fármaco polieno anfotericina B desoxicolato. Em sua formulação com desoxicolato ou outros agentes solubilizantes, permanece o fungicida mais potente e com maior espectro antifúngico. O mecanismo de ação baseia-se na ligação da porção hidrofóbica da molécula ao ergosterol da membrana celular fúngica, produzindo um agregado que forma canais transmembrana. Esse defeito causa despolarização da membrana e um aumento da permeabilidade da membrana a prótons e cátions monovalentes, levando à morte celular. Apesar do ergosterol ter uma estrutura diferente do colesterol, o principal esteroide das membranas de mamíferos, a seletividade de ligação ainda é baixa. Portanto, toxicidade para as células mamíferas sempre foi um problema (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009; ODDS; BROWN; GOW, 2003; PERFECT, 2017). Na década de 1990, a formulação da anfotericina B foi melhorada com a criação de formulações lipossomais de anfotericina B, como o AmBisome, e o complexo lipídico de anfotericina B, que reduziram a toxicidade ao hospedeiro (ADLER-MOORE; PROFFITT, 1993). O principal efeito colateral da anfotericina B é a nefrotoxicidade e, portanto, tem a sua aplicação limitada.

Flucitosina, ou 5-fluorocitosina (5-FC) é um análogo de pirimidinas aprovado na década de 1960. O fármaco é transportado para dentro das células fúngicas pela enzima citosina permease, onde é convertido a 5-fluorouracil (5-FU) pela enzima citosina deaminase. A partir do 5-FU, dois mecanismos de atividade antifúngica podem ser distinguidos. No primeiro, o 5-FU é convertido a 5-fluorouridina trifosfato (FUTP), que é incorporado ao RNA fúngico, inibindo a síntese proteica. No segundo, o 5-FU é

convertido a 5-fluorodeoksiuridina monofosfato (FdUMP), um potente inibidor da enzima timidilato sintetase, a qual atua na biossíntese do DNA. Consequentemente, a síntese do DNA fúngico é inibida. Geralmente, o uso da flucitosina é limitado à terapia conjunta com um polieno, devido ao rápido desenvolvimento de resistência decorrente de monoterapia (PERFECT, 2017; VERMES; GUCHELAAR; DANKERT, 2000).

Na década de 1970, os azóis ascenderam como a principal escolha para o tratamento de infecções fúngicas. Seu principal efeito é inibir a desmetilação do grupo 14 α do lanosterol na via de biossíntese do ergosterol. Com a depleção do ergosterol, a fluidez e permeabilidade da membrana fúngica são alteradas, com consequências secundárias para enzimas que se ligam à membrana, como as envolvidas com a síntese da parede celular. A primeira geração dos azóis consistiu em formulações intravenosas de miconazol e orais de cetoconazol. A segunda geração estendeu o espectro de atividade antifúngica, segurança e farmacocinética. Fluconazol e itraconazol apresentaram formulações tanto orais quanto intravenosas. Por fim, uma terceira geração já está disponível: voriconazol, posaconazol e isavuconazol. Resistência aos azóis pode ocorrer por mutações que modificam a molécula alvo ou por superexpressão de bombas de efluxo que exportam o antifúngico da célula (ODDS; BROWN; GOW, 2003; PERFECT, 2017). Um estudo realizado em Uganda identificou uma crescente resistência ao fluconazol, onde 31% dos isolados clínicos não demonstraram suscetibilidade ao fluconazol nas concentrações consideradas inibitórias (SMITH et al., 2015). Ademais, fluconazol tem apenas efeito fungistático contra *C. neoformans*, inibindo o crescimento, mas não erradicando a carga fúngica (KLEPSEK; WOLFE; PFALLER, 1998).

A atual estratégia terapêutica preconizada para o tratamento da criptococose é um regime em três etapas: indução, consolidação e manutenção. A terapia de indução é realizada com a administração intravenosa de anfotericina B (0,7 – 1 mg/kg/dia), anfotericina B lipossomal (3 – 4 mg/kg/dia) ou complexo lipídico de anfotericina B (5 mg/kg/dia) e 5-FC oral (100 mg/kg/dia) por pelo menos duas semanas. Formulações intravenosas de 5-FC podem ser administradas em casos severos ou em pacientes impossibilitados de ingerir o fármaco. A duração do período de indução pode ser estendida em pacientes com resposta inicial fraca. O uso de formulações lipídicas de anfotericina B na fase de indução é favorecido em áreas com maior quantidade de recursos devido a um melhor perfil de segurança. No caso de países em que o fármaco 5-FC não está disponível, como o Brasil, e a terapia de indução é realizada com anfotericina

B e fluconazol (800 mg/dia). Para o período de consolidação, fluconazol (400 mg/dia) é utilizado durante pelo menos 8 semanas. Fluconazol (200 mg/dia) também é utilizado para a terapia de manutenção, por 12 meses, em pacientes HIV positivos. A manutenção com fluconazol pode ser descontinuada após ART ser reintroduzido, alcançando uma contagem de células CD4 maior que 100 células/ μ L e níveis de RNA de HIV indetectáveis após pelo menos 3 meses depois de um ano de terapia (LESTNER et al., 2017; PERFECT et al., 2010).

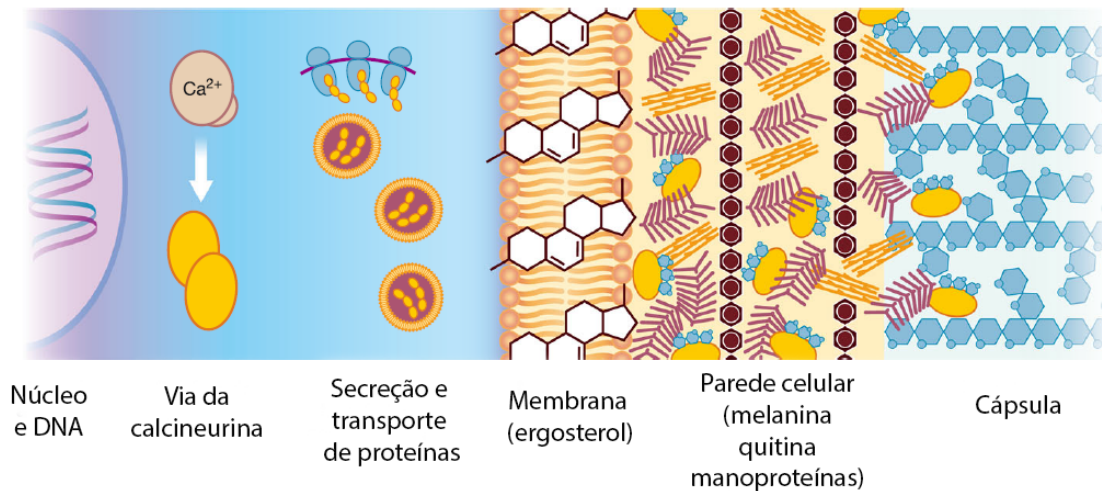


Figura 3: Esquema de potenciais alvos antifúngicos em *Cryptococcus neoformans*. Adaptado de COELHO; CASADEVALL, 2016.

1.5. Reposicionamento de fármacos

Além do desenvolvimento de novos fármacos, reposicionar fármacos já estabelecidos e que apresentam atividade antifúngica emergiu como uma alternativa para acelerar o desenvolvimento antifúngico. Com a toxicologia e farmacologia de tais compostos já estabelecidos, uma nova indicação de uso poderia ser rapidamente aplicada na clínica, levando em consideração a diferença de doses e possíveis efeitos adversos (BUTTS; KRYSAN, 2012). Diversos fármacos já passaram por testes para avaliar sua capacidade antifúngica com diferentes níveis de sucesso. Alguns destes serão exemplificados a seguir.

A tentativa de maior sucesso até o momento é a reposição do antidepressivo sertralina, um inibidor seletivo da recaptação da serotonina. Este fármaco apresentou atividade fungicida potente contra *C. neoformans* e interagiu de forma sinérgica com fluconazol *in vitro* e *in vivo* (ZHAI et al., 2012). Um estudo de fase II demonstrou que os

participantes recebendo sertralina apresentaram eliminação do fungo mais efetiva do sistema nervoso central e um número menor de recaídas. Os pacientes também não demonstraram problemas de segurança e tolerância às doses aplicadas, demonstrando o quanto é promissora (RHEIN et al., 2016). Os inibidores da calcineurina, como a ciclosporina e o tacrolimo, são fármacos imunossupressores usados principalmente após transplantes de órgãos e já foram estudados quanto a sua capacidade antifúngica. Um estudo em transplantados com infecções por *C. neoformans* demonstrou que pacientes recebendo tacrolimo tiveram menos envolvimento do sistema nervoso central, mas demonstraram maior envolvimento da pele, tecidos moles e ostearticulares (HUSAIN; WAGENER; SINGH, 2001). Os inibidores da calcineurina demonstraram efeito antifúngico e sinergismo com anfotericina B e fluconazol (KONTOYIANNIS et al., 2008). Os resultados antifúngicos se mostraram promissores, entretanto a questão da alta imunossupressão deve ser levada em conta no desenvolvimento desse tratamento.

Os antagonistas do receptor de estrogênio, tamoxifeno e toremifeno, são comumente usados para o tratamento do câncer de mama. Ambos os fármacos demonstraram efeito antifúngico e sinergismo com fluconazol e anfotericina B. Em um modelo de infecção em camundongos, tamoxifeno em combinação com fluconazol diminuíram a carga fúngica no tecido cerebral. Ademais, os fármacos inibiram o crescimento de *C. neoformans* dentro de macrófagos, um nicho dificilmente acessado por antifúngicos e foi demonstrado que eles agem impedindo a ligação da calmodulina à calcineurina (BUTTS et al., 2014).

Outros fármacos também foram testados quanto a sua atividade contra *C. neoformans*, principalmente em testes *in vitro*. O fármaco indinavir, um inibidor de proteases virais, diminuiu a taxa de crescimento de *C. neoformans* e aumentou a destruição do fungo pelas células imunes (BLASI et al., 2004). A adição de rifampicina, um agente antibacteriano e inibidor da RNA polimerase, à anfotericina B demonstrou efeito sinérgico contra *C. neoformans* (FUJITA; EDWARDS, 1981). Por fim, os fármacos cloroquina e quinacrina, dois antiparasitários, aumentaram a atividade de fagócitos contra *C. neoformans* e inibiram seu crescimento (HARRISON; GRIFFIN; LEVITZ, 2000; LEVITZ et al., 1997). Do mesmo modo, o anti-helmíntico mebendazol afetou *C. neoformans* internalizado por macrófagos, afetou biofilmes e demonstrou redução das dimensões capsulares da levedura. Ademais, demonstrou efeito antifúngico contra *C. gattii* (JOFFE et al., 2017). Evidentemente, estes são apenas alguns exemplos

de fármacos propostos para reposicionamento, existindo diversos outros exemplos que obtiveram efeitos antifúngicos. No entanto, são poucos os que de fato avançam para pesquisas clínicas.

1.6. Amiodarona

Amiodarona é um fármaco antiarrítmico de classe III de amplo espectro. Ele atua no miocárdio bloqueando canais de potássio, o que leva ao aumento do potencial de ação e diminuição da frequência cardíaca. Amiodarona também tem efeito de bloqueio de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo T. O seu efeito antifúngico foi caracterizado contra diversas espécies de fungos, como *C. neoformans*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* e *Fusarium oxysporum*, sendo essa atividade fungicida (COURCHESNE, 2002). Em *S. cerevisiae* foi demonstrado que a toxicidade de amiodarona está ligada à perturbação na homeostase do cálcio. Uma elevação bifásica de cálcio intracelular dose dependente de amiodarona foi observada. O primeiro pico ocorre extremamente rápido e é proveniente da entrada de cálcio extracelular, seguido de um aumento sustentado mais lento, proveniente tanto da entrada de cálcio extracelular quanto da liberação de cálcio das organelas intracelulares. Considerando a importância do vacúolo para o estoque de cálcio, os mutantes *pmc1* e *vcx1* de *S. cerevisiae* demonstraram elevação de cálcio intracelular em exposição a amiodarona. Também foi demonstrado que na ausência de Mid1, mas não de Cch1, a captação de cálcio foi reduzido, indicando a participação deste canal (COURCHESNE; OZTURK, 2003; GUPTA et al., 2003).

Investigando o efeito fungicida de amiodarona, foi demonstrado que o fármaco é capaz de ativar a produção de espécies reativas de oxigênio induzidas pelas mitocôndrias de *S. cerevisiae*, levando à fragmentação de filamentos mitocondriais (POZNIAKOVSKY et al., 2005). Para caracterizar o mecanismo de toxicidade de amiodarona, uma análise transcricional de *S. cerevisiae* foi realizada utilizando hibridização em microarranjos. A resposta desencadeada por amiodarona foi similar à resposta de elevação de cálcio intracelular, com ativação da via da calcineurina e translocação do Crz1 para o núcleo. Ademais, o fármaco desencadeia uma resposta de privação e bloqueio da progressão do ciclo celular (ZHANG; RAO, 2007). O efeito antifúngico de amiodarona parece estar ligado com o estado metabólico celular. Paradoxalmente, altas concentrações de cálcio extracelular demonstraram um efeito protetor contra o fármaco, do mesmo modo que a remoção total de cálcio extracelular

também obtém o mesmo efeito (MUEND; RAO, 2008). O mecanismo de toxicidade de amiodarona também foi estudado em *C. albicans*, na qual a atividade do fármaco foi ligada a estresses de cálcio e pH. Diversos genes relacionados à via do Ca^{2+} -calcineurina tiveram suas expressões moduladas pela adição do fármaco (GAMARRA et al., 2010). Em *C. neoformans* a ação de amiodarona ainda não foi caracterizada extensamente. No entanto, foi previamente demonstrado que amiodarona foi capaz de agir em leveduras internalizadas por macrófagos, um nicho dificilmente alcançado por fármacos antifúngicos (BUTTS et al., 2013).

A interação de amiodarona com azóis foi amplamente estudada, visando a proposta de uma terapia conjunta com fluconazol, o principal fármaco utilizado no tratamento da criptococose. Em *S. cerevisiae* o sinergismo com miconazol foi demonstrado (GUPTA et al., 2003), enquanto para *C. albicans*, o efeito sinérgico entre amiodarona e fluconazol foi demonstrado apenas para linhagens resistentes (GAMARRA et al., 2010; GUO et al., 2008). O mesmo foi observado para linhagens resistentes de *Candida tropicalis* (DA SILVA et al., 2013). Outros parâmetros da combinação de amiodarona e fluconazol foram avaliados em *C. albicans*, como o conteúdo de ergosterol, que diminuiu de maneira sinérgica quando os fármacos foram combinados. Ademais, o seu efeito no tratamento de um modelo murino de candidíase disseminada foi avaliado. O tratamento com amiodarona não impactou na carga fúngica renal. Quando os animais foram tratados com doses crescentes de fluconazol, combinadas com uma dose fixa de amiodarona, foi observado um efeito dose dependente nas cargas fúngicas em linhagens sensíveis ao fluconazol. Para as linhagens resistentes, amiodarona também não apresentou efeito antifúngico, no entanto a combinação de amiodarona e fluconazol levou a um forte efeito sinérgico (GAMARRA et al., 2010). Esses resultados demonstram o potencial de amiodarona como possível fármaco adjunto no tratamento da criptococose.

1.7. Nanocápsulas poliméricas

Diferentes estratégias têm sido propostas nas últimas décadas para controlar a distribuição de fármacos no organismo, de modo a diminuir a concentração em sítios não alvo e, conseqüentemente, evitar os efeitos adversos. Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico são uma classe de sistemas de distribuição submicrométrico que possibilitam o direcionamento de fármacos. As nanocápsulas poliméricas são vesículas, nas quais um núcleo lipídico é cercado por uma camada polimérica que é estabilizada por surfactantes (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003). O polímero tem grande

influência no controle de liberação do fármaco e é frequentemente um material biodegradável (POLETTTO et al., 2008). Os mais comuns são poliésteres hidrofóbicos, como poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e poli(caprolactona) (PCL) por sua biocompatibilidade e degradabilidade. Eles apresentam uma degradação lenta, causando uma resposta imune mínima (FANUN, 2010). A fase interna, composta por um componente lipídico, provê uma capacidade maior de carga de fármaco. Outras vantagens são a proteção contra degradação e redução de efeitos adversos. A seleção de qual óleo utilizar deve levar em consideração a ausência de toxicidade, capacidade de dissolver o fármaco e risco de degradação e/ou dissolução do polímero (COUVREUR et al., 2002; FANUN, 2010).

O fármaco é encapsulado na fase interna, preso na parede polimérica e distribuído nas pseudo-fases do sistema. Se saturado o sistema, o fármaco pode formar nanocristais que precipitam (POHLMANN et al., 2013). Técnicas têm sido desenvolvidas para criar nanocápsulas com superfícies funcionalizadas para evadir o sistema imune e direcionar fármacos. Isso pode ser realizado por incorporação de ligantes a receptores celulares específicos durante ou após a preparação das nanocápsulas. Um exemplo são nanocápsulas ligadas covalentemente à polietilenoglicol (PEG), que evadem o sistema imune e aumentam a meia-vida na corrente sanguínea. Capacidades bioadesivas podem ser obtidas ao recobrir as nanocápsulas com polímeros de carga positiva, como a quitosana (FANUN, 2010). As nanocápsulas poliméricas são produzidas por seis diferentes métodos com uma distribuição de tamanho estreita e diâmetros menores que 1 μm , o que está ligado à sua resposta biológica. O método de nanoprecipitação (também chamado de deposição interfacial de polímero pré-formado) é o mais frequentemente usado devido a sua reprodutibilidade e fácil manutenção. O método é uma combinação de emulsificação espontânea de gotículas lipídicas e precipitação do polímero na interface água-óleo. É necessário para este método que haja uma alta miscibilidade entre as fases aquosa e orgânica (FANUN, 2010; FRANK et al., 2015).

A caracterização físico-química das partículas é um importante passo a ser avaliado no desenvolvimento das formulações. Para medir o tamanho médio e a distribuição do tamanho das partículas são utilizadas técnicas como o espalhamento de luz dinâmico (DLS). Essa técnica usa a interação das partículas com um feixe de luz, medindo a intensidade de luz dispersa em um ângulo fixo. Deste modo é possível obter o tamanho, distribuição de tamanho e índice de polidispersão (PI), que indica a

homogeneidade da distribuição dos tamanhos. O método de difração de laser também fornece o tamanho médio ($D[4,3]$), a distribuição de tamanho e a polidispersão (SPAN) (FANUN, 2010). Outra medida importante na para caracterização das partículas é o potencial zeta, que é o potencial elétrico na bicamada interfacial entre o meio de dispersão e a camada de fluido aderida a superfície da partícula. Esse parâmetro pode ser determinado por mobilidade eletroforética, no qual um campo elétrico é aplicado na dispersão e as partículas migram para o eletrodo de carga oposta com uma velocidade proporcional à magnitude de seu potencial zeta (DELGADO et al., 2005). O potencial zeta é influenciado pela carga dos diferentes componentes da nanocápsula polimérica (FANUN, 2010).

Muitos benefícios são alcançados ao encapsular fármacos em nanocápsulas poliméricas, principalmente devido à propriedade de liberação controlada das nanocápsulas (FRANK et al., 2015). O encapsulamento aumenta a estabilidade química e fotoestabilidade dos fármacos (FONTANA et al., 2009; KÜLKAMP et al., 2009). A captação das substâncias pelas células e a interação entre fármacos e tecidos são melhorados, levando a um aumento da penetração do fármaco ou a uma biodistribuição modificada (BERNARDI et al., 2009; CHEN et al., 2014). Estudos também demonstram melhor eficácia e/ou biodisponibilidade *in vitro* e *in vivo*, devido aos níveis sanguíneos do fármaco serem mantidos por tempos mais longos (BERNARDI et al., 2009; DIMER et al., 2014; HAAS et al., 2009; PARK; BALAKRISHNAN; YANG, 2013). E, por fim, o encapsulamento de fármacos é capaz de diminuir os efeitos adversos (CONTRI et al., 2014). O desenvolvimento do AmBisome, uma formulação unilamelar lipossomal de anfotericina B nos anos 1990 foi o caso de maior sucesso do uso da nanotecnologia na formulação de antifúngicos. AmBisome demonstrou alta estabilidade, levando a diminuição da toxicidade aguda e crônica do fármaco (ADLER-MOORE; PROFFITT, 1993). Este caso de sucesso demonstra que a nanotecnologia pode ser usada para o desenvolvimento de formulações que possam ser administradas em doses mais altas com segurança, melhorando o perfil terapêutico.

A nanotecnologia tem sido utilizada para entregar fármacos a diversas partes do organismo humano, incluindo o tecido cerebral, devido ao seu tamanho e capacidade de terem sua superfície funcionalizada com ligantes (LI et al., 2017). As nanocápsulas também oferecem maior estabilidade nos fluidos biológicos e contra o metabolismo enzimático se comparadas com outros sistemas coloidais (YOO et al., 2005).

Nanocápsulas poliméricas recobertas com o surfactante polisorbato 80 foram utilizadas para transportar tacrina, utilizada no tratamento da doença de Alzheimer, e o antitumoral doxorubicina para o tecido cerebral. Foi demonstrado *in vitro* e *in vivo* que as nanocápsulas penetraram no endotélio cerebral e que a preparação acumulou-se, resultando em efeitos antitumorais (GULYAEV et al., 1999; WILSON et al., 2008). Quanto a produções contendo antifúngicos, nanopartículas lipídicas contendo itraconazol atingiram um pico de concentração cerebral quase duas vezes maior que o fármaco livre (LIM et al., 2014). Um método alternativo para os fármacos atingirem o sistema nervoso central é a administração intranasal, na qual o fármaco atinge o líquido cefalorraquidiano e bulbo olfatório por meio do nervo olfatório, evitando a barreira hematoencefálica (ref). Nanocápsulas contendo o antipsicótico olanzapina aumentaram a concentração do fármaco no cérebro com a administração intranasal (FONSECA et al., 2015). Assim, estes métodos alternativos de preparação e administração dos fármacos demonstra grande potencial para o tratamento de doenças que atingem o tecido cerebral, como a criptococose.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial do fármaco antiarrítmico amiodarona e o potencial de uma formulação nanotecnológica para utilização no tratamento da criptococose.

2.2. Objetivos Específicos

- I. Determinar as concentrações inibitórias mínimas (MIC) para a linhagem selvagem H99 e a linhagem mutante *pmc1* para amiodarona, e determinar seu sinergismo com fluconazol;
- II. Avaliar o efeito da exposição a amiodarona em determinantes de virulência de *C. neoformans*;
- III. Determinar o perfil de expressão de genes envolvidos na via de sinalização mediada por Ca^{2+} -calcineurina após exposição a amiodarona;
- IV. Determinar os níveis intracelulares de cálcio em células de *C. neoformans* expostas ao fármaco amiodarona;
- V. Determinar o efeito antifúngico de amiodarona em modelo *in vivo* de infecção;
- VI. Produzir e caracterizar nanocápsulas poliméricas contendo amiodarona, fluconazol e sua associação;
- VII. Analisar o efeito antifúngico das nanocápsulas poliméricas *in vivo* por diferentes vias de administração.

3. Manuscrito

Manuscrito submetido à revista *International Journal of Antimicrobial Agents*

Natália Kronbauer Oliveira, Luiza Abrahão Frank, Eamim Daidrê Squizani, Julia Catarina Vieira Reuwsaat, Bárbara Machado Marques, Heryk Motta, Ane Wichine Acosta Garcia, Uriel Perin Kinskovski, Augusto Schrank, Adriana Raffin Pohlmann, Charley Christian Staats, Sílvia Stanisçuaski Guterres, Marilene Henning Vainstein, and Livia Kmetzsch

Repurposing of amiodarone as a potential anticryptococcal drug

Contribuição dos autores:

NKO: delineamento experimental, aquisição de dados, análise e interpretação de dados, redação do manuscrito; LAF: delineamento experimental, aquisição dos dados, análise e interpretação dos dados, revisão crítica do manuscrito; EDS, JCVR, BMM, HM, AWAC e UPK: auxílio na aquisição de dados, análise e interpretação dos dados; ARP: delineamento experimental, suporte financeiro, revisão crítica do manuscrito; CCS e SSG: delineamento experimental, análise e interpretação dos dados, suporte financeiro, revisão crítica do manuscrito; AS e MHV: delineamento experimental, suporte financeiro, revisão crítica do manuscrito; LK: delineamento experimental, análise e interpretação dos dados, suporte financeiro, revisão crítica do manuscrito.

Repurposing of amiodarone as a potential anticryptococcal drug

Natália Kronbauer Oliveira ^a, Luiza Abrahão Frank ^b, Eamim Daidrê Squizani ^a, Julia Catarina Vieira Reuwsaat ^a, Bárbara Machado Marques ^a, Heryk Motta ^a, Ane Wichine Acosta Garcia ^a, Uriel Perin Kinskovski ^a, Augusto Schrank ^{a,d}, Adriana Raffin Pohlmann ^{b,c}, Charley Christian Staats ^{a,d}, Sílvia Stanisçuaski Guterres ^b, Marilene Henning Vainstein ^{a,d}, Lívía Kmetzsch ^{a,d,*}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS, Brazil

^c Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS, Brazil

^d Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

* Corresponding author. Address: Av Bento Gonçalves, 9500, Bloco IV, prédio 43421, sala 220. Porto Alegre, RS, Brazil. CEP: 91.501-970. Telephone number: +55 51 3308 7767.

E-mail address: liviak@cbiot.ufrgs.br (L. Kmetzsch)

Abstract

Cryptococcus neoformans is the etiological agent of cryptococcal meningoencephalitis and the recommended available treatment has low efficiency, with high toxicity and resistance as recurrent problems. In the search of new treatment protocols, repurposing of drugs and nanoencapsulation have proved promising for the treatment of fungal diseases. The antiarrhythmic drug amiodarone has demonstrated antifungal activity against a range of fungi, including *C. neoformans*. Here, considering the importance of calcium storage mediated by transporters on cryptococcal virulence, we evaluated the use of the calcium channel blocker amiodarone as an alternative therapy for cryptococcosis. *C. neoformans* H99 strain and the null mutant for calcium transporter Pmc1 displayed high sensitivity to amiodarone, which was also synergistic with fluconazole. Amiodarone treatment influenced some virulence factors, interrupting the calcium-calcineurin signaling pathway. Experiments with murine cryptococcosis models revealed that amiodarone treatment increased the fungal burden in the lungs, while its combination with fluconazole did not improve treatment compared to fluconazole alone. Lipid-core nanocapsules (LNC) loaded with amiodarone (LNC_{AMD}), fluconazole (LNC_{FLU}) or both (LNC_{AMD+FLU}) were produced to achieve a better efficacy. In an intranasal model of treatment, all the LNC formulations had an antifungal effect, including blank LNC (drug-unloaded) indicating a potential antifungal effect of the nanocarrier by itself. In an intraperitoneal treatment, LNC_{AMD} showed an enhanced anticryptococcal effect compared to the free drug, whereas LNC_{FLU} or LNC_{AMD+FLU} displayed no differences from the free drugs. In this way, nanotechnology using amiodarone formulations could be an effective therapy for cryptococcal infections.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, amiodarone, fluconazole, drug repurposing, lipid-core nanocapsule

1. Introduction

Invasive fungal infections are the major cause of mortality in immunocompromised individuals, particularly HIV-infected. Although antiretroviral therapy (ART) has decreased the incidence of systemic fungal infections in high-income countries, many low-income regions, such as sub-Saharan Africa, still present high rates of AIDS-related mortality [1–3]. The mortality related to fungal diseases was estimated at 700,000 annually, mainly due to four distinct infections: cryptococcal meningitis, *Pneumocystis pneumonia*, histoplasmosis and aspergillosis [4]. Cryptococcal meningoencephalitis is an opportunistic infection of humans caused by the encapsulated yeast *Cryptococcus neoformans* and is one of the main causes of death in HIV patients. According to 2013 estimates, there are 223,100 cases of cryptococcal meningitis globally, resulting in 181,100 fatalities [3]. *C. neoformans* cells produce virulence determinants, a polysaccharide capsule, melanin, phospholipase B1, and urease which promote its survival and dissemination in the host. These determinants also endow the fungus to evade antimicrobial agents, provide antioxidant properties and degrade membranes, promoting dissemination of fungal cells to the brain parenchyma [5–9].

Cryptococcosis treatment is mainly based on amphotericin B and fluconazole. Nevertheless, even for those receiving the preconized therapy of amphotericin B and fluconazole, mortality can still reach 70% in low-income countries making bold the necessity to develop new therapeutic protocols for improved cryptococcosis treatment [3,10]. The control of fungal diseases is a challenge due to the functional similarities between the fungal and host cellular machinery limiting the availability of specific targets for antifungal drugs with less undesired effects [1,11]. Repurposing of established drugs that exhibit antifungal activity represents a reliable alternative to speed up drug development [12,13].

Furthermore, nanotechnology-associated repurposing can help with drug-controlled release and targeting. The main advantages of encapsulating lipophilic drugs are increased chemical stability and/or photostability; increased uptake by cells; improved interaction with tissues, leading to better drug penetration and more efficient distribution; enhanced efficacy and/or bioavailability; and, finally, decreased side effects [14,15]. For instance, the nanoencapsulation of amphotericin B, the leading compound against fungi infection, decreased the drug toxicity, resulting in higher doses administrated safely and enhanced therapeutics [16]. Polymeric nanocapsules are formed by an oil core surrounded by a polymer wall. When the core is formed by a dispersion of a solid lipid in an oil, the structure is named lipid-core nanocapsules (LNC)

since this nanocarrier presents two diffusional barriers to deliver the drug encapsulated within the core [17]. In general, the lipid core is formed by sorbitan monostearate dispersed in capric-caprylic triglyceride and the polymer wall is composed of poly(ϵ -caprolactone). Considering that LNC are insoluble in water, polysorbate 80 is used to provide a hydrophilic corona stabilizing them as a colloidal dispersion in water.

The antiarrhythmic drug amiodarone has demonstrated antifungal activity against a range of fungi, including *C. neoformans* [18]. Evidence in *Saccharomyces cerevisiae* has shown that amiodarone disrupts Ca^{2+} homeostasis, triggering an immediate dose-dependent calcium influx, followed by continuous calcium release from the vacuole. Amiodarone also caused activation of the calcineurin pathway, leading to nuclear accumulation of the transcription factor Crz1, regulating Crz1-dependent genes [19,20].

Distinct processes in *C. neoformans* are dependent on the Ca^{2+} -calcineurin signaling pathway, including virulence and growth at 37 °C [21–24]. Different stress conditions lead to increased calcium levels sensed by calmodulin that trigger the calcium-calcineurin signaling pathway, ultimately resulting in the activation of the transcription factor Crz1 and expression of calcineurin-responsive genes [23,25,26]. Calcium pumps, channels and transporters are fundamental for regulating the levels of cytosolic calcium, such as the extracellular calcium uptake channel Cch1 [27], the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase Eca1 [28], and the vacuolar membrane proteins Vcx1 and Pmc1 [29,30]. *PMC1* knockout cells displayed decreased tolerance to calcium, reduced lung fungal burden and the absence of brain colonization in murine models of cryptococcosis [30,31]. Considering the impact of drug repurposing in the treatment of fungal diseases, the present study evaluated the potential of repurposing amiodarone as an anti-cryptococcal drug. Furthermore, nanotechnology was used to administer the new formulation through the intranasal and intraperitoneal routes in mice, indicating a viable alternative to treat cryptococcosis.

2. Experimental procedures

2.1. Fungal strains and media

The *C. neoformans* serotype A H99, *pmc1* mutant and *pmc1::PMC1* complemented strains [30] were maintained on YPD medium plates (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose and 1.5% agar). The media were supplemented with nourseothricin (100 μ g/mL) or hygromycin (200 μ g/mL) for selective growth of *pmc1* or *pmc1::PMC1* cells, respectively.

2.2. Chemicals

Standard amiodarone hydrochloride (AMD; Sigma-Aldrich) and fluconazole (FLU; Fagron) were utilized and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich) to produce 10 mM stock solutions.

2.3. Antifungal susceptibility testing and drug interaction evaluation

The minimum inhibitory concentration (MIC) of AMD and FLU for H99, *pmc1* and *pmc1::PMC1* were determined according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document M27-A2 [32]. Cultures were grown overnight at 30°C with shaking, and cells were adjusted to achieve a final concentration of 5×10^2 cells/mL in RPMI 1640 medium (Gibco Life Technologies). Plates were incubated at 37 °C for 48 h. The OD₆₀₀ was measured using a plate reader (Spectramax i3, Molecular Devices). AMD-FLU interaction were evaluated by checkerboard method, in which different ranges of drug concentrations were combined [33]. The MIC was defined as the lowest drug concentration showing at least 90% growth reduction compared with the drug-free control. Drug interaction was determined by the previously defined FIC index, and was defined as synergistic if the FIC index was < 1, additive if the FIC index was = 1 and antagonistic if the FIC index was > 1 [34].

2.4. Phenotypic characterization assays

Cultures of H99 and *pmc1* mutant strain were grown overnight in YPD medium at 30 °C with shaking for phenotypic characterization. Melanin production was examined on glucose-free asparagine medium plates, as previously reported [30], in the presence of increasing concentrations of FLU and AMD. Capsule formation was evaluated in cells that were cultivated for 72 h in minimal medium as described previously [30] with or without 3.125 µg/mL AMD (the half-MIC value for *pmc1*) or 0.78 µg/mL AMD and 0.125 µg/mL FLU. Evaluation of urease activity was conducted in Robert's urea broth as detailed previously [31] in the presence or absence of 3.125 µg/mL AMD or 0.78 µg/mL AMD and 0.125 µg/mL FLU.

2.5. Quantitative real-time RT-PCR analysis

Cultures of H99 and *pmc1* cells were grown overnight in YPD medium at 30 °C with shaking for RNA extraction. Subsequently, 5×10^7 cells of each strain were incubated for 10 min in RPMI 1640 medium at 37°C (Gibco Life Technologies) with or without 12.5 µg/mL AMD. RNA extraction, DNase treatment and reverse transcription reactions were performed as described [31]. Real-time PCR reactions were performed using the StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems). PCR thermal cycling conditions included an initial step at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s, 55 °C

for 15 s and 72 °C for 1 min. PCR reactions were performed in a final volume of 20 µL, containing 4 µL SYBR Green (1:100; Invitrogen), 0.1 µL dNTP (5 mM), 2 µL PCR buffer 10x, 1.2 µL MgCl₂, 0.5 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) supplemented with 0.4 µL (10 pmol) of each primer and 1 µL of the cDNA template. Each cDNA sample was analyzed in triplicate with each primer pair and melting curve analysis was performed at the end of the reaction to confirm the amplification of a single PCR product. Data were normalized to actin cDNA amplified in each set of PCR experiments and the 2^{-ΔCt} method was used to determine the relative expression [35]. The primers utilized in these experiments are listed in Table S1.

2.6. Determination of intracellular calcium levels

The intracellular free calcium concentration was determined using the acetoxymethyl ester of Fluo-4 (Fluo-4 AM; Thermo Fisher Scientific). Briefly, H99 and *pmc1* cells were cultured in YPD medium overnight with shaking at 30 °C. Then, 10⁷ cells of each strain were incubated for 1 h at 37 °C with shaking in MilliQ H₂O with or without 25 µg/mL AMD. The cells were loaded with 2 µM Fluo-4 AM for 1 h at 37 °C with shaking. Fluo-4 AM fluorescence was measured by flow cytometry (Guava easyCyte, Millipore) and a histogram was generated for each strain using FlowJo software.

2.7. Production of lipid-core nanocapsules (LNC)

The LNC were produced by the interfacial deposition of preformed polymer method [17]. Briefly, an organic phase consisting of poly(ε-caprolactone) (PCL; Sigma-Aldrich) (0.1 g), capric-caprylic triglyceride (CCT; Delaware) (0.165 mL), sorbitan monostearate (Span 60®; Sigma-Aldrich) (0.038.5 g) and dioxane (Vetec Química) (2 mL) dissolved in acetone (25 mL) was prepared before the addition of 0.002 g of AMD, FLU or a combination of 0.002 g of each drug. The solution was maintained under magnetic stirring at 40 °C, then injected into an aqueous phase (53 mL) containing polysorbate 80 (Tween 80®; Henrifarma) (76.8 mg). After 10 min, the translucent solution was evaporated under reduced pressure in a rotary evaporator at 37 °C (Rotavapor R II, Büchi) to 10 mL. The nanocapsules loaded with amiodarone hydrochloride, fluconazole and both drugs in combination were called, respectively, LNC_{AMD}, LNC_{FLU} and LNC_{AMD+FLU}. In parallel, lipid-core nanocapsules prepared without drugs was similarly produced and used as control (LNC).

2.8. Characterization of lipid-core nanocapsules

The lipid-core nanocapsule aqueous dispersions were evaluated regarding their pH, particle size distribution and zeta potential immediately after production. The pH was

determined by potentiometry (B474, Micronal), particle size was assessed by laser diffraction (Mastersizer 2000, Malvern Panalytical), and dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS, Malvern Panalytical) was performed as previously described [36]. Zeta potential was determined by electrophoretic mobility (Zetasizer Nano ZS, Malvern Panalytical) as previously described [36]. The drug content (n = 3) was determined after the drug extraction from the nanocapsules by high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection (HPLC-UV, Series 200, PerkinElmer). The quantification method was adapted [37,38] and validated according to our purposes. A C18 reversed phase column (Merck & Co) was used as stationary phase and an acetonitrile:water (35:65 v/v) mobile phase was used for FLU with detection at 260 nm. For AMD, acetonitrile:isopropanol:water:ammonia (80:10:10:0.025 v/v) was used as the mobile phase with detection at 260 nm for AMD. The injection volume was 20 μ L and calibration curves (n = 3) were made to determine the drug concentration showing linearity (r = 0.998) in the range of 2 to 20 μ g/mL.

2.9. *In vivo* studies

In vivo studies were conducted according to a previously described intranasal inhalation infection model [29] using five female BALB/c mice (CEMIB, UNICAMP; ~ 5 weeks old) for each treatment. Fungal cells were cultured overnight in 50 mL of YPD medium at 30 °C with shaking, washed twice and suspended in PBS. Mice were infected with 10⁵ yeast cells. For the free AMD analysis, at 24 h post-infection, mice were given single or combined treatment of AMD (10 mg/kg) and FLU (15 mg/kg, 5 mg/kg or 1 mg/kg) intraperitoneally. For nanocapsule analysis, mice were given the following treatment intranasally: AMD (0.5 mg/kg), FLU (0.5 mg/kg), AMD+FLU (0.5 mg/kg of each drug), LNC (0.5 mg/kg), LNC_{AMD} (0.5 mg/kg), LNC_{FLU} (0.5 mg/kg) and LNC_{AMD+FLU} (0.5 mg/kg of each drug). In another experimental group, the animals were given the following treatment intraperitoneally: AMD (1 mg/kg), FLU (1 mg/kg), AMD+FLU (1 mg/kg of each drug), LNC (1 mg/kg), LNC_{AMD} (1 mg/kg), LNC_{FLU} (1 mg/kg) and LNC_{AMD+FLU} (1 mg/kg of each drug). The treatments were given once daily for 13 days after the infection. On day 14 post-infection, animals were euthanized, and the lungs and brain were aseptically excised. Tissues were macerated in PBS and the resulting suspensions were plated on YPD for colony forming unit (CFU) determination. Combinatorial drug efficacy was assessed by *C. neoformans* organ burden reduction in the treated mice relative to the untreated controls. Mice were housed in groups of five and kept in filtered top-ventilated cages with food and water *ad libitum*. All efforts to minimize animal suffering were made. Before infection assays, mice were intraperitoneally anesthetized with 100 mg/kg ketamine and 16 mg/kg xylazine. Mice were examined twice daily for any signs of

suffering, defined as weight loss, weakness, or inability to obtain food or water. At the first signs of suffering, mice were humanely sacrificed.

3. Results

3.1. AMD has antifungal activity *in vitro* and synergy with FLU

The AMD fungicidal effect against *C. neoformans* H99 strain, the *pmc1* mutant and the complemented *pmc1::PMC1* strain were assessed. The MIC was established considering at least 90% inhibition of growth compared to the control, determined by spectrophotometry. It was defined as 12.5 µg/mL of AMD for H99 and *pmc1::PMC1* strains and 6.25 µg/mL for the *pmc1* strain (Fig 1). In order to evaluate the synergy between AMD and FLU, a checkerboard assay was performed. First, MIC values for FLU alone were obtained by testing a range of values between 64 µg/mL and 0.125 µg/mL, with all strains having a MIC of 0.5 µg/mL. Later, once combined different ranges of concentrations of the two drugs, AMD and FLU, MIC values decreased. To categorize the drug interaction, the FIC index was calculated based on the values for the drugs alone and in combination, being defined as 0.75 for all strains. Consequently, the drugs were considered synergistic (Table 1).

3.2. Urease activity is affected by AMD

Assays for polysaccharide capsule size formation, melanin production, and urease activity in the presence of AMD alone or in combination with FLU were performed to evaluate the effect of AMD on *C. neoformans* virulence factors. The relative capsule size was determined for H99 and *pmc1* strains in minimal medium for 72 h, with no significant differences observed between the treatment conditions or between H99 and *pmc1* strains (Fig 2A). Melanin formation was analyzed in an asparagine medium plate supplemented with L-DOPA, a natural catecholamine oxidized by the laccase enzyme [11]. The colonies analyzed in the solid medium showed no differences between the treatments or strains (Fig 2B). The incubation with AMD alone increased urease activity for both H99 and *pmc1* strains. However, when AMD and FLU were added in lower concentrations, this effect is only observed for the H99 strain (Fig 2C). Taken together these results demonstrate that AMD affects a few of the major virulence factors of *C. neoformans*, promoting a misbalance to the cell resulting in cell death.

3.3. Genes related to the Ca²⁺-calcineurin pathway and virulence factors are differentially expressed in the presence of AMD

Considering that AMD is a calcium channel blocker, we sought to determine if the expression of genes related to the Ca²⁺-calcineurin signaling pathway could be altered

by exposure to the drug. The expression patterns of genes encoding the calcium sensor calcineurin (*Cna1*), the transcription factor *Crz1*, and the transporters *Cch1*, *Eca1*, *Vcx1* and *Pmc1* were evaluated by RT-qPCR in H99 and *pmc1* strain. AMD treatment of H99 cells led to increased expression of *CRZ1*, *VCX1*, and *PMC1*, while levels of *CCH1* were decreased as compared to control conditions (Fig 3). In the absence of *PMC1*, AMD treatment causes an increase of *VCX1*, suggesting that AMD treatment increases intracellular calcium levels and activates the Ca^{2+} -Calcineurin pathway. However, the calcineurin and the reticulum transporter coding genes *CNA1* and *ECA1* presented no difference in their transcript levels (Fig 3).

3.4. AMD increases the levels of free intracellular calcium

Employing Fluo-4 AM fluorescence, the calcium cell levels were evaluated. The H99 strain has very low levels of intracellular calcium in control conditions as compared to the *pmc1* strain, consistent with the lack of a transporter to the vacuole, the main stocking organelle for calcium. However, the addition of AMD to the cells increased the intracellular uptake as compared to the respective strain controls (Fig 4A, B). Considering that an excess of intracellular calcium is toxic to the cell, the unrestrained increase in calcium uptake might be the primary mode of action of AMD in yeast cells.

3.5. AMD has unexpected effects in murine cryptococcal infection

To evaluate the antifungal effect of AMD in a murine model, mice were infected intranasally with the H99 strain, treated for 13 days using intraperitoneal administration of drugs and the CFU measured in lung tissues (Fig 5). Mice treated with 15 mg/kg, 5 mg/kg and 1 mg/kg of FLU had a dose-dependent decrease in the lung fungal burden. Conversely, the single treatment with 10 mg/kg of AMD increased the fungal burden in the lungs. When the FLU and AMD treatments were combined the antifungal capacity remained equivalent to those of FLU alone, indicating that the antifungal effect in those groups is due to FLU activity only. These results suggest that AMD in its free form and in such high dosage is not efficient against cryptococcosis, even causing increased fungal burden in some animals. Since in the *in vitro* experiments AMD was active to control *C. neoformans*, we analyzed a different form of administration in the murine model.

3.6. Physicochemical characteristics of lipid-core nanocapsules

Thus, we sought whether a nanotechnological approach would improve the action of the drugs and reduce the undesired effects. The analysis of particle size by laser diffraction demonstrated only populations of nanometric size, illustrated in a radar

chart (Fig 6). It shows, in 8 axes, the mean diameters and diameters of nanocapsules at percentiles 10, 50 and 90 under the size distribution curves determined by volume and by number of nanoparticles. The polydispersity of diameters ($\text{span}=[d(90)-d(10)]/d(50)$) lower than 2 for all formulations indicated that they were all suitable for pharmaceutical applications [39].

All LNC formulations (drug-loaded or blank LNC) showed narrow size distributions by dynamic light scattering analysis, which mean hydrodynamic diameters were around 200 nm, with similar polydispersity index (PDI ~0.22). Therefore, the incorporation of the drugs into the nanocapsules did not significantly change its size. For all formulations, the zeta potential was slight negative close to -8 mV, taking into account the presence of polyester (PCL) and non-ionic surfactant (polysorbate 80) at the interface particle/water [17]. All formulations showed a slightly acid pH of 6.

3.7. *In vivo* treatment using LNC alters the AMD effect

The *in vivo* effect of the drugs in the form of LNC altered the antifungal effect of AMD. After 13 days of intraperitoneal treatment with 1 mg/kg of the free or encapsulated drugs, the fungal burden in lung tissues was measured. LNC_{AMD} reverted the lack of activity of AMD to control fungal burden when used as a free drug to mice ($p < 0.05$) (Fig 7A). Therefore, the use of LNC_{AMD} resulted in effects similar to those found during the *in vitro* experiments. Moreover, FLU showed a decrease in CFU that was also found in the combined treatment FLU/AMD, without further antifungal activity due to AMD addition. LNC_{FLU} and LNC_{AMD+FLU} showed the same antifungal activity as the free drugs. In the intranasal treatment performed under the same experimental conditions, a completely different profile was observed with 0.5 mg/kg of the drugs administered. The effects of free FLU and AMD had considerable heterogeneity between animals, not observed in the co-treatment or in the LCN treated groups. All the lipid-core nanocapsules groups caused decrease in fungal burden compared to the control group (Fig 7B). Noticeably, the control LNC, produced without drug, reduced fungal burden indicating a possible antifungal effect of the formulation itself.

4. Discussion

Drug repurposing has emerged as a promising alternative to treat *C. neoformans* infections, considering their established toxicology and pharmacology [40]. Courchesne et al. [18] determined a potent fungicidal effect of the antiarrhythmic drug AMD against *C. neoformans* and several other fungi *in vitro*. The present study further evaluated this antifungal effect, both *in vitro* and *in vivo* against a wild type strain and a mutant with defects in calcium mobilization. The *pmc1* mutant demonstrated a higher sensitivity to

AMD compared to the wild-type H99 and reconstituted *pmc1:PMC1* strains. The increased sensibility of *pmc1* was associated with an increase in intracellular calcium caused by AMD. As previously demonstrated in *S. cerevisiae*, AMD triggered a dose-dependent elevation in intracellular calcium [19]. Our data obtained with Fluo-4 AM fluorescence presented the same profile (Fig 4) demonstrating the undoubted effect of AMD in the homeostasis of calcium and a possible mechanism of action, considering that the excess of calcium is toxic to the cell. Furthermore, *pmc1* mutant had much higher calcium concentration than H99 in control conditions, probably due to the mutant's impaired capacity to direct calcium to the vacuole.

To further explore the effects of AMD in calcium homeostasis, we analyzed the transcriptional response of genes involved in the Ca^{2+} -calcineurin pathway, as previously demonstrated that AMD targets this pathway in *S. cerevisiae* [20]. The increase in transcription of *CRZ1* gene revealed in this study for *C. neoformans* is in agreement with the results reported in *C. albicans* [41], as is the upregulation of *PMC1* when exposed to AMD, which is consistent with the increase in intracellular calcium levels. There was also an increase in *VCX1* expression, but only in the *pmc1* mutant, possibly due to a compensatory mechanism because of the absence of the Pmc1 transporter. However, *CCH1* was downregulated in H99, contrary to the upregulation observed in *C. albicans* [41], but consistent with its localization in the extracellular membrane. This transcriptional profile further reinforces the possible mechanism of AMD action, of increasing intracellular calcium and activation of the calcineurin pathway, probably leading to increased stress causing disruption in nutrient sensing and delaying cell cycle progression [20].

AMD and FLU combined were synergistic against *C. neoformans*, as previously demonstrated for *S. cerevisiae* [19]. *C. albicans* and *Candida tropicalis* strains resistant to FLU present AMD-FLU synergy, while susceptible strains usually do not [41,42]. Nonetheless, AMD and FLU were already established in the literature as drugs that enhance each other's activities. These two drugs also affected the urease activity, which was increased with the addition of AMD and FLU in both H99 and *pmc1* mutant strains. Despite urease being the main mechanism for paracellular transmigration, no significant fungal burden was found in brain tissues of mice treated with AMD (results not shown). Furthermore, recent findings by our group indicate that intracellular calcium levels might influence urease activity [31].

AMD treatment induced an increase in mice lung fungal burden, suggesting a possible increase in the fungal virulence. Several studies have demonstrated that

calcium channel blockers can act as immunosuppressants, inhibiting the activation of T cells, mast cells and macrophages [43]. AMD, although not used in those studies, might have the same effects, hence decreasing the clearance of the fungus. Considering the benefits of the encapsulation of drugs, such as increased efficacy, bioavailability and decreased side effects, we produced lipid-core nanocapsules containing AMD and FLU. In mice treated intraperitoneally, LNC_{AMD} enhanced antifungal activity compared with the free AMD, while the LNC_{FLU} formulation had no effect. Lipid-core nanocapsules containing FLU were already produced for the treatment of resistant *C. albicans*. They presented a high encapsulation efficiency and antifungal effect, however the drug concentration used was considerably higher [44]. An algorithm that considers the drug distribution coefficient (log D) to determine its distribution in the lipid-core nanocapsule could explain the different efficiencies of the nanocapsules developed [45]. According to the model, LNC_{FLU} can be categorized as a type II, in which the drug is dispersed on the surface of the nanocapsule, what would still present itself as a high encapsulation efficiency. In contrast, LNC_{AMD} is classified as type VI, in which the drug is mainly encapsulated at the core, so this difference in encapsulation may be responsible for the better results with LNC_{AMD}. Furthermore, it has been shown that nanocapsule agglomeration in the abdominal cavity after intraperitoneal administration is possible, leading to an impaired distribution in the organism [46]. Diversely, the intranasal treatment induced higher homogeneity between animals and indicated an antifungal effect for all nanocapsule formulations that was not observed for the free drugs. The antimicrobial effect of the LNC prepared without drug has been reported previously, although the formulation is not exactly the same [47,48], and indicates that the formulation itself might have antifungal activity.

Summarizing, this study demonstrated that AMD presents an *in vitro* effect against *C. neoformans* and synergy with the antifungal FLU. While AMD did not demonstrate *in vivo* activity against intranasal infection in its free form, the nanoencapsulation promoted an upgrade in the antifungal effect of the drug. At the moment the reasons for that can be only suggested, however, it is important that the form of delivery of AMD can result in differences in its effects to the host. In conclusion, the use of lipid-core nanocapsules in drug repurposing represents a viable alternative to improve the control of cryptococcosis infection.

Funding: This work was supported by grants from the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS and PRONEX 2014).

Declaration of interest: None.

Ethical approval: The use of animals in this work was performed with approval of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul Ethics Committee for Use of Animals (CEUA Project Number 34285).

References

- [1] Armstrong-James D, Meintjes G, Brown GD. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends Microbiol* 2014;22:120–7. doi:10.1016/j.tim.2014.01.001.
- [2] Limper AH, Adenis A, Le T, Harrison TS. Fungal infections in HIV/AIDS. *Lancet Infect Dis* 2017;17:e334–43. doi:10.1016/S1473-3099(17)30303-1.
- [3] Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis* 2017;17:873–81. doi:10.1016/S1473-3099(17)30243-8.
- [4] Denning DW. Minimizing fungal disease deaths will allow the UNAIDS target of reducing annual AIDS deaths below 500 000 by 2020 to be realized. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2016;371. doi:10.1098/rstb.2015.0468.
- [5] Kwon-Chung KJ, Rhodes JC. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1986;51:218–23.
- [6] Emery HS, Shelburne CP, Bowman JP, Fallon PG, Schulz CA, Jacobson ES. Genetic study of oxygen resistance and melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1994;62:5694–7.
- [7] Syme RM, Bruno TF, Kozel TR, Mody CH. The capsule of *Cryptococcus neoformans* reduces T-lymphocyte proliferation by reducing phagocytosis, which can be restored with anticapsular antibody. *Infect Immun* 1999;67:4620–7.
- [8] Santangelo R, Zoellner H, Sorrell T, Wilson C, Donald C, Djordjevic J, et al. Role of Extracellular Phospholipases and Mononuclear Phagocytes in Dissemination of Cryptococcosis in A Murine Model. *Infect Immun* 2004;72:2229–39. doi:10.1128/IAI.72.4.2229-2239.2004.
- [9] Olszewski MA, Noverr MC, Chen GH, Toews GB, Cox GM, Perfect JR, et al. Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. *Am J Pathol* 2004;164:1761–71. doi:10.1016/S0002-9440(10)63734-0.
- [10] Mourad A, Perfect J. Present and Future Therapy of *Cryptococcus* Infections. *J Fungi* 2018;4:79. doi:10.3390/jof4030079.
- [11] Idnurm A, Bahn YS, Nielsen K, Lin X, Fraser JA, Heitman J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:753–64. doi:10.1038/nrmicro1245.
- [12] Santos-Gandelman J, Rodrigues ML, Machado Silva A. Future perspectives for cryptococcosis treatment. *Expert Opin Ther Pat* 2018;28:625–34.

- doi:10.1080/13543776.2018.1503252.
- [13] Truong M, Monahan LG, Carter DA, Charles IG. Repurposing drugs to fast-track therapeutic agents for the treatment of cryptococcosis. *PeerJ* 2018;6:e4761. doi:10.7717/peerj.4761.
- [14] Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharm Res* 2006;23:1417–50. doi:10.1007/s11095-006-0284-8.
- [15] Frank LA, Contri R V., Beck RCR, Pohlmann AR, Guterres SS. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology* 2015;7:623–39. doi:10.1002/wnan.1334.
- [16] Adler-Moore JP, Proffitt RT. Development, characterization, efficacy and mode of action of ambisome, a unilamellar liposomal formulation of amphotericin b. *J Liposome Res* 1993;3:429–50. doi:10.3109/08982109309150729.
- [17] Jäger E, Venturini CG, Poletto FS, Colomé LM, Pohlmann JPU, Bernardi A, et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *J Biomed Nanotechnol* 2009;5:130–40. doi:10.1166/jbn.2009.1004.
- [18] Courchesne WE. Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300:195–9. doi:10.1124/jpet.300.1.195.
- [19] Gupta S Sen, Ton VK, Beaudry V, Rulli S, Cunningham K, Rao R. Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. *J Biol Chem* 2003;278:28831–9. doi:10.1074/jbc.M303300200.
- [20] Zhang YQ, Rao R. Global disruption of cell cycle progression and nutrient response by the antifungal agent amiodarone. *J Biol Chem* 2007;282:37844–53. doi:10.1074/jbc.M707593200.
- [21] Odom A, Muir S, Lim E, Toffaletti DL, Perfect J, Heitman J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J* 1997;16:2576–89. doi:10.1093/emboj/16.10.2576.
- [22] Cruz MC, Fox DS, Heitman J. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J* 2001;20:1020–32. doi:10.1093/emboj/20.5.1020.
- [23] Kozubowski L, Lee SC, Heitman J. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cell Microbiol* 2009;11:370–80. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01273.x.
- [24] Kozubowski L, Aboobakar EF, Cardenas ME, Heitman J. Calcineurin colocalizes with P-bodies and stress granules during thermal stress in *cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 2011;10:1396–402. doi:10.1128/EC.05087-11.
- [25] Yoshimoto H, Saltsman K, Gasch AP, Li HX, Ogawa N, Botstein D, et al. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2002;277:31079–88. doi:10.1074/jbc.M202718200.
- [26] Lev S, Desmarini D, Chayakulkeeree M, Sorrell TC, Djordjevic JT. The Crz1/Sp1

- Transcription Factor of *Cryptococcus neoformans* Is Activated by Calcineurin and Regulates Cell Wall Integrity. *PLoS One* 2012;7:e51403. doi:10.1371/journal.pone.0051403.
- [27] Liu M, Du P, Heinrich G, Cox GM, Gelli A. Cch1 mediates calcium entry in *Cryptococcus neoformans* and is essential in low-calcium environments. *Eukaryot Cell* 2006;5:1788–96. doi:10.1128/EC.00158-06.
- [28] Fan W, Idnurm A, Breger J, Mylonakis E, Heitman J. Eca1, a sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, is involved in stress tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2007;75:3394–405. doi:10.1128/IAI.01977-06.
- [29] Kmetzsch L, Staats CC, Simon E, Fonseca FL, de Oliveira DL, Sobrino L, et al. The vacuolar Ca²⁺ exchanger *vcx1* is involved in calcineurin-dependent Ca²⁺ tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 2010;9:1798–805. doi:10.1128/EC.00114-10.
- [30] Kmetzsch L, Staats CC, Cupertino JB, Fonseca FL, Rodrigues ML, Schrank A, et al. The calcium transporter *Pmc1* provides Ca²⁺ tolerance and influences the progression of murine cryptococcal infection. *FEBS J* 2013;280:4853–64. doi:10.1111/febs.12458.
- [31] Squizani ED, Oliveira NK, Reuwsaat JCV, Marques BM, Lopes W, Gerber AL, et al. Cryptococcal dissemination to the central nervous system requires the vacuolar calcium transporter *Pmc1*. *Cell Microbiol* 2018;20. doi:10.1111/cmi.12803.
- [32] National Committee on Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard — second edition. vol. 22. 2002.
- [33] Afeltra J, Vitale RG, Mouton JW, Verweij PE. Potent Synergistic In Vitro Interaction between Nonantimicrobial Membrane-Active Compounds and Itraconazole against Clinical Isolates of *Aspergillus fumigatus* Resistant to Itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1335–43. doi:10.1128/AAC.48.4.1335-1343.2004.
- [34] Berenbaum MC. A method for testing for synergy with any number of agents. *J Infect Dis* 1978;137:122–30. doi:10.1093/infdis/137.2.122.
- [35] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001;25:402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [36] Frank LA, Chaves PS, D'Amore CM, Contri R V., Frank AG, Beck RCR, et al. The use of chitosan as cationic coating or gel vehicle for polymeric nanocapsules: Increasing penetration and adhesion of imiquimod in vaginal tissue. *Eur J Pharm Biopharm* 2017;114:202–12. doi:10.1016/j.ejpb.2017.01.021.
- [37] Bolderman RW, Hermans JJR, Maessen JG. Determination of the class III antiarrhythmic drugs dronedarone and amiodarone, and their principal metabolites in plasma and myocardium by high-performance liquid chromatography and UV-detection. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2009;877:1727–31. doi:10.1016/j.jchromb.2009.04.029.
- [38] Sadasivudu P, Shastri N, Sadanandam M. Development and validation of RP-HPLC and

- UV methods of analysis for fluconazole in pharmaceutical solid dosage forms. *Int J ChemTech Res CODEN n.d.*;1:1131–6.
- [39] Bianchin MD, Kulkamp-Guerreiro IC, De Oliveira CP, Contri RV, Guterres SS, Pohlmann AR. Radar charts based on particle sizing as an approach to establish the fingerprints of polymeric nanoparticles in aqueous formulations. *J Drug Deliv Sci Technol* 2015;30:180–9. doi:10.1016/j.jddst.2015.10.015.
- [40] Butts A, Krysan DJ. Antifungal Drug Discovery: Something Old and Something New. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002870. doi:10.1371/journal.ppat.1002870.
- [41] Gamarra S, Rocha EMF, Zhang YQ, Park S, Rao R, Perlin DS. Mechanism of the synergistic effect of amiodarone and fluconazole in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:1753–61. doi:10.1128/AAC.01728-09.
- [42] Da Silva CR, De Andrade Neto JB, Costa Sidrim JJ, Ferreira Ângelo MR, Ferreira Magalhães HI, Cavalcanti BC, et al. Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:1691–700. doi:10.1128/AAC.00966-12.
- [43] Liu W, Matsumori A. Calcium channel blockers and modulation of innate immunity. *Curr Opin Infect Dis* 2011;24:254–8. doi:10.1097/QCO.0b013e3283463e5b.
- [44] Domingues Bianchin M, Borowicz SM, da Rosa Monte Machado G, Pippi B, Stanisçuaski Guterres S, Raffin Pohlmann A, et al. Lipid core nanoparticles as a broad strategy to reverse fluconazole resistance in multiple *Candida* species. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2019;175:523–9. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.12.011.
- [45] Oliveira CP, Venturini CG, Donida B, Poletto FS, Guterres SS, Pohlmann AR. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. *Soft Matter* 2013;11:41–50. doi:10.1039/c2sm26959g.
- [46] Bulcão RP, Freitas FA, Venturini CG, Dallegrave E, Durgante J, Göethel G, et al. Acute and subchronic toxicity evaluation of poly(ϵ -Caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. *Toxicol Sci* 2013;132:162–76. doi:10.1093/toxsci/kfs334.
- [47] Cé R, Marchi JG, Bergamo VZ, Fuentefria AM, Lavayen V, Guterres SS, et al. Chitosan-coated dapsone-loaded lipid-core nanocapsules: Growth inhibition of clinical isolates, multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus* ssp. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2016;511:153–61. doi:10.1016/j.colsurfa.2016.09.086.
- [48] De Marchi JGB, Silva FK, Freitas AL, Fuentefria AM, Pohlmann AR, Guterres SS. Triclosan resistance reversion by encapsulation in chitosan-coated-nanocapsule containing α -bisabolol as core: development of wound dressing. *Int J Nanomedicine* 2017;12:7855–68. doi:10.2147/IJN.S143324.

TABLE

Table 1: Checkerboard test

Strain	MIC ^a		MIC ^a combination		FIC index ^b	Interpretation
	AMD	FLU	AMD	FLU		
H99	12.5	0.5	3.125	0.25	0.75	Synergy
<i>pmc1</i>	6.25	0.5	1.56	0.25	0.75	Synergy
<i>pmc1::PMC1</i>	12.5	0.5	3.125	0.25	0.75	Synergy

a Values in µg/mL

b Berenbaum MC, 1978 [34]

Abbreviations: AMD – amiodarone; FLU – fluconazole

FIGURES

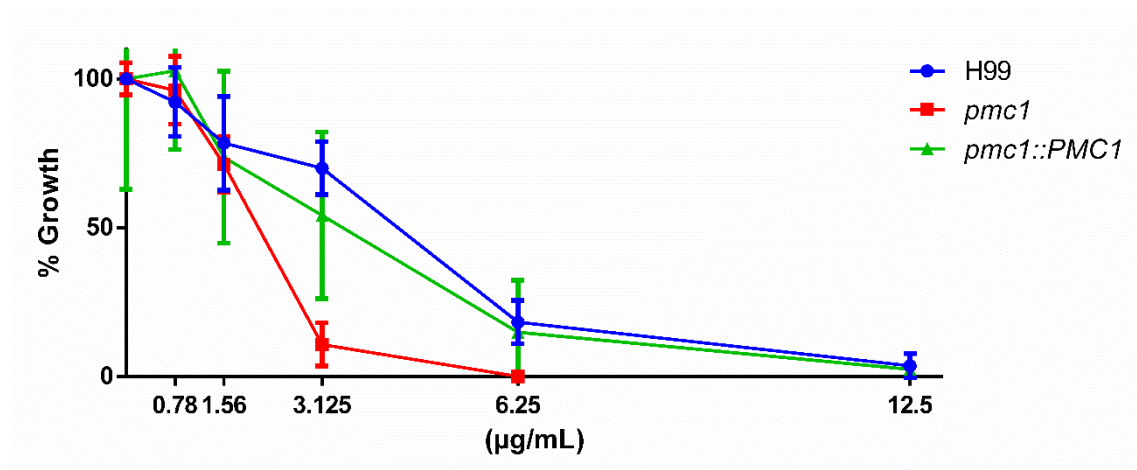


Fig 1: Minimum inhibitory concentration determination for *C. neoformans* strains H99 and *pmc1*. The assays were performed in RPMI-1640 medium supplemented with 0.78 – 12.5 µg/mL AMD for 48 h at 37°C. Subsequently, the optical density was evaluated at 600 nm for yeast growth and normalized by control samples in RPMI-1640 medium.

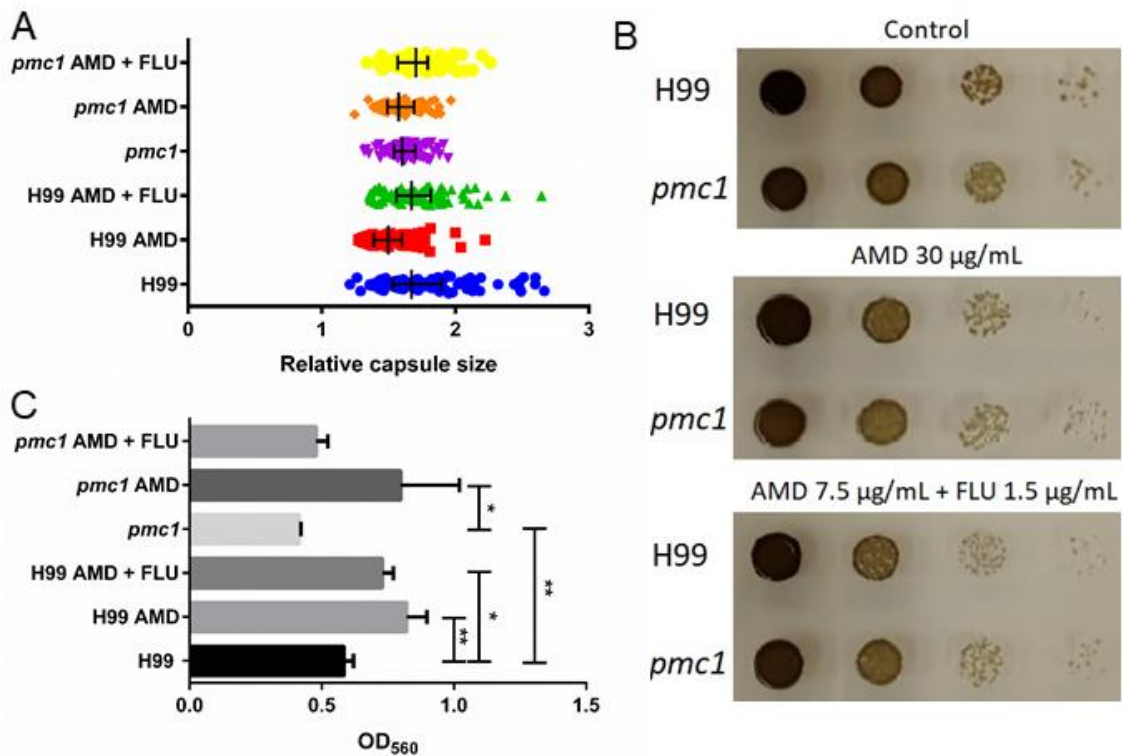


Fig 2: AMD affects phenotypic characteristics of *C. neoformans*. (A) Polysaccharide capsule formation was determined in minimal medium for H99 and *pmc1* cells for 72 hours, 37°C, 5% CO₂ in the presence or absence of 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AMD or 0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AMD and 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FLU. Cells were counterstained with *India Ink* and measured using IMAGEJ software. Bars indicate median with interquartile ranges. (B) Melanin formation was evaluated for H99 and *pmc1* cells on glucose-free asparagine medium plates supplemented with L-DOPA. Plates were incubated for 5 days at 37°C in the presence or absence of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AMD or 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AMD and 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FLU. (C) Urease activity was evaluated for H99 and *pmc1* cells in Robert's urea broth for 4 h at 37°C, supplemented with 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AMD or 0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AMD and 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FLU. Subsequent evaluation of OD at 560 nm. Error bars indicate standard deviation. Statistical analysis was conducted using Student's *t* test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

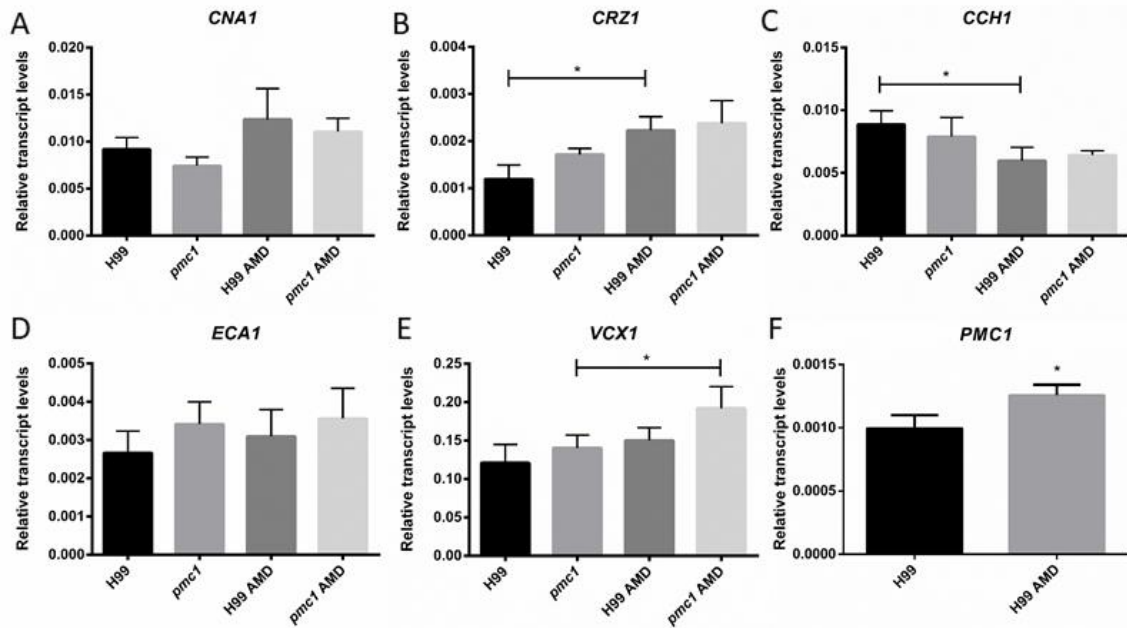
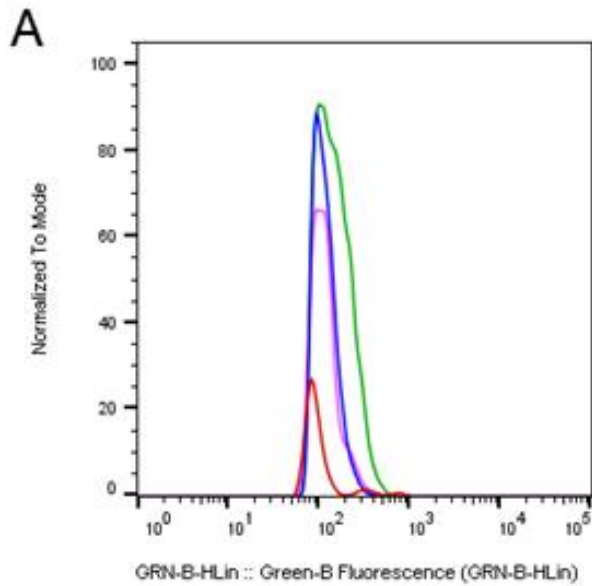


Fig 3: AMD alters expression of genes involved in the calcium-calcineurin signaling pathway and virulence determinants. Transcript levels of calcineurin (*CNA1*), *CRZ1* and calcium transporters (*CCH1*, *ECA1*, *VCX1* and *PMC1*) were quantified by RT-qPCR. H99 and *pmc1* cells were exposed to control conditions or 12.5 µg/mL AMD for 10 min in RPMI-1640 medium. Data was normalized to actin and error bars represent standard deviation. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA with Tukey's post hoc test or Student's *t* test. * p < 0.05, ** p < 0.01.



Sample Name	Count
H99	27,0
H99 AMD	1406
pmc1	182
pmc1 AMD	2256

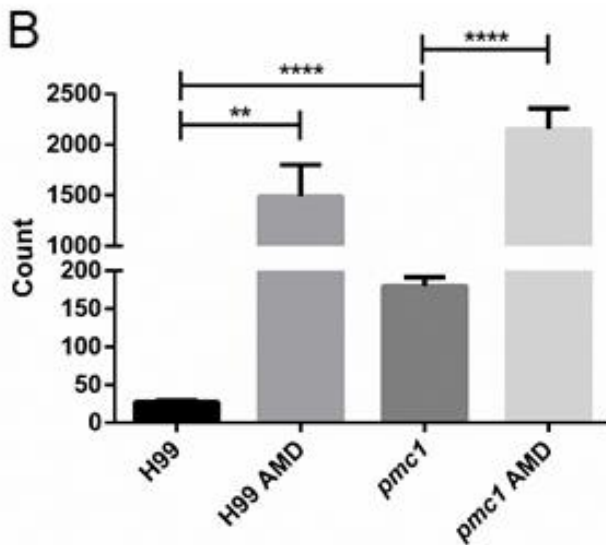


Fig 4: AMD affects intracellular calcium levels in *C. neoformans*. Intracellular calcium was evaluated during incubation with 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AMD for 1 h at 37°C, followed by incubation with 2 μM Fluo 4-AM fluorescent marker for 1 h at 37°C. Flow cytometry analysis was performed. (A) Histograms (count normalized to Mode X Green-B fluorescence) were generated by FlowJo software. Normalized to Mode = scales as percentages of the maximum count. (B) Analysis of total fluorescent cell counts. Error bars represent standard deviation and statistical analysis was performed by Student's *t* test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

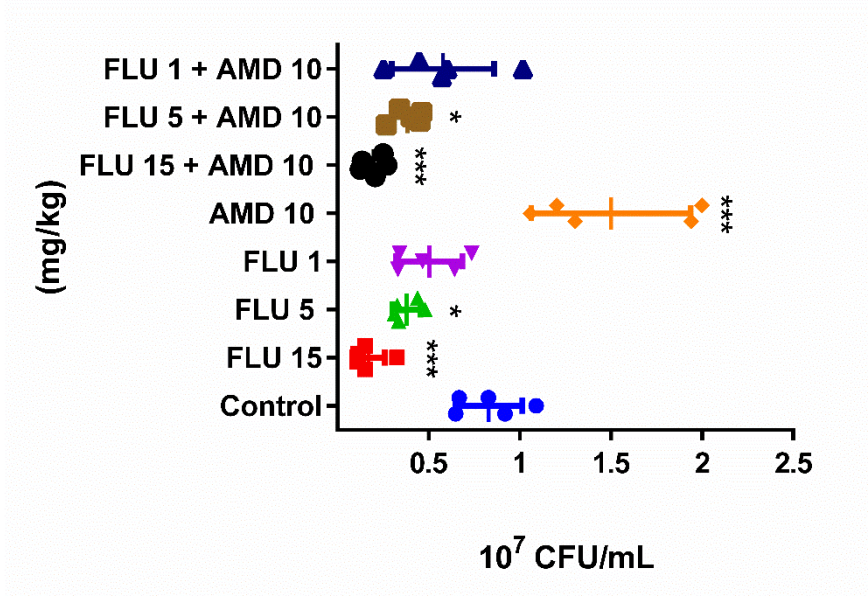


Fig 5: AMD fails to demonstrate an antifungal effect in a murine cryptococcosis model. Female BALB/c mice were challenged with H99 cells intranasally. At 24 h post-infection, mice were given single or combination treatments of AMD (10 mg/kg) and/or FLU (15, 5 and 1 mg/kg) intraperitoneally. The fungal burden was determined after 13 days of treatment in the lungs. Error bars indicate standard deviation and statistical analysis was performed by one-way ANOVA with Tukey's post hoc test comparing each treatment with the control group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

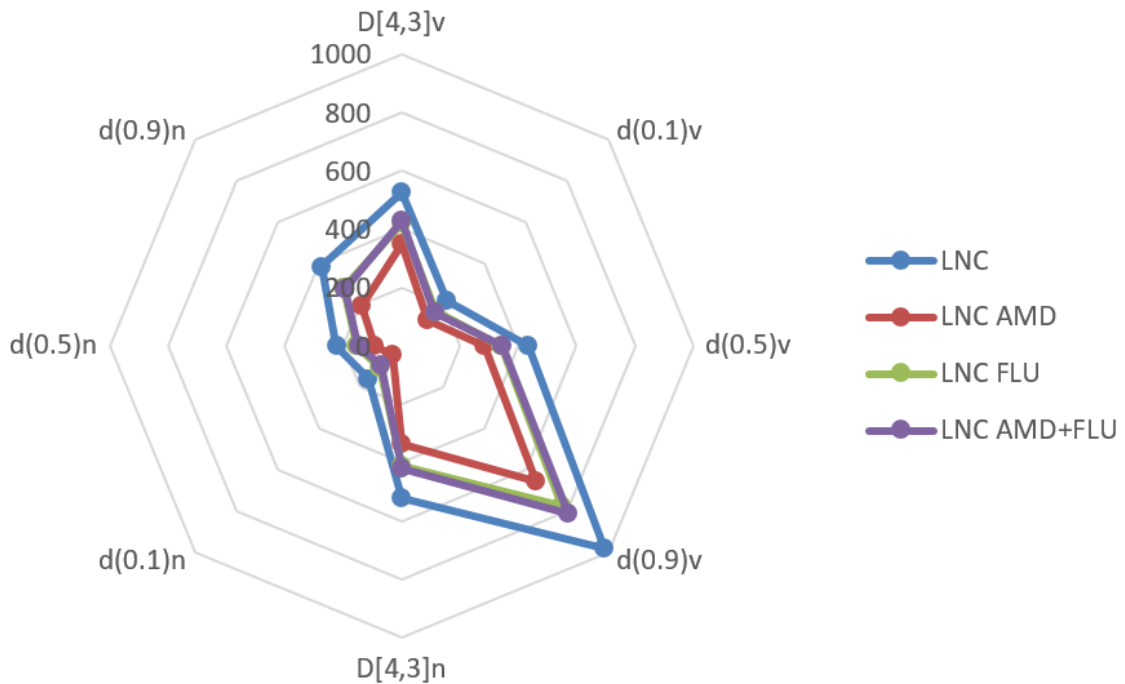


Fig 6: Radar chart of Phi-LNC presenting the volume-weighted mean diameters (D[4,3]) and the diameters at percentiles 10, 50 and 90 under the size distribution curves by

volume and by number of particles. The results obtained were the mean of three analyses for each batch.

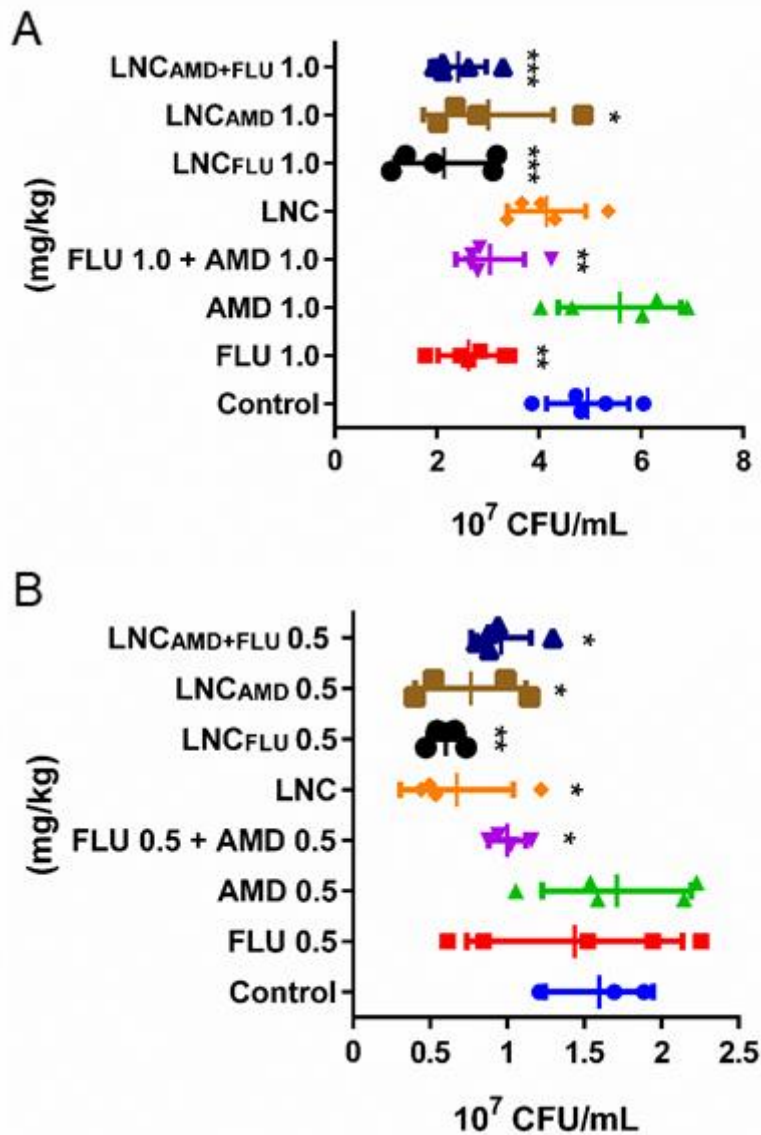


Fig 7: AMD nanocapsules demonstrate enhanced antifungal activity against *C. neoformans*. Female BALB/c mice were challenged with H99 cells intranasally. (A) At 24 h post-infection, mice were given 1 mg/kg treatments of AMD, FLU, AMD+FLU, LNC, LNC_{AMD}, LNC_{FLU} and LNC_{AMD+FLU} intraperitoneally. An outlier animal was excluded from the LNC_{AMD} group. (B) At 24 h post-infection, mice were given 0.5 mg/kg treatments of AMD, FLU, AMD+FLU, LNC, LNC_{AMD}, LNC_{FLU} and LNC_{AMD+FLU} intranasally. Outlier animals were excluded from the control, LNC, LNC_{FLU} and LNC_{AMD} groups. Fungal burden was determined after 13 days of treatment in the lungs. Error bars indicate standard deviation. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA with Tukey's post hoc test comparing each treatment with the control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Table S1: Primers sequence list

Primer	Sequence (5'-3')
Cna1F	TGGCTCAGAAAAGACAAACGAG
Cna1R	TTCCGATACATCCGATAACCG
Crz1F	CCGATAAGTGGATTGAAGGAAG
Crz1R	ATGGGATTGTGGAGAAGGAAC
Cch1F	GCAAACCTCCGTCCCAACTAC
Cch1R	GCACCTCGTTCAGCAGATTC
Eca1F	GAGAGGCTTATGGCGAAAAC
Eca1R	ATGGCGAGGATGAATGAGAC
Vcx1F	ATCGCCTTGTTTGTTCATTCCC
Vcx1R	TCATCAGGACCATACCTTCCA
Pmc1F	GCCAACCAATCTCTTCGTAC
Pmc1R	TCTACCGCCTCTCTTACACC
ActF	GCAGAACCGAGAGAAGATGAC
ActR	CGGAAGCGTAAAGAGAGAGAAC

4. Discussão

O tratamento pouco efetivo da meningite causada por *C. neoformans* devido à baixa especificidade dos antifúngicos disponíveis ou ao seu mecanismo de ação ser apenas fungistático leva à alta mortalidade de portadores do vírus HIV acometidos por esse patógeno oportunista. A ocorrência de resistência contra diversos dos antifúngicos aplicados na clínica é mais um agravante. A busca por novas vias e alvos para o desenvolvimento de antifúngicos tem demonstrado um progresso substancial nas últimas décadas (PERFECT, 2017). O reposicionamento de fármacos já estabelecidos para tratar novas doenças é um método em ascensão para explorar esses novos alvos sem a necessidade de inúmeros testes toxicológicos e farmacológicos. Assim, o desenvolvimento de novos antifúngicos, que poderiam levar décadas para serem aprovados se fossem novos compostos, pode ser mais rapidamente aplicado no uso clínico (BUTTS; KRYSAN, 2012). O exemplo de maior sucesso do reposicionamento para controle da criptococose é o antidepressivo sertralina. Ela demonstrou efeito fungicida contra *C. neoformans* e já se encontra em fase III dos testes clínicos para avaliar sua combinação com a terapia padrão de anfotericina B na sobrevivência. O avanço deste estudo clínico demonstra o grande potencial do reposicionamento de fármacos para o tratamento da criptococose (Clinical Trials, 2013; RHEIN et al., 2016; ZHAI et al., 2012).

Diversos fármacos bloqueadores de canais de cálcio já foram testados quanto a seus efeitos contra fungos. Em *C. albicans* foram testados quatro fármacos: amlodipina, nifedipina, benidipina e flunarizina. Os fármacos não apresentaram atividade antifúngica tanto contra linhagens resistentes quanto linhagens sensíveis a fluconazol. Entretanto, uma vez combinados com fluconazol, demonstraram efeito sinérgico para as linhagens resistentes, sendo que a amlodipina obteve os melhores resultados (LIU et al., 2016). A avaliação dos fármacos verapamil, diltiazem, nicardipina e nifedipina foi realizada em linhagens de *Candida glabrata*. Apenas a nifedipina demonstrou efeito antifúngico e, em combinação com fluconazol, apenas a nifedipina e a nicardipina demonstraram um efeito aditivo (ALNAJJAR; BULATOVA; DARWISH, 2018). Ademais, verapamil causou estresse oxidativo em *C. albicans*, com níveis aumentados de ROS e disfunção mitocondrial (YU et al., 2014). Em estudo recente, nifedipina apresentou efeito antifúngico contra *C. glabrata* e demonstrou ter efeito contra espécies de *Cryptococcus*. O fármaco felodipina também demonstrou efeito antifúngico contra espécies de

Cryptococcus, como o fármaco nisoldipina, que além de *Cryptococcus*, demonstrou efeito contra *S. cerevisiae* e espécies de *Candida* (TRUONG et al., 2018).

O bloqueador de canais de cálcio amiodarona foi o fármaco mais explorado até este momento. O seu efeito antifúngico foi identificado contra diversos fungos (COURCHESNE, 2002), possivelmente ligado a um aumento bifásico de cálcio proveniente tanto do meio extracelular, quanto de estoque em organelas intracelulares, como foi demonstrado em *S. cerevisiae* (COURCHESNE; OZTURK, 2003; GUPTA et al., 2003). Esta hipótese foi favorecida pelos resultados obtidos nesse trabalho, nos quais a adição de amiodarona aumentou os níveis de cálcio intracelular de um modo independente da adição extracelular de cálcio. Além disto, a linhagem mutante *pmc1* apresentou maior susceptibilidade ao fármaco, o que está relacionado ao perfil elevado de cálcio intracelular que esta linhagem apresenta em relação à linhagem selvagem H99, considerando-se que o excesso de cálcio é tóxico para a célula. A perturbação que o fármaco amiodarona acarretou na via de sinalização mediada por Ca^{2+} -calcineurina, observada pelas alterações de expressão de genes relacionados à via, reforçam a importância da homeostase do cálcio para a célula. Apesar de não ter sido estabelecido quais são os alvos específicos de amiodarona em células fúngicas, fármacos que atuam na via mediada por Ca^{2+} -calcineurina já foram explorados quanto ao seu efeito antifúngico. Os fármacos tacrolimo e ciclosporina, inibidores da calcineurina, demonstraram um efeito antifúngico contra *C. albicans* e *C. neoformans* (HUSAIN; WAGENER; SINGH, 2001; KONTOYIANNIS et al., 2008). Considerando-se a importância da via mediada por Ca^{2+} -calcineurina em processos fundamentais para a célula, como virulência e crescimento a 37 °C, é possível afirmar que fármacos que são capazes de influenciá-la são candidatos plausíveis para o reposicionamento contra infecções fúngicas (CRUZ; FOX; HEITMAN, 2001; KOZUBOWSKI et al., 2011; KOZUBOWSKI; LEE; HEITMAN, 2009; ODOM et al., 1997).

O sinergismo entre amiodarona e fluconazol já havia sido previamente descrito para *S. cerevisiae* e linhagens resistentes à fluconazol de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Gamarra *et al.* hipotetizam que o sinergismo pode ser devido ao ergosterol ser o principal esterol na membrana fúngica e mudanças na sua via de biossíntese podem ter efeitos na composição da membrana, levando à fluidez e função enzimática alteradas. A depleção de ergosterol em membranas fúngicas pode impactar organelas e seus transportadores, alterando a resposta celular a estresses (GAMARRA et al., 2010). Ademais, Zhang *et al.*

demonstraram que o ergosterol é necessário para o correto funcionamento da H⁺-ATPase vacuolar, grande responsável por manter a homeostase de H⁺ e Ca²⁺. Portanto, a depleção do ergosterol pelo tratamento com fluconazol exacerbaria a perturbação da homeostase de H⁺ e Ca²⁺ causada pelo tratamento com amiodarona, já que sua atividade fungicida está primariamente ligada ao estresse iônico (ZHANG et al., 2010).

A influência dos fármacos azólicos em determinantes de virulência foi previamente demonstrada em *C. gattii*. Subdoses de fluconazol levaram a um aumento da melanização e atividade de lacase em leveduras expostas a este fármaco. Além disto, células fúngicas recuperadas de camundongos infectados e tratados com o fármaco apresentaram cápsula polissacarídica aumentada, tanto provenientes do pulmão quanto do tecido cerebral (FONTES et al., 2017). No presente estudo, a melanização e o tamanho da cápsula não se mostraram influenciados pela exposição à amiodarona e sua combinação com fluconazol. No entanto, a atividade de urease mostrou-se elevada na presença dos fármacos. Relatos de fármacos com efeito antifúngico que alteram a atividade de urease não são comuns, entretanto compostos derivados das isatin-tiossemicarbazonas, que possuem diversas propriedades medicinais, apresentaram resultados neste sentido (PERVEZ et al., 2008). Apesar de escassos, esses resultados indicam que podem ser promissores estudos de como a modulação da atividade de urease pode ser um importante fator para o efeito antifúngico de variados compostos. A atividade de urease também pode estar ligada à via mediada por Ca²⁺-calcineurina. Um estudo recente publicado pelo nosso grupo indicou que o promotor de *URE1* contém um motivo de ligação de Crz1 e a atividade de urease estava significativamente elevada na linhagem mutante *crz1*, indicando que Crz1 possa regular *URE1* e, portanto, que os níveis intracelulares de cálcio possivelmente influenciam a atividade de urease (SQUIZANI et al., 2018).

O tratamento de camundongos infectados por *C. neoformans* e tratados por via intranasal com amiodarona livre demonstrou um aumento da carga fúngica pulmonar após 14 dias, indicando um possível aumento de virulência causado pelo tratamento. Diversos estudos demonstraram que fármacos bloqueadores de canais de cálcio podem ter efeito imunossupressor. Verapamil, nifedipina e diltiazem inibiram a migração de linfócitos induzida por IL-8 para sítios inflamatórios e sua proliferação (BACON; WESTWICK; CAMP, 1989; BIRX; BERGER; FLEISHER, 1984). O fármaco nifedipina também inibiu a resposta de choque anafilático mediado por IgE e a liberação de

histamina pelos mastócitos (TANIZAKI et al., 1983). Por fim, a secreção e ativação de macrófagos foram inibidas por nifedipina e verapamil (SHEN; WIEDERHOLD; OU, 1995; WRIGHT et al., 1985). Apesar de amiodarona não ter sido utilizada nestes estudos e das respostas não serem iguais a de uma infecção por *C. neoformans*, esse perfil de inibição possivelmente explicaria o aumento de carga fúngica pulmonar causada pelo tratamento com amiodarona, devido a uma falta de resposta imune e *clearance* da levedura. As dificuldades geradas por essa imunossupressão são semelhantes às enfrentadas no desenvolvimento dos fármacos ciclosporina e tacrolimo como fármacos antifúngicos, devido ao seu mecanismo de ação imunossupressor. Para a segura continuidade da proposta de utilizar bloqueadores de canais de cálcio como tratamento, os fármacos precisariam manter a atividade antifúngica com uma atividade imunossupressora mínima.

A produção de nanocápsulas poliméricas apresenta diversos benefícios, como melhor eficácia, biodisponibilidade e menos efeitos adversos. A estrutura da nanocápsula polimérica concede uma liberação do fármaco mais controlada devido à viscosidade do núcleo lipídico e da presença da barreira polimérica (JÄGER et al., 2009). Nanocápsulas poliméricas com a mesma formulação e contendo fluconazol foram produzidas em um estudo recente (DOMINGUES BIANCHIN et al., 2019) e aplicadas em espécies de *Candida* resistentes a fluconazol. O nanoencapsulamento apresentou vantagens como a diminuição do MIC de fluconazol e a reversão da resistência *in vitro*. Além disso, essa formulação apresentou uma alta eficiência de encapsulação, indicando que a maior parte do fármaco se encontra na nanocápsula. Outras formulações utilizando fluconazol também já foram produzidas, como lipossomos para o tratamento de queratite por *C. albicans* em coelhos, os quais obtiveram uma taxa mais alta de completa recuperação das córneas (HABIB et al., 2010) e nanopartículas para o tratamento de candidíase oral, demonstrando ser um tratamento promissor (RENÇBER et al., 2016).

O presente estudo é o primeiro a testar uma formulação de nanocápsulas poliméricas de fluconazol (LNC_{FLU}) contra infecções por *C. neoformans*. Entretanto, o tratamento intraperitoneal com LNC_{FLU} não demonstrou maior efeito antifúngico em comparação ao fármaco livre. Este fato pode ser devido à distribuição do fármaco nas nanocápsulas. Como citado anteriormente, em uma formulação anterior (DOMINGUES BIANCHIN et al., 2019) o fluconazol apresentou uma alta eficiência de encapsulação, no entanto isso não indica em qual das pseudo-fases da nanocápsula ele se encontra. Por

meio de um algoritmo que considera o coeficiente de distribuição do fármaco ($\log D$) (OLIVEIRA et al., 2013), o fluconazol pode ser categorizado como um fármaco de categoria II, na qual o fármaco está disperso na superfície da nanocápsula. A maior presença do fármaco na superfície do que de fato encapsulado no núcleo lipídico pode ser definitiva para que a resposta tenha sido similar à do fármaco livre. Do mesmo modo, a categorização de amiodarona no tipo VI, no qual o fármaco está em sua maioria encapsulado no núcleo lipídico, explicaria o melhor efeito antifúngico da nanocápsula polimérica de amiodarona (LNC_{AMD}) em relação ao fármaco livre. Além disto, o pouco efeito visualizado para o tratamento com LNC_{FLU} pode estar relacionado à baixa concentração de fármaco encapsulada e, conseqüentemente, às doses baixas administradas em comparação com o estudo realizado em *C. albicans*, no qual 0,5 mg/mL de fluconazol foi encapsulado (DOMINGUES BIANCHIN et al., 2019).

O tratamento intranasal utilizando as nanocápsulas levou a uma maior homogeneidade entre os animais do mesmo grupo em comparação com os grupos de tratamento utilizando os fármacos livres. Esta pode ser uma das causas de porque o tratamento com todas as formulações de nanocápsulas, inclusive a nanocápsula produzida sem a adição de fármaco, demonstraram efeito antifúngico. O efeito da nanocápsula branca com formulações semelhantes foi observado na literatura (CÉ et al., 2016; DE MARCHI et al., 2017), indicando um possível efeito antifúngico da própria formulação. Por fim, foi observado que o tratamento por via intraperitoneal com as formulações de nanocápsulas apresentaram resultados similares aos obtidos para os fármacos livres. Este fato pode ser devido à aglomeração das nanocápsulas na cavidade peritoneal, como já foi demonstrado (BULCÃO et al., 2013), o que acarretaria em uma disseminação não apropriada pelo organismo. Assim sendo, demonstramos que o uso da nanotecnologia surge como uma alternativa viável para o tratamento da criptococose.

5. Conclusões

- Amiodarona apresenta atividade antifúngica *in vitro* contra as linhagens H99 e *pmc1* de *C. neoformans*, e demonstra ser sinérgica com o antifúngico fluconazol.
- Enquanto determinantes de virulência como a cápsula polissacarídica e a produção de melanina não foram afetados, a atividade de urease foi elevada em resposta à exposição a amiodarona.
- Genes relacionados à via de sinalização mediada por Ca^{2+} -calcineurina tiveram sua expressão modulada pelo fármaco amiodarona.
- A concentração de cálcio intracelular apresentou aumento pela adição extracelular de amiodarona.
- Amiodarona não demonstrou atividade antifúngica em modelo murino de infecção por *C. neoformans*, apresentando inclusive um aumento da carga fúngica pulmonar. Não foi observado efeito sinérgico com fluconazol *in vivo*.
- As nanocápsulas poliméricas produzidas (LNC_{AMD} , LNC_{FLU} e $\text{LNC}_{\text{AMD+FLU}}$) apresentaram caracterização adequada para aplicação farmacêutica.
- Em um tratamento por via intraperitoneal, LNC_{AMD} demonstraram efeito antifúngico superior ao observado para o fármaco livre. No tratamento por via intranasal todas as formulações apresentaram efeito antifúngico aprimorado em relação aos fármacos livres.

6. Perspectivas

- Avaliar outros fármacos bloqueadores de canais de cálcio quanto a sua atividade antifúngica.
- Avaliar teor e eficiência de encapsulação das nanocápsulas poliméricas
- Avaliar o efeito imunossupressor de amiodarona em células imunes.
- Produzir nanocápsulas fluorescentes para avaliar a sua distribuição no organismo por diferentes rotas de administração terapêutica.

7. Referências

- ADLER-MOORE, J. P.; PROFFITT, R. T. Development, characterization, efficacy and mode of action of amphotericin B, a unilamellar liposomal formulation of amphotericin B. **Journal of Liposome Research**, v. 3, n. 3, p. 429–450, 28 jan. 1993.
- ALNAJJAR, L.; BULATOVA, N.; DARWISH, R. Evaluation of four calcium channel blockers as fluconazole resistance inhibitors in *Candida glabrata*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 14, p. 185–189, set. 2018.
- ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome Extrusion and Host-Cell Survival after *Cryptococcus neoformans* Phagocytosis by Macrophages. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. 2161–5, 2006.
- BACON, K. B.; WESTWICK, J.; CAMP, R. D. Potent and specific inhibition of IL-8-, IL-1 α - and IL-1 β -induced in vitro human lymphocyte migration by calcium channel antagonists. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 165, n. 1, p. 349–54, 30 nov. 1989.
- BERNARDI, A. et al. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. **Cancer Letters**, v. 281, n. 1, p. 53–63, 18 ago. 2009.
- BIRX, D. L.; BERGER, M.; FLEISHER, T. A. The interference of T cell activation by calcium channel blocking agents. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 133, n. 6, p. 2904–9, dez. 1984.
- BLASI, E. et al. The human immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitor indinavir directly affects the opportunistic fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 187–95, 2004.
- BULCÃO, R. P. et al. Acute and subchronic toxicity evaluation of poly(ϵ -Caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. **Toxicological Sciences**, v. 132, n. 1, p. 162–76, 2013.
- BUTTS, A. et al. A repurposing approach identifies off-patent drugs with fungicidal cryptococcal activity, a common structural chemotype, and pharmacological properties relevant to the treatment of Cryptococcosis. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 2, p. 278–87, 2013.
- BUTTS, A. et al. Estrogen receptor antagonists are anti-cryptococcal agents that directly bind EF hand proteins and synergize with fluconazole in vivo. **mBio**, v. 5, n. 1, p. e00765-13, 2014.
- BUTTS, A.; KRYSAN, D. J. Antifungal Drug Discovery: Something Old and Something New. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 9, p. e1002870, 6 set. 2012.
- CÉ, R. et al. Chitosan-coated dapsone-loaded lipid-core nanocapsules: Growth inhibition of clinical isolates, multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus* ssp. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 511, p. 153–61, 2016.
- CHARLIER, C. et al. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 1, p. 120–7, 2009.
- CHEN, C. K. et al. Biodegradable cationic polymeric nanocapsules for overcoming multidrug resistance and enabling drug-gene co-delivery to cancer cells. **Nanoscale**, v. 6, n. 3, p. 1567–1572, 2014.
- CHEN, S. et al. Epidemiology and Host- and Variety-Dependent Characteristics of Infection Due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, p. 499–508, ago. 2000.
- CHERNIAK, R. et al. Structure and antigenic activity of the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* serotype A. **Molecular Immunology**, v. 17, n. 8, p. 1025–32, 1980.

- CHERNIAK, R. et al. Cryptococcus neoformans Chemotyping by Quantitative Analysis of ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Glucuronoxylomannans with a Computer-Simulated Artificial Neural Network. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 2, p. 146–59, 1998.
- CHOW, E. W. L. et al. Elucidation of the calcineurin-Crz1 stress response transcriptional network in the human fungal pathogen Cryptococcus neoformans. **PLoS Genetics**, v. 13, n. 4, p. e1006667, 2017.
- COELHO, C.; CASADEVALL, A. Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 792–799, 2016.
- CONTRI, R. V. et al. The use of nanoencapsulation to decrease human skin irritation caused by capsaicinoids. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 951–962, fev. 2014.
- COURCHESNE, W. E. Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 1, p. 195–199, 1 jan. 2002.
- COURCHESNE, W. E.; OZTURK, S. Amiodarone induces a caffeine-inhibited, MID1-dependent rise in free cytoplasmic calcium in Saccharomyces cerevisiae. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 223–234, jan. 2003.
- COUVREUR, P. et al. Nanocapsule Technology: A Review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n. 2, p. 99–134, 2002.
- CRUZ, M. C.; FOX, D. S.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in Cryptococcus neoformans. **The EMBO journal**, v. 20, n. 5, p. 1020–32, 1 mar. 2001.
- CUI, J. et al. Simulating calcium influx and free calcium concentrations in yeast. **Cell Calcium**, v. 45, n. 2, p. 123–32, 2009.
- DA SILVA, C. R. et al. Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on Candida tropicalis resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1691–700, 2013.
- DE MARCHI, J. G. B. et al. Triclosan resistance reversion by encapsulation in chitosan-coated-nanocapsule containing α -bisabolol as core: development of wound dressing. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 7855–68, 2017.
- DELGADO, A. V. et al. Measurement and Interpretation of Electrokinetic Phenomena (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n. 10, p. 1753–1805, 2005.
- DIMER, F. A. et al. Nanoencapsulation of olanzapine increases its efficacy in antipsychotic treatment and reduces adverse effects. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1137–1145, jun. 2014.
- DOERING, T. L. et al. Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. **Medical Mycology**, v. 37, n. 3, p. 175–81, 1999.
- DOERING, T. L. How Sweet it is! Cell Wall Biogenesis and Polysaccharide Capsule Formation in Cryptococcus neoformans. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 223–47, 2009.
- DOMINGUES BIANCHIN, M. et al. Lipid core nanoparticles as a broad strategy to reverse fluconazole resistance in multiple Candida species. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 523–529, 6 mar. 2019.
- DYKSTRA, M. A.; FRIEDMAN, L.; MURPHY, J. W. Capsule size of Cryptococcus neoformans: Control and relationship to virulence. **Infection and Immunity**, v. 16, n. 1, p. 129–35, 1977.

- FAN, W. et al. Eca1, a sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, is involved in stress tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 7, p. 3394–3405, 1 jul. 2007.
- FANUN, M. **Colloids in Drug Delivery**. 1. ed. [s.l.] CRC Press/Taylor & Francis, 2010.
- FELDMESSER, M. et al. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 4225–37, jul. 2000.
- FONSECA, F. N. et al. Mucoadhesive Amphiphilic Methacrylic Copolymer-Functionalized Poly(ϵ -caprolactone) Nanocapsules for Nose-to-Brain Delivery of Olanzapine. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 11, n. 8, p. 1472–81, ago. 2015.
- FONTANA, M. C. et al. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 5, n. 3, p. 254–63, jun. 2009.
- FONTES, A. C. L. et al. A subdose of fluconazole alters the virulence of *Cryptococcus gattii* during murine cryptococcosis and modulates type I interferon expression. **Medical Mycology**, v. 55, n. 2, p. 203–212, 1 fev. 2017.
- FÖRSTER, C.; KANE, P. M. Cytosolic Ca²⁺ homeostasis is a constitutive function of the V-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 49, p. 38245–53, 2000.
- FOX, D. S. et al. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 835–849, 21 dez. 2001.
- FRANK, L. A. et al. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 7, n. 5, p. 623–639, 1 set. 2015.
- FU, M. S. et al. *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1007144, 2018.
- FUJITA, N. K.; EDWARDS, J. E. Combined in vitro effect of amphotericin B and rifampin on *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 19, n. 1, p. 196–8, 1981.
- GAMARRA, S. et al. Mechanism of the synergistic effect of amiodarone and fluconazole in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 1753–1761, 1 maio 2010.
- GRANGER, D. L.; PERFECT, J. R.; DURACK, D. T. Virulence of *Cryptococcus neoformans*: Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. **Journal of Clinical Investigation**, v. 76, n. 2, p. 508–16, 1985.
- GULYAEV, A. E. et al. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 16, n. 10, p. 1564–9, out. 1999.
- GUO, Q. et al. Synergistic activity of azoles with amiodarone against clinically resistant *Candida albicans* tested by checkerboard and time-kill methods. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. Pt 4, p. 457–62, 2008.
- GUPTA, S. SEN et al. Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 31, p. 28831–28839, 1 ago. 2003.
- HAAS, S. E. et al. Nanoencapsulation increases quinine antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei* in vivo. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 2, p. 156–161, ago. 2009.

- HABIB, F. S. et al. Liposomes as an ocular delivery system of fluconazole: in-vitro studies. **Acta Ophthalmologica**, v. 88, n. 8, p. 901–904, dez. 2010.
- HARRISON, T. S.; GRIFFIN, G. E.; LEVITZ, S. M. Conditional lethality of the diprotic weak bases chloroquine and quinacrine against *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of infectious diseases**, v. 182, n. 1, p. 283–9, 2000.
- HEISS, C. et al. The structure of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan contains β -d-glucuronic acid. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 7, p. 915–20, 2009.
- HOANG, L. M. N. et al. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 935–940, 1 set. 2004.
- HONG, M. P. et al. Activity of the calcium channel pore Cch1 is dependent on a modulatory region of the subunit Mid1 in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 1, p. 142–50, 2013.
- HUSAIN, S.; WAGENER, M. M.; SINGH, N. *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients: variables influencing clinical characteristics and outcome. **Emerging infectious diseases**, v. 7, n. 3, p. 375–81, 2001.
- IDNURM, A. et al. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 753–764, 30 out. 2005.
- JÄGER, E. et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 130–140, fev. 2009.
- JOFFE, L. S. et al. The Anti-helminthic Compound Mebendazole Has Multiple Antifungal Effects against *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 535, 2017.
- JONG, A. et al. Involvement of human CD44 during *Cryptococcus neoformans* infection of brain microvascular endothelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1313–26, 2008.
- KAUFMAN-FRANCIS, K. et al. The Early Innate Immune Response to, and Phagocyte-Dependent Entry of, *Cryptococcus neoformans* Map to the Perivascular Space of Cortical Post-Capillary Venules in Neurocryptococcosis. **The American Journal of Pathology**, v. 188, n. 7, p. 1653–1665, 2018.
- KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 49, p. 17258–63, 2004.
- KLEPSEK, M. E.; WOLFE, E. J.; PFALLER, M. A. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 397–401, 1998.
- KMETZSCH, L. et al. The vacuolar Ca²⁺ exchanger vcx1 is involved in calcineurin-dependent Ca²⁺ tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 11, p. 1798–1805, 1 nov. 2010.
- KMETZSCH, L. et al. The calcium transporter Pmc1 provides Ca²⁺ tolerance and influences the progression of murine cryptococcal infection. **FEBS Journal**, v. 280, n. 19, p. 4853–4864, 1 out. 2013.
- KONTOYIANNIS, D. P. et al. Calcineurin inhibitor agents interact synergistically with antifungal agents in vitro against *Cryptococcus neoformans* isolates: Correlation with outcome in solid organ transplant recipients with cryptococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 735–8, 2008.

KOZUBOWSKI, L. et al. Calcineurin colocalizes with P-bodies and stress granules during thermal stress in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 11, p. 1396–1402, nov. 2011.

KOZUBOWSKI, L.; LEE, S. C.; HEITMAN, J. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 370–380, mar. 2009.

KRAUS, P. R.; NICHOLS, C. B.; HEITMAN, J. Calcium- and calcineurin-independent roles for calmodulin in *Cryptococcus neoformans* morphogenesis and high-temperature growth. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 6, p. 1079–87, 2005.

KÜLKAMP, I. C. et al. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2078–2084, 2009.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 4, p. 223–7, 2009.

LEE, S. C.; DICKSON, D. W.; CASADEVALL, A. Pathology of cryptococcal meningoencephalitis: Analysis of 27 patients with pathogenetic implications. **Human Pathology**, v. 27, n. 8, p. 839–47, 1996.

LESTNER, J. et al. Experimental models of short courses of liposomal amphotericin b for induction therapy for cryptococcal meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. e00090-17, 2017.

LEV, S. et al. The Crz1/Sp1 Transcription Factor of *Cryptococcus neoformans* Is Activated by Calcineurin and Regulates Cell Wall Integrity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51403, 12 dez. 2012.

LEVITZ, S. M. et al. Chloroquine induces human mononuclear phagocytes to inhibit and kill *Cryptococcus neoformans* by a mechanism independent of iron deprivation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 6, p. 1640–6, 1997.

LI, X. et al. Nano carriers for drug transport across the blood–brain barrier. **Journal of Drug Targeting**, v. 25, n. 1, p. 17–28, 2 jan. 2017.

LIM, W. M. et al. Formulation and delivery of itraconazole to the brain using a nanolipid carrier system. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 2117–2126, 2 maio 2014.

LIU, L.; TEWARI, R. P.; WILLIAMSON, P. R. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, p. 6034–9, 1999.

LIU, M. et al. Cch1 mediates calcium entry in *Cryptococcus neoformans* and is essential in low-calcium environments. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 10, p. 1788–1796, 1 out. 2006.

LIU, S. et al. Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. **Eukaryotic Cell**, v. 14, n. 4, p. 324–34, 2015.

LIU, S. et al. Synergistic Effect of Fluconazole and Calcium Channel Blockers against Resistant *Candida albicans*. **PLoS one**, v. 11, n. 3, p. e0150859, 2016.

LOCKE, E. G. et al. A Homolog of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels Stimulated by Depletion of Secretory Ca²⁺ in Yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 18, p. 6686–94, 2000.

MA, H. et al. Expulsion of Live Pathogenic Yeast by Macrophages. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. 2156–60, 2006.

MARUVADA, R. et al. *Cryptococcus neoformans* phospholipase B1 activates host cell Rac1 for traversal across the blood-brain barrier. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 10, p. 1544–53, 2012.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North**

America, v. 30, n. 1, p. 179–206, 2016.

MCQUISTON, T. J.; WILLIAMSON, P. R. Paradoxical roles of alveolar macrophages in the host response to *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 18, n. 1, p. 1–9, fev. 2012.

MERRIFIELD, E. H.; STEPHEN, A. M. Structural investigations of two capsular polysaccharides from *cryptococcus neoformans*. **Carbohydrate Research**, v. 86, n. 1, p. 69–76, 1 nov. 1980.

MUEND, S.; RAO, R. Fungicidal activity of amiodarone is tightly coupled to calcium influx. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 3, p. 425–31, 2008.

NOSANCHUK, J. D. et al. Evidence that *Cryptococcus neoformans* is melanized in pigeon excreta: Implications for pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p. 5477–9, 1999.

NOSANCHUK, J. D. et al. Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. **Lancet**, v. 355, n. 9220, p. 2049–50, 2000.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: Mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–9, 2003.

ODOM, A. et al. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **EMBO Journal**, v. 16, n. 10, p. 2576–2589, 15 maio 1997.

OLIVEIRA, C. P. et al. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**, n. 9, p. 1141–1150, 2013.

OLSEN, I. Attenuation of *Candida albicans* virulence with focus on disruption of its vacuole functions. **Journal of Oral Microbiology**, v. 6, 2014.

OLSZEWSKI, M. A. et al. Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761–1771, maio 2004.

OPHIR, T.; GUTNICK, D. L. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 740–5, 1994.

OSTERHOLZER, J. J. et al. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. **American Journal of Pathology**, v. 174, n. 3, p. 932–43, 2009.

PARK, H. S. et al. Calcineurin Targets Involved in Stress Survival and Fungal Virulence. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 9, p. e1005873, 2016.

PARK, M. J.; BALAKRISHNAN, P.; YANG, S. G. Polymeric nanocapsules with SEDDS oil-core for the controlled and enhanced oral absorption of cyclosporine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1–2, p. 757–764, 30 jan. 2013.

PERFECT, J. R. et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 3, p. 291–322, 1 fev. 2010.

PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: A reality check. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 9, p. 603–616, 2017.

PERVEZ, H. et al. In vitro cytotoxic, antibacterial, antifungal and urease inhibitory activities of some N^4 -substituted isatin-3-thiosemicarbazones. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 848–854, 20 jan. 2008.

POHLMANN, A. R. et al. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery.

Expert Opinion on Drug Delivery, v. 10, n. 5, p. 623–38, 2013.

POLETTI, F. S. et al. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, n. 4, p. 472–478, 2008.

POZNIAKOVSKY, A. I. et al. Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast. **Journal of Cell Biology**, v. 168, n. 2, p. 257–69, 2005.

PUKKILA-WORLEY, R. et al. Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 1, p. 190–201, 2005.

RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 873–881, 2017.

RENÇBER, S. et al. Development, characterization, and in vivo assessment of mucoadhesive nanoparticles containing fluconazole for the local treatment of oral candidiasis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 2641, jun. 2016.

RHEIN, J. et al. Efficacy of adjunctive sertraline for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: An open-label dose-ranging study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. 809–818, 1 jul. 2016.

ROSAS, Á. L.; CASADEVALL, A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, n. 2, p. 265–72, 1997.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1297–313, 2012.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SHEN, H.; WIEDERHOLD, M. D.; OU, D. W. The Suppression of Macrophage Secretion by Calcium Blockers and Adenosine. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 17, n. 2, p. 301–309, 27 jan. 1995.

SHI, M. et al. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 5, p. 1683–93, 2010.

SINGH, A. et al. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 4, n. 3, p. e00220-13, 2013.

SMITH, K. D. et al. Increased antifungal drug resistance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7197–204, 2015.

SQUIZANI, E. D. et al. Cryptococcal dissemination to the central nervous system requires the vacuolar calcium transporter Pmc1. **Cellular Microbiology**, v. 20, n. 2, 2018.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 26, p. 15245–50, 2001.

STIE, J.; BRUNI, G.; FOX, D. Surface-associated plasminogen binding of *Cryptococcus neoformans* promotes extracellular matrix invasion. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, p. e5780, 2009.

SYME, R. M. et al. The capsule of *Cryptococcus neoformans* reduces T-lymphocyte proliferation by reducing phagocytosis, which can be restored with anticapsular antibody. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4620–4627, set. 1999.

- TANIZAKI, Y. et al. Inhibitory effect of nifedipine and cromolyn sodium on skin reactions and ^{45}Ca uptake and histamine release in rat mast cells induced by various stimulating agents. **International archives of allergy and applied immunology**, v. 72, n. 2, p. 102–9, 1983.
- TRUONG, M. et al. Repurposing drugs to fast-track therapeutic agents for the treatment of cryptococcosis. **PeerJ**, v. 6, p. e4761, 2018.
- VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394–400, 2002.
- VECCHIARELLI, A. et al. Role of human alveolar macrophages as antigen-presenting cells in *Cryptococcus neoformans* infection. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 11, n. 2, p. 130–7, 1994.
- VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 171–9, ago. 2000.
- VU, K. et al. Immortalized human brain endothelial cell line HCMEC/D3 as a model of the blood-brain barrier facilitates in vitro studies of central nervous system infection by *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 11, p. 1803–7, 2009.
- VU, K. et al. Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. **mBio**, v. 5, n. 3, p. e01101-14, 2014.
- WANG, H. et al. Alkaline stress triggers an immediate calcium fluctuation in *Candida albicans* mediated by Rim101p and Crz1p transcription factors. **FEMS Yeast Research**, v. 11, n. 5, p. 430–9, 2011.
- WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: Mechanism of action. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 8, p. 3131–3136, 1995.
- WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 3864–6, 1994.
- WEKSLER, B. B. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 13, p. 1872–4, 2005.
- WILSON, B. et al. Targeted delivery of tacrine into the brain with polysorbate 80-coated poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 1, p. 75–84, set. 2008.
- WRIGHT, B. et al. Inhibition of macrophage activation by calcium channel blockers and calmodulin antagonists. **Cellular immunology**, v. 95, n. 1, p. 46–53, 1 out. 1985.
- XIE, S. et al. Difference in *Cryptococcus neoformans* cellular and capsule size in sequential pulmonary and meningeal infection: A postmortem study. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 1, p. 49–52, 2012.
- YOO, J. Y. et al. Characterization of degradation behavior for PLGA in various pH condition by simple liquid chromatography method. **Bio-medical materials and engineering**, v. 15, n. 4, p. 279–88, 2005.
- YU, Q. et al. The Calcium Channel Blocker Verapamil Inhibits Oxidative Stress Response in *Candida albicans*. **Mycopathologia**, v. 177, n. 3–4, p. 167–77, 2014.
- ZARAGOZA, O. et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2043–57, 2008.

- ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. **Biological Procedures Online**, v. 6, p. 10–15, 2004.
- ZARAGOZA, O.; FRIES, B. C.; CASADEVALL, A. Induction of Capsule Growth in *Cryptococcus neoformans* by Mammalian Serum and CO₂. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6155–64, 2003.
- ZHAI, B. et al. The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 7, p. 3758–3766, jul. 2012.
- ZHANG, Y.-Q. et al. Requirement for Ergosterol in V-ATPase Function Underlies Antifungal Activity of Azole Drugs. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 6, p. e1000939, 3 jun. 2010.
- ZHANG, Y. Q.; RAO, R. Global disruption of cell cycle progression and nutrient response by the antifungal agent amiodarone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 52, p. 37844–37853, 28 dez. 2007.
- ZHU, X. et al. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5589–96, 2001.
- ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2004.
- ZIMMER, M. Molecular mechanics evaluation of the proposed mechanisms for the degradation of urea by urease. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 17, n. 5, p. 787–97, 2000.